

# Molekularzytogenetische und bioinformatische Untersuchungen der FRA16B-Region beim Menschen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Javad Karim Zad Hagh

aus Urmia

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
(Institutsdirektorin: Prof. Dr. rer. nat. Royer-Pokora)

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Prof. Dr. B. Royer-Pokora

Korreferent: Prof. Dr. U. Rüter

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2010

***für meine Familie  
Zahra, Nawa, Nima  
und  
meine Heimathelden  
Mehdi und Hamid Bakeri***

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Struktur menschlicher Chromosomen und Organisation repetitiver Sequenzen                | 1         |
| 1.2 "Fragile Sites" (FSs)   | 3         |
| 1.2.1 "Common Fragile Sites (CFSs)"   | 5         |
| 1.2.2 "Rare Fragile Sites (RFSs)"   | 6         |
| 1.2.2.1 Folat-sensitive Gruppe  | 6         |
| 1.2.2.2 Nicht-Folat-sensitive Gruppe  | 8         |
| 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit   | 12        |
| <b>2. Material und Methoden</b>   | <b>14</b> |
| 2.1 Material  | 14        |
| 2.1.1 Chemikalien   | 14        |
| 2.1.2 Bakterien mit BAC ( <i>bacterial artificial chromosome</i> )-Klone                    | 15        |
| 2.1.3 Oligonukleotide   | 16        |
| 2.1.4 DNA-Größenmarker  | 18        |
| 2.1.5 Enzyme  | 18        |
| 2.1.6 Radioisotope  | 19        |
| 2.1.7 Membranen für Southern Blot   | 19        |
| 2.1.8 Röntgenfilme  | 19        |
| 2.1.9 Kulturmedien und Antibiotikallösungen für Bakterien (BAC-Klone) und humane Zellkultur | 19        |
| 2.1.10 Kits   | 20        |
| 2.1.11 Puffer und Lösungen  | 20        |
| 2.1.12 Spezielle Bio-Software   | 22        |
| 2.1.13 Geräte   | 22        |
| 2.1.14 FRA16B-Träger und Kontrollpersonen   | 23        |
| 2.2 Methoden  | 25        |
| 2.2.1 Kultivierung, Präparation und Darstellung der Chromosomen                             | 25        |
| 2.2.2 GTG-Technik   | 26        |
| 2.2.3 DNA-Isolierung aus peripherem Blut, Lymphozyten-Sediment und Fibroblasten             | 26        |
| 2.2.4 DNA-Isolierung aus Bakterien  | 26        |
| 2.2.5 FISH  | 27        |
| 2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)   | 35        |
| 2.2.7 Dot-Blot  | 36        |
| 2.2.8 Agarosegelelektrophorese  | 37        |
| 2.2.9 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)  | 37        |
| 2.2.10 Southern Blot  | 40        |
| 2.2.11 Hybridisierung der Nylon-Membranen   | 43        |
| 2.2.12 Mikrosatelliten-Analyse bei Proband 4 und seinen Eltern                              | 45        |
| <b>3. Ergebnisse</b>  | <b>46</b> |
| 3.1 Zytogenetische Ergebnisse an Lymphozyten  | 46        |
| 3.1.1 Temperaturänderung  | 46        |
| 3.1.2 DAPI-Einfluss auf die zytogenetische FRA16B-Expression                                | 51        |
| 3.1.3 2-Aminopurin-Einfluss auf die zytogenetische FRA16-Expression                         | 54        |
| 3.2 Untersuchung dermalen Fibroblasten von Proband 1 auf die FRA16B-Expression              | 57        |
| 3.3 FISH-Analyse  | 58        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.3.1 Auswahl der FISH-Sonden für die Untersuchung der FRA16B-Region     | 58         |
| 3.3.2 FISH-Ergebnisse in Metaphasen                                      | 60         |
| 3.3.3 FISH-Ergebnisse in Interphasen                                     | 63         |
| 3.3.4 Zusammenfassung der FISH-Ergebnisse                                | 64         |
| 3.4 Analyse von Proband 3 und seinen Eltern                              | 67         |
| 3.4.1 Zytogenetische und FISH Ergebnisse                                 | 67         |
| 3.4.2 Mikrosatelliten-Analyse  | 69         |
| 3.5 Southern-Blot und Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) der FRA16B-Region | 70         |
| 3.5.1 Southern-Blot Untersuchungen der FRA16B-Region                     | 70         |
| 3.5.2 PFGE-Analyse der FRA16B-Region                                     | 72         |
| 3.6 Analyse des FRA16B-Locus bei 61 Kontrollpersonen                     | 75         |
| 3.7 Variabilität der FRA16B-Region bei 70 selektierten Personen          | 77         |
| 3.8 Bioinformatische Analyse   | 80         |
| 3.8.1 Das Programm "AT-Block-Finder"                                     | 80         |
| 3.8.2 Ziele der Entwicklung dieses Programms                             | 80         |
| <b>4. Diskussion</b>   | <b>90</b>  |
| 4.1 Molekulargenetik   | 90         |
| 4.2 Zytogenetik  | 97         |
| 4.3 FISH   | 101        |
| 4.4 Klinisch auffällige FRA16B-Träger                                    | 105        |
| 4.5 Bioinformatik  | 107        |
| <b>5. Zusammenfassung</b>  | <b>110</b> |
| <b>6. Abstract</b>   | <b>112</b> |
| <b>7. Literaturverzeichnis</b>   | <b>114</b> |
| <b>8. Anhang</b>   | <b>129</b> |
| <b>Danksagung</b>  |            |
| <b>Erklärung</b>   |            |
| <b>Lebenslauf</b>  |            |

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |  |
|--------------------|--|
| A                  | Adenin   |
| Abb                | Abbildung  |
| ATM                | Ataxia telangiectasia mutated                    |
| ATR                | Ataxia telangiectasia and Rad3 related           |
| BAC                | Bacterial Artificial Chromosome                  |
| BrdU               | 5-bromo-2-deoxyuridine                           |
| bp                 | Basenpaare                                       |
| CHEF               | Contour-clamped-Homogenous-Electric-Field        |
| Cot-1-DNA          | hochrepetitive menschliche DNA                   |
| DAPI               | 4',6-Diamidino-2-phenylindol                     |
| dCTP               | Desoxycytidintriphosphat                         |
| ddH <sub>2</sub> O | Doppelt-destilliertes Wasser                     |
| DHF                | Dihydrofolat                                     |
| DHFR               | Dihydrofolat-Reduktase                           |
| DMD2               | Myotonische Muskeldystrophie Type 2              |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure                           |
| dTMP               | Desoxythymidinmonophosphat                       |
| C                  | Cytosin  |
| CFSs               | Common Fragile Sites                             |
| EDTA               | Ethylendiamintetraessigsäure                     |
| E. Coli            | Escherichia coli                                 |
| FHIT               | Fragile Histidine Triad Gene                     |
| EtBr               | Ethidiumbromid                                   |
| FISH               | Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung               |
| FKS                | Fötales Kälberserum                              |
| EPM1               | Progressive Myoclonus Mpilepsy Type 1            |
| FSs                | Fragile Sites                                    |
| G                  | Guanin   |
| GE                 | Gelelektrophorese                                |
| GTG                | G-bands by trypsin using Giemsa                  |
| HF <sub>s</sub>    | human dermal-Fibroblasten                        |
| HGP                | Human Genome Project                             |
| HG18               | Human Genome assembly 18                         |
| HK <sub>s</sub>    | humane epidermale-Keratiozyten                   |
| IDDM2              | Insulin-dependent Diabetes Mellitus Type 2       |
| K                  | Kontrolle  |
| kb                 | Kilobasen  |
| L                  | Liter  |
| LINEs              | Long Interspersed Nuclear elements               |
| LTR                | Long Terminal Repeat                             |
| Mb                 | Megabasen  |
| µg                 | Mikrogramm                                       |
| µl                 | Mikroliter                                       |
| MARs               | Matrix-Anheftungsregionen                        |
| min                | Minuten  |
| MLPA               | Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification |
| MMS                | Methyl-Methansulfonat                            |
| MP                 | Mutter von Proband                               |

|          |                                     |
|----------|-------------------------------------|
| M.R.     | mental retardiert                   |
| mRNA     | messenger RNA                       |
| ng       | Nanogramm                           |
| p        | kurzer Arm eines Chromosoms         |
| P        | Proband                             |
| PBL      | peripheren Blut                     |
| pen      | Penicillin                          |
| PCR      | Polymerase-Kettenreaktion           |
| PFGE     | Pulsfeldgelelektrophorese           |
| PHA      | Phytohämagglutinin                  |
| PMSF     | Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid      |
| q        | langer Arm eines Chromosoms         |
| qter     | q-Terminal                          |
| QFQ      | Q-Banden Quinacrin-gefärbt          |
| RFSs     | Rare Fragile Sites                  |
| Rpm      | Umdrehungen pro Minute              |
| RT       | Raumtemperatur                      |
| SCE      | Sister Chromatid Exchange           |
| SDS      | Natrium-Dodecyl-Sulfat              |
| sek      | Sekunden                            |
| SINEs    | Short Interspersed Nuclear Elements |
| SLC9A9   | Solute Carrier Family 9             |
| SNP      | Single Nucleotide Polymorphism      |
| SSB      | single-strand break                 |
| strep    | Streptomycin                        |
| STS      | Sequence Tagged Site                |
| T        | Thymidin                            |
| Tab      | Tabelle                             |
| TE       | Tris/EDTA-Lösung                    |
| THF      | Tetrahydrofolat                     |
| UEC      | Unequal Crossing Over               |
| UESCE    | Unequal Sister Chromatid Exchange   |
| UPD      | Uniparentale Disomie                |
| upd (16) | Uniparentale Disomie 16             |
| UV       | Ultraviolettes Licht                |
| VNTR     | Variable Number Tandem Repeat       |
| VP       | Vater von Proband                   |
| WCP      | Whole Chromosome Painting           |
| WWOX     | WW domain containing Oxidoreductase |

# 1. Einleitung

## 1.1 Struktur menschlicher Chromosomen und Organisation repetitiver Sequenzen

Der menschliche Chromosomensatz besteht in somatischen Zellen aus 22 Autosomen-Paaren und 2 Gonosomen. Nach Größe, Zentromerlage und Bänderung werden die menschlichen Chromosomen in 7 Gruppen unterteilt (Rooney, 2001):

Gruppe A (Chr.1,2,3); Gruppe B (Chr.4,5); Gruppe C (Chr.6,7,8,9,10,11,12,X); Gruppe D (Chr.13,14,15); Gruppe E (Chr.16,17,18); Gruppe F (Chr.19,20); Gruppe G (Chr.21,22,Y)

Neben kodierenden Abschnitten nicht repetitiver DNA enthält menschliche DNA verschiedene, meist nicht kodierende, hochrepetitive DNA-Sequenzfamilien, die in zwei Gruppen unterteilt werden (Strachan & Read, 2004):

### **A: Tandemartig wiederholte, nicht-kodierende DNA-Sequenzen**

Sie werden beim Menschen in drei Hauptgruppen unterteilt:

1. Satelliten-DNA ( $\alpha$ -Satellit,  $\beta$ -Satellit, und Satelliten 1, 2 und 3; Wiederholungseinheit: 5-171bp).

Der größte Teil des Heterochromatins (hochkondensierte Regionen mit wenigen oder keinen exprimierten Genen) besteht aus Satelliten-DNA. Sie kommen meistens in der Nähe der Zentromerregionen vor.

2. Minisatelliten-DNA (Telomerfamilie (Wiederholungseinheit: 6bp), hypervariable Familie (Wiederholungseinheit: 9-24bp)). Sie sind meist G-reich und befinden sich häufig in der Nähe von Telomeren (Jefferys, 1987) und können mehrere Kilobasen (kb) lang sein.

3. Mikrosatelliten-DNA

Sie sind einfache Sequenzwiederholungen (*simple sequence repeats, SSR*; Wiederholungseinheit: 1-12bp), die am häufigsten als Dinukleotidwiederholungen vorkommen und über das gesamte Genom verstreut sind.

Tandemförmige, repetitive Sequenzen sind häufig an Chromosomenaberrationen durch Sequenzaustausch zwischen allelen und nicht allelen Sequenzen beteiligt. Solche Polymorphismen (*variable number of tandem repeat* (VNTR) Polymorphismen) sind häufig hochpolymorph und informativ. Die VNTR-Analyse in Mikro- und Minisatelliten hat eine wichtige Anwendung bei genetischen Untersuchungen (wie z. B. bei "DNA-Fingerprinting" und "Linkage-Analyse").

### **B: Verstreute repetitive, nicht-kodierende DNA-Sequenzen**

Sie werden in vier Klassen unterteilt:

1. SINEs (*short interspersed repeated elements*) (Alu-Familie, MIR-Familien)

Die SINE-Sequenzen sind etwa 100-400bp lang. Alu-Familie kommen zum Beispiel im menschlichen Genom etwa alle 4kb vor.

2. LINEs (*long interspersed repeated elements*)

Menschliche LINE-Sequenzen bilden drei verwandte Familien: (LINE-1, LINE-2 und LINE-3). Sie kommen im menschlichen Genom etwa alle 50kb vor.

3. LTR (*long terminal repeat*)-Elemente

4. DNA-Transposons

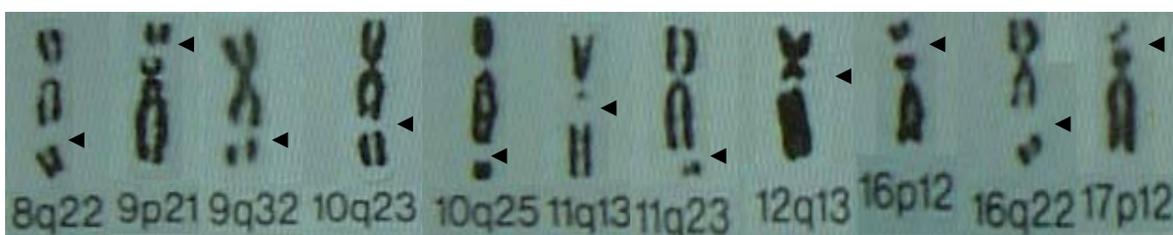
LTR und DNA-Transposons sind in mehrere Gruppen unterteilt und kommen im menschlichen Genom etwa 800,000 mal vor. Die Gruppe B macht damit ca. 46% des menschlichen Genoms aus (International Human Genome Project Sequencing Consortium 2001)

Diese Strukturelemente menschlicher Chromosomen lassen sich durch die GTG (*G-bands by trypsin using Giemsa*) Technik färberisch darstellen. Die GTG-Bänderung ist die Standardmethode für Chromosomenanalysen zur Erfassung numerischer und struktureller Aberrationen. Nach Inkubation der auf Objektträgern fixierten Chromosomen in Trypsinlösung erfolgt eine Inkubation mit Giemsalösung - dieser Farbstoff wird in die DNA des Chromatins gelagert. Die Chromosomen zeigen ein typisches Bandenmuster.  $G^{(+)}$ -Banden unterscheiden sich von  $G^{(-)}$ -Banden in Kondensation, dem Gengehalt und der zeitlichen Replikation (João et al., 1997; Sadoni et al., 1999). Die dunklen Banden ( $G^{(+)}$ ) sind spät replizierend und enthalten stark kondensiertes Chromatin, die hellen Banden ( $G^{(-)}$ ) dagegen sind früh replizierend und enthalten deutlich mehr Gene. Mit diesen konventionellen Bänderungstechniken lassen sich Chromosomenanalysen bis zu einer Auflösung von

ca. 5Mb im Lichtmikroskop erreichen. Für eine genauere strukturelle Chromosomenanalyse haben sich molekularzytogenetische Methoden bewährt, bei denen durch Fluoreszenz *In Situ* Hybridisierung (FISH-Technik: Harper und Saunders, 1981) fast jede Region der menschlichen Chromosomen darstellbar und analysierbar ist. Im Gegensatz zur konventionellen Zytogenetik ist mit der FISH-Methode eine chromosomale Strukturanalyse bis zu einer Auflösung von ca. 100kb möglich. Für die Herstellung geeigneter FISH-Sonden können fluoreszenzmarkierte BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*)-DNA verwendet werden. BACs dienen als Vektoren und erlauben im Gegensatz zu Cosmiden und Plasmiden die Klonierung von größeren Genomabschnitten von ca. 10 bis 300kb (Shizuya et al., 1992). BAC Bibliotheken enthalten überlappende Klone, die fast das gesamte menschliche Genom abdecken. Chromosomaberrationen wie Deletionen, Translokationen, Inversionen oder Ringchromosomen können durch geeignete spezifische BACs (als FISH-Sonden) untersucht werden, wenn deren genaue Position bekannt ist.

## 1.2 “Fragile Sites (FSs)“

FSs sind spezifische, instabile Regionen in Chromosomen, die unter bestimmten Kulturbedingungen häufiger brechen oder sich als färberische Fehlstellen in Metaphasen darstellen (Abbildung 1.1). FSs (ca. 125 beim Menschen; siehe Tabelle 8.1 und 8.2) sind auf den meisten Chromosomen zu finden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Update: 30.04.2009). Während das Chromosom 1 13 FSs aufweist, finden sich z.B. beim Chromosom 21 und Y-Chromosom keine.



**Abb. 1.1: Auswahl einiger FSs (Pfeile) an menschlichen Metaphasechromosomen**

FSs manifestieren sich in Form von Brüchen und lassen sich als ungefärbte Lücken darstellen. Giemsa-färbung, ohne Trypsin-Behandlung (modifiziert nach Sutherland G.R. und Hecht F., 1985).

Die meistens FSs lassen sich nur durch bestimmte Chemikalien in

Metaphasenchromosomen induzieren. Nach der Häufigkeit (nachgewiesen mit zytogenetischen Methoden) und den Kulturbedingungen werden FSs in zwei Hauptgruppen unterteilt: Common Fragile Sites (CFSs) und Rare Fragile Sites (RFSs) (Sutherland und Richards, 1995). Diese zwei Hauptgruppen werden nach der Induzierbarkeit mit verschiedenen Chemikalien in 6 Subgruppen unterschieden (Abbildung 1.2).

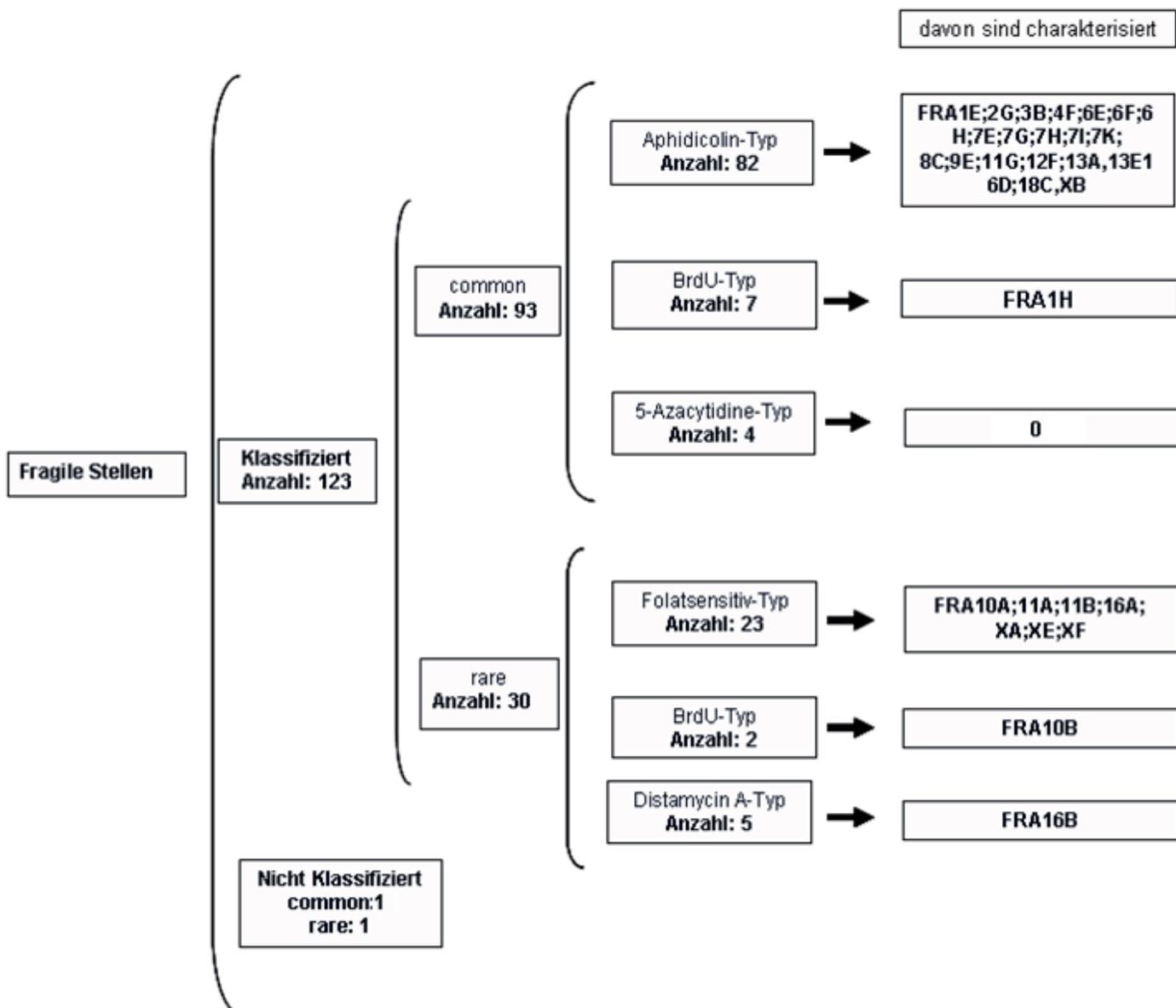


Abb. 1.2 Klassifizierung von FSs

### 1.2.1 "Common Fragile Sites (CFSs)"

Unter Standard-Kulturbedingungen zeigen CFSs in der Regel keine Brüchigkeit. Die meisten CFSs lassen sich bei Metaphasechromosomen durch Aphidicolin, eine Chemikalie, die die DNA-Polymerase  $\alpha$  und  $\delta$  partiell inhibiert, induzieren (Reidy, 1988). Die nach Aphidicolin-Behandlung auftretende Brüchigkeit wird auf Replikationsfehler, entstanden durch Replikationsstress zurückgeführt. Bei mindestens drei CFSs (FRA3B und FRA7H, FRA16D) wurde gezeigt, dass sie in der späten S-Phase replizieren (Le Beau et al., 1998; Wang et al., 1999; Helman et al., 2000, Palakodeti et al., 2004). CFSs sind kritische Stellen („hotspots“), die eine erhöhte SCE-Rate (*sister chromatid exchange*) aufweisen, was auf eine somatische DNA-Instabilität hinweist (Glover et al., 1987). Die Tumorsuppressorgene FHIT (*fragile histidine triad gene*) in FRA3B und WWOX (*WW domain containing oxidoreductase*) in FRA16D sind durch partielle Deletionen, Amplifikationen oder Translokationen in verschiedenen Krebsarten involviert (Druck et al., 1997; Dagmar et al., 1997; Mimori et al., 1999; Paige et al., 2000; Bednarek et al., 2000; Ludes-Meyers et al., 2003). Jeder Mensch hat eine bestimmte Anzahl von CFSs, die als Manifestationen auf den mütterlichen und väterlichen Chromosomen weitervererbt werden. CFSs wie andere FSs werden nach den Mendelschen Regel dominant vererbt, können aber zytogenetisch unterschiedliche Manifestationen aufweisen (Sutherland & Hecht, 1985). Trotz vieler molekulargenetischer und molekularzytogenetischer Befunde ist die biologische und evolutionäre Bedeutung der FSs bisher nicht vollständig verstanden. Die CFSs sind im humanen Genom unterschiedlich verteilt und umspannen verschieden große Regionen von FRA7H mit 160kb (Mishmar et al., 1998) bis FRA1H mit 10000kb (Curatolo et al., 2007). Wegen dieser Größenunterschiede der CFSs im humanen Genom (bis zum Megabasenbereich) ist ihre Klonierung nicht einfach. CFSs weisen keine speziellen Sequenzen auf, die man als Motif-Element erkennt. Bei einigen CFSs (FRA1H, FRA3B, FRA7H FRA16D, FRAXB) wurden relativ AT-reiche Abschnitte gefunden, in denen eine erhöhte DNA-Flexibilität vorliegt (Arlt et al., 2002; Curatolo et al., 2007; Mishmar et al., 1998; Ried et al., 2000; Zlotorynski et al., 2003). Von den bis jetzt bekannten 94 CFSs (siehe Tabelle 8.1) sind nur 22 (ca. 23%) molekulargenetisch oder molekularzytogenetisch charakterisiert.

## 1.2.2 "Rare Fragile Sites (RFSs)"

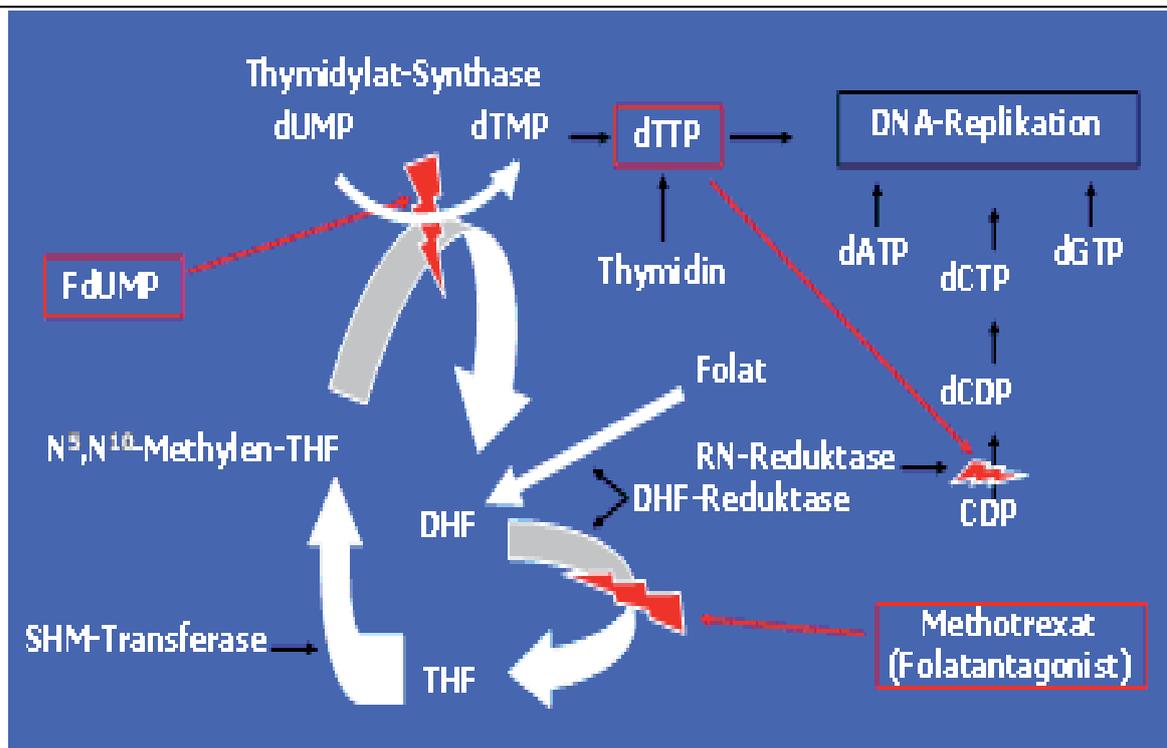
RFSs werden im Unterschied zu CFSs aufgrund ihrer chemisch unterschiedlichen Induzierbarkeit in eine Folat-sensitive und eine Nicht-Folat-sensitive Gruppe (Tabelle 1.1) unterteilt.

| Klassifikation von RFSs   | Folat-sensitive RFSs   |  | Nicht-Folat-sensitive RFSs          |                                  |
|---------------------------|--|--|-------------------------------------|----------------------------------|
|                           |  |  |                                     |                                  |
| <b>Chemikalien</b>        | Folsäureantagonisten<br>Methotrexat/<br>Aminopterin/<br>Trimethoprim |  | Distamycin A/<br>Berenil/DAPI       | BrdU                             |
| <b>Expandiertes Motiv</b> | (CCG oder CGG) <sub>n</sub>  |  | 33bp-<br>Minisatelliten<br>AT-reich | ~42bp-Minisatelliten<br>AT-reich |
| <b>Beispiele</b>          | FRAXA<br>(Xq27.3)  |  | FRA16B<br>(16q21)                   | FRA10B<br>(10q25.2)              |
| <b>Expansionslänge</b>    | 0.06-5,5Kb   |  | 10-70Kb                             | 5-100Kb                          |

Tab. 1.1: Klassifikation von RFSs aufgrund ihrer Manifestation durch unterschiedliche Chemikalien

### 1.2.2.1 Folat-sensitive Gruppe

RFSs der Folat-sensitiven Gruppe manifestieren sich in Metaphasechromosomen, wenn Folat-Mangel besteht oder ein Folsäureantagonist im Kulturmedium vorhanden ist. Folsäure (Folat oder Vitamin B<sub>9</sub>) ist der Vorläufer (eine oxidierte Stammform) von THF (Tetrahydrofolat), das in zwei Stufen zu aktivem Coenzym reduziert wird, welches später an der Synthese von dTMP (Desoxythymidinmonophosphat) und anschließend an der DNA-Replikation beteiligt ist (Abbildung 1.3). Ein Mangel an Folsäure führt unter anderem zu einem DNA-Replikationsstress und dementsprechend zu einer Manifestation von bestimmten RFSs. Chemikalien wie Methotrexat, Aminopterin und Trimethoprim sind DHF (Dihydrofolat)-Antagonisten, die kompetitiv an die Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) mit einer ca. 1000fach höheren Affinität als DHF selbst binden können (D. Voet & J. G. Voet, 2002).



**Abb. 1.3: Vereinfachte Darstellung der Rolle von Folsäure bei der DNA-Synthese**

Mangel an Folsäure kann durch Störung der DNA-Replikation (DNA-Replikationsstress) die Manifestation von Folat-sensitiven-RFSs auslösen. DHF: 7,8-Dihydrofolat, THF-Reduktase: Tetrahydrofolat-Reduktase, RN-Reduktase: Ribonukleotid-Reduktase, SHM-Transferase: Serin-Hydroxymethyl-Transferase, FdUMP: 5-Fluorodesoxyuridylat (modifiziert und vereinfacht nach Sutherland G.R. und Hecht F., 1985; Rooney D.E., 2001, und Voet D., J.G. 2002).

Von den 31 zytogenetisch bekannten RFSs (siehe Tabelle 8.2) sind bis jetzt nur 9 kloniert und molekulargenetisch untersucht (Tabelle 1.2) worden:

| RFSs   | Expansionseinheiten               | Referenzen   |
|--------|-----------------------------------|--|
| FRA10A | (CGG) <sub>n</sub>                | Sutherland 1979; Sarafidou et al., 2004  |
| FRA10B | ~42bp<br>AT-reiche Minisatelliten | Sutherland et al., 1980 und 1982; Hewett et al., 1998                                    |
| FRA11A | (CGG) <sub>n</sub>                | Debacker et al., 2007  |
| FRA11B | (CCG) <sub>n</sub>                | Voullaire et al., 1987; Jones et al., 2000   |
| FRA16A | (CCG) <sub>n</sub>                | Sutherland 1979; Nancarrow et al., 1994  |
| FRA16B | ~33bp<br>AT-reiche Minisatelliten | Magenis et al., 1970; Schmid et al., 1980 und 1986; Callen et al., 1993; Yu et al., 1997 |
| FRAXA  | (CGG/CCG) <sub>n</sub>            | Sutherland et al., 1977; Kremer et al., 1991; Verkerk et al., 1991; Yu et al., 1991      |
| FRAXE  | (CGG/CCG) <sub>n</sub>            | Sutherland und Baker 1992; Knight et al., 1993; Gecz et al., 1996                        |
| FRAXF  | (CGG) <sub>n</sub>                | Parrish et al., 1994; Ritchie et al., 1994   |

**Tab. 1.2: Übersicht zu 9 molekulargenetisch charakterisierten RFSs**

Bei allen bisher klonierten Folat-sensitiven RFSs findet sich eine Expansion der Mikrosatelliten-Repeats CCG oder CGG, die in der normalen Bevölkerung in einer Kopienzahlen von 4-50 vorliegen. Bei Trägern solcher RFSs können diese Mikrosatelliten-Repeats bis zu 1000mal expandiert sein. Im Gegensatz zu RFSs ohne Krankheitswert (z.B. FRA16B) finden sich bei einigen RFSs klinische Auffälligkeiten (Tabelle 1.3).

| Krankheiten | Lokalisation auf dem Chromosomen | Lokalisation am Gen | Repeat-Sequenz     | Stabile Repeatanzahl | Unstabile Repeatanzahl | Fragilität |
|-------------|----------------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|------------------------|------------|
| FRAXA       | Xq27.3                           | 5'UTR               | (CGG) <sub>n</sub> | 6-50                 | 50-1000+               | RFS        |
| FRAXE       | Xq28                             | Promotor            | (CCG) <sub>n</sub> | 6-25                 | 200+                   | RFS        |

**Tab. 1.3: Zwei Beispiele für expandierte Trinukleotid-Repeats mit Krankheitswert**

FRAXA: Fragiles X-Syndrom , FRAXE: Fragiles XE-Syndrom, RFS: rare fragile site (modifiziert nach Strachan & Read, 2004).

### 1.2.2.2 Nicht-Folat-sensitive Gruppe

Die Nicht-Folat-sensitive Gruppe wird aufgrund ihrer chemischen Induzierbarkeit in zwei Hauptgruppen (BrdU-Typ und Distamycin-A-Typ) unterteilt (Tabelle 1.1). Bis jetzt wurden nur FRA10B (BrdU-Typ) und FRA16B (Distamycin A-Typ) kloniert und charakterisiert. Sie haben sehr ähnliche Strukturen und bestehen aus expandierten AT-reichen Minisatelliten.

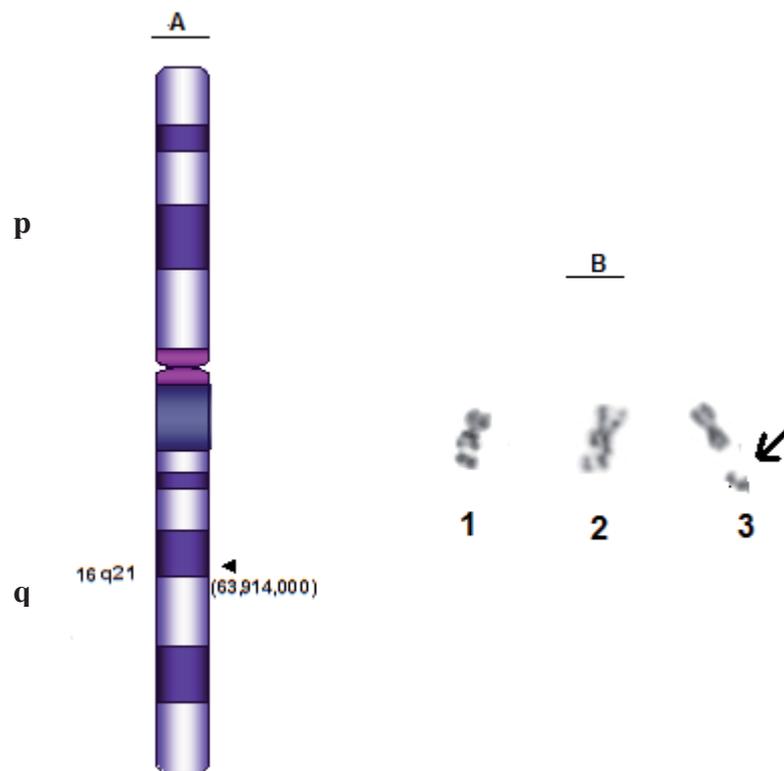
#### FRA10B

FRA10B ist durch BrdU induzierbar. BrdU ist ein Thymidin-Analogon, das bei der DNA-Replikation eingebaut wird (Drouin et al., 1997). FRA10B besteht aus expandierten AT-reichen Minisatelliten unterschiedlicher Länge (16-52bp), mit einer durchschnittlichen Länge von ~42bp (Tabelle 1.2). FRA10B-Allele sind hypervariabel und wurden in vier verschiedene Klassen unterteilt (Hewett et al. 1998): (kurz-normal, intermediär-normal, lang-normal und expandiert).

## **FRA16B**

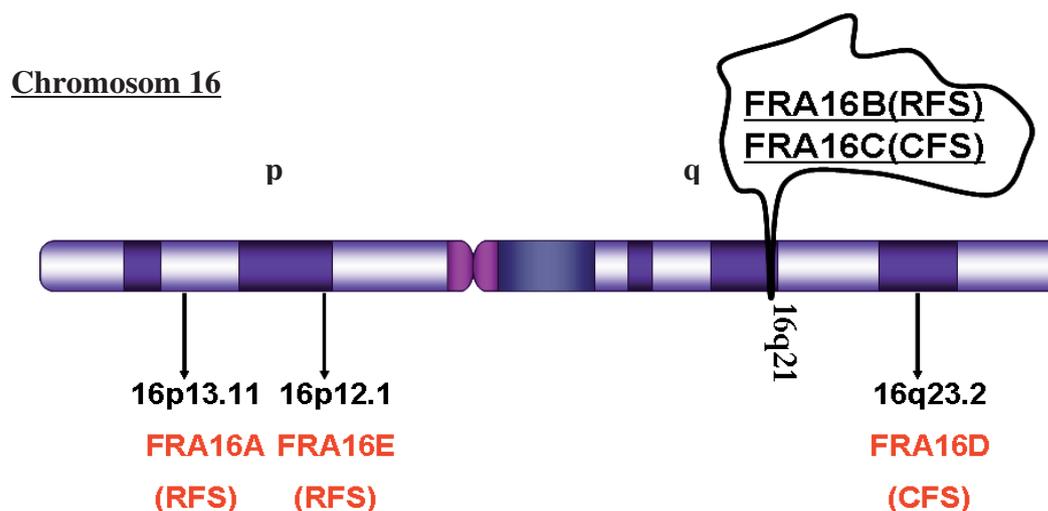
### **I. Zytogenetische Charakterisierung**

Über die Brüchigkeit im langen Arm des Chromosoms 16 (16q21) wurde bereits 1970 von Magenis et al. berichtet und als FRA16B zytogenetisch charakterisiert (Abbildung 1.4). FRA16B-Expression (bzw. FRA16B-Manifestation) kann spontan entstehen oder durch bestimmte Chemikalien wie Distamycin A induziert werden. Eine späte Replikation der FRA16B-Region, wie bei vielen anderen FSs, wurde bereits in der Literatur berichtet (Handt et al., 2000). Über eine Korrelation zwischen der spontanen Manifestation und der Expansionslänge der AT-reichen Minisatelliten ist bisher in der Literatur nichts bekannt. Ebenso wurde bisher keine Klassifizierung für FRA16B aufgrund der Locus-Expansion publiziert. Schmid et al. (1980) konnten zeigen, dass sich die Brüchigkeit in 16q21 bei Personen mit FRA16B durch Distamycin A, einem Oligopeptid-Antibiotikum erhöhen lässt. Auch mit anderen Chemikalien wie Berenil, Netropsin, Hoechst 33248, Methylgrün und DAPI lassen sich zytogenetische Brüche in 16q21 induzieren (Sutherland et al., 1984; Schmid et al., 1986). DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in der Fluoreszenzmikroskopie zur DNA-Kontrastierung benutzt wird. DAPI zeigt eine besonders hohe Affinität zu AT-reichen Regionen in der kleinen Furche der DNA (Pineda De Castro und Zacharias, 2002). In Zellen von FRA16B-Trägern lassen sich durch Einwirkung von DAPI bis zu 90% Brüche in 16q21 induzieren (Schmid et al., 1986).

Chromosom 16

**Abb. 1.4** A: Die Lokalisation von FRA16B liegt im Bereich 16q21 bei ca. 64,914,000. (nach <http://genome.cse.ucsc.edu>, HG18) B: Unterschiedliche chromosomale Manifestationen von FRA16B: 1: nicht-gefärbte Lücken, 2: Chromatidbruch, 3: Azentrisches Fragment (schwarzer Pfeil).

Auf Chromosom 16 sind außer FRA16B noch 4 weitere FSs bekannt (Abbildung 1.5). Eine weitere fragile Stelle, FRA16C liegt in derselben Region 16q21 (16q21=7,2MB) aber nicht an demselben Locus wie FRA16B. FRA16C lässt sich bei ihren Trägern nur durch Aphidicolin induzieren (Zlotorynski et al., 2003).



**Abb. 1.5:** Fragile Stellen auf Chromosom 16

## II. Molekulargenetische Charakterisierung

FRA16B wurde durch positionelle Klonierung charakterisiert (Yu et al., 1997). Sie besteht aus inhomogenen AT-reichen 33bp VNTR-Minisatelliten. In der europäischen Population gibt es von den hypervariablen 33bp AT-reichen Minisatelliten der FRA16B-Region normalerweise zwischen 7-12 Kopien (Abbildung 1.6). Die Kopienanzahl kann auf bis zu 2000 expandieren (Yu et al., 1997).

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1:ATATATTATATATTATATCTAATAATATATCTA        |                    |
| 2:ATATATTATATATTATATCTA TAATATATA          |                    |
| 3:ATATATTATATATTATATCTAATAATAT             |                    |
| 4:ATATATTATATATTATATCTAATAATATATA          |                    |
| 5:ATATATTATATATTATATCTAAT TAT              |                    |
| 6:ATATATTATATATTATATCTAATAAT               |                    |
| 7:ATATATTATATATTATATCTAATAATATAT           |                    |
| <u>ATATATTATATATTATATCTAATAATATATC/ATA</u> | ←(Konsensus Motiv) |
| Zusammensetzung: GC=4%, AT=96%             |                    |

**Abb. 1.6:** FRA16B-Expansion besteht aus sieben nicht perfekten tandem repetitiven Minisatelliten (26-33bp) auf Chromosom 16. Expandiertes Motiv: 33bp-Sequenz mit einem SNP (*single nucleotide polymorphism*) an Position 31 (modifiziert nach Yu et al., 1997).

## III. Häufigkeit (Populationsstudien)

Molekulargenetische Populationsstudien für die FRA16B-Region sind in der Literatur nicht bekannt. Die zytogenetischen Ergebnisse von Populationsstudien zu FRA16B sind nicht einheitlich. Unterschiede sind auf verschiedene eingesetzte AT-spezifisch bindende Chemikalien zur FRA16B-Induzierung und auf verschiedene untersuchte Populationen zurückzuführen. Sie variiert zwischen 1-5% in verschiedenen Populationen (Sanfilippo et al., 1983; Sutherland, 1985; Schmid et al., 1986). Schmid et al. (1986) fanden in Deutschland bei einem Kollektiv von 350 gesunden Personen nur 2 spontane FRA16B-Fälle (ca. 0,5%) und nach Induktion durch Zugabe von Berenil 17 Fälle (ca. 4,5%). Bei dieser Populationsstudie konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt werden. Damit ist FRA16B die häufigste vorkommende RFS beim Menschen. Bis dahin war FRA10B die häufigste vorkommende RFS mit einer Prävalenz 1:40 (2,5%) gewesen (Sutherland et al., 1982).

#### **IV. FRA16B und Assoziation mit klinischen Auffälligkeiten**

Die meisten heterozygoten und homozygoten FRA16B-Träger sind klinisch unauffällig (Schmid et al., 1980; Hocking et al., 1999). Ob die in einigen Publikationen postulierte Korrelation zwischen der Manifestation von FRA16B und klinischen Anomalien besteht, bleibt unklar (Shabtai et al., 1980 und 1983; Thestrup-Pedersen et al., 1980; Bettex et al., 1998; McKenzie et al., 2002).

### **1.3 Zielsetzung dieser Arbeit**

Individuen mit einer heterozygoten zytogenetisch induzierbaren FRA16B finden sich in europäischen Populationen mit einer Häufigkeit von ca. 5%; damit ist FRA16B die häufigste rare fragile site (RFS) (Felbor et al., 2003). Die zytogenetische Expression von FRA16B wurde seit 1970 mit konventionellen zytogenetischen Methoden mehrfach untersucht. Über molekulargenetische Analysen zum Vorkommen, zur Entstehung und zur Häufigkeit von FRA16B gibt es in der Literatur noch wenige Hinweise. Molekularzytogenetisch wurde FRA16B bisher nicht untersucht.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Nach etablierter Vorstellung zur Entstehung von Chromosomenaberrationen sind Chromosomenbrüche Ursache z.B. von terminalen Deletionen oder chromosomalen Rearrangements. Bei der zytogenetischen Analyse sind Strukturaberrationen im langen Arm des Chromosom 16 besonders schwierig darzustellen, da verschiedene FS in der 16q-Bande nahe beieinander liegen. Es sollte deshalb eine bessere Analysemöglichkeit zur spezifischen Identifizierung der FRA16B in Interphasen und Metaphasen etabliert werden. Dafür sollten Fluoreszenz-markierte FISH-DNA-Sonden der FRA16B-Region entwickelt werden.
- Zur intrafamiliären Analyse der FRA16B-Region standen mir zwei FRA16B-Familien zur Verfügung. In den Familien konnten Mutter und Tochter und Mutter und Sohn untersucht werden. Hier sollten zytogenetische Untersuchungen (Analyse zur FRA16B-Brüchigkeit) und molekulargenetische Analysen (Bestimmungen der FRA16B-Expansionslänge) durchgeführt und mit den Ergebnissen bei 6 FRA16B negativen Kontrollpersonen verglichen werden. Es sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen zunehmender FRA16B-Region Expansion und vermehrter zytogenetischer FRA16B-

Brüchigkeit untersucht werden. Dabei sollte auch überprüft werden, ob die FRA16B-Region ähnlich wie der FRAXA-Bereich (Fragiles X-Syndrom) intrafamiliär einer dynamischen Expansion unterliegen kann.

- Über die Verteilung unterschiedlicher Expansionslängen des FRA16B-Locus in der Bevölkerung ist nichts bekannt. Deshalb sollte zunächst an zwei Kollektiven (61 Kontrollen und 70 mental retardierte Personen) molekulargenetisch überprüft werden, wie häufig geringe, mittlere und hohe Expansionen des FRA16B-Locus in der Bevölkerung vorkommen und ob sich Kontrollen und mental retardierte Patienten unterscheiden. Diese Untersuchung sollte durch eine Southern-Blot Analyse erfolgen.
- Die FRA16B-Region besteht aus ca. 4,5kb mit mindestens 78% AT-Gehalt. Zentral gelegen befindet sich ein ca. 2kb großer Bereich mit mindestens 90% AT-Gehalt. Im letzten Teil dieser Dissertation sollte die charakteristische AT-Organisation der FRA16B Region mit anderen ähnlich aufgebauten Loci im menschlichen Genom verglichen werden. Für dieses Vorhaben sollten durch Entwicklung einer neuen bioinformatischen Software ähnliche Regionen im gesamten humanen Genom identifiziert werden. Dabei werden unter anderem folgende relevante Fragen gestellt:
  - ❖ Gibt es ähnliche Regionen mit gleicher AT-Organisation wie FRA16B im humanen Genom? Wenn ja, sind sie als FSs bekannt?
  - ❖ Besitzt die FRA16B-Region eine charakteristische Eigenschaft, die eine Expansion bewirkt?
  - ❖ Wie ist die Verteilung von diesen AT-reichen-Bereichen (>1kb) innerhalb der verschiedenen menschlichen Chromosomen und besteht eine Korrelation zwischen diesen Regionen und FSs?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

|                                 |                      |
|---------------------------------|----------------------|
| Agar                            | Difco                |
| Agarose                         | Biozym               |
| 2-Aminopurin                    | Merck                |
| Ammoniumacetat                  | Sigma                |
| Ammoniumbicarbonat              | Sigma                |
| Ammoniumchlorid                 | Sigma                |
| Berenil                         | Sigma                |
| Borsäure                        | Sigma                |
| Bromphenolblau                  | Merck                |
| Calciumchlorid                  | Merck                |
| Chang Medium D                  | Irvine Scientific    |
| Chloroform                      | Roth                 |
| DAPI                            | Oncor                |
| Dimethylsulphoxid (DMSO)        | Merck                |
| Dinatriumhydrogenphosphat       | Merck                |
| dNTPs                           | Amersham Biosciences |
| Essigsäure                      | Merck                |
| Ethanol                         | Merck                |
| Ethidiumbromid (EtBr)           | Merck                |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Merck                |
| Ficoll 400                      | Pharmacia            |
| Formaldehyd                     | Merck                |
| Glycerin, Wasserfrei            | Merck                |
| Hefeextrakt                     | Becton Dickinson     |
| Humane Cot-1 DNA                | Invitrogen           |
| Isopropanol                     | Merck                |
| Kaliumphosphat                  | Merck                |
| LMP-Agarose                     | Peqlab               |

|                                      |                  |
|--------------------------------------|------------------|
| Magnesiumchlorid                     | Merck            |
| Natriumacetat                        | Merck            |
| Natriumchlorid                       | Sigma            |
| Natriumcitrat                        | Sigma            |
| Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat | Merck            |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)           | Merck            |
| Natriumhydrogenphosphat Dihydrat     | Merck            |
| Natriumhydroxid                      | Roth             |
| NP-40                                | Roche            |
| Phenol/Chloroform                    | Merck            |
| Phenyl-Methyl-Sulfonylfluorid (PMSF) | Merck            |
| Proteinase K                         | Merck            |
| Rinderserumalbumin (BSA)             | Merck            |
| RNAse                                | Gibco            |
| RPMI 1640 Medium                     | Biochrom         |
| Salmon-Sperm-DNA                     | Sigma            |
| Salzsäure                            | Sigma            |
| Stabilisator-Mounting Lösung         | Vysis            |
| Tris Base                            | Sigma            |
| Trypton                              | Becton Dickinson |
| Tween 20                             | Sigma            |

### 2.1.2 Bakterien mit BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Klone

*Escherichia coli* Top DH10B mit BACs (als Vektoren: pBACe 3,6)

| Klon (BACs) | Locus       | Lab.-Bezeichnung |
|-------------|-------------|------------------|
| Rp11-256I9  | 16q21       | BAC-P            |
| Rp11-179E11 | 16q21-q22.1 | BAC-M            |
| Rp11-482M16 | 16q22.1     | BAC-D            |

## 2.1.3 Oligonukleotide

### 2.1.3.1 Oligonukleotide für radioaktive Marker:

**Radio-P-H-1 (Fwd):**

5'-ATG CCA ATG AAA TCA TGC TTA-3'

**Radio-P-R-1 (Rev):**

5'-AAG TTA GTG ATG AGC CTC AGT-3'

**Radio-P-H-2 (Fwd):**

5'-GAG GTC AGC CTC AGA TAT GTC-3'

**Radio-P-R-2 (Rev):**

5'-TTA AGA AAT GTA CAA ATT ATT-3'

**Radio-P-H-3 (Fwd):**

5'-AGA CAA AGA CTT TAA CGT AGA T-3'

**Radio-P-R-3 (Rev):**

5'-CCC ACT TGC CTG AGA GTT ATT A-3'

**Radio-P-H-4 (Fwd):**

5'-CCA TAG CCA CAT TGG AGA CTG-3'

**Radio-P-R-4 (Rev):**

5'-TAC TGT TCT TGT TCG AAA TAC C-3'

**Radio-P-H-5 (Fwd):**

5'-CTT GCC TTG AGT AAT AAT TAG-3'

**Radio-P-R-5 (Rev):**

5'-TCT GTG CCT CTC CAT TTC TTA-3'

**Radio-P-H-6 (Fwd):**

5'-GTC AAG AAG GCA AGG AGG TGT G-3'

**Radio-P-R-6 (Rev):**

5'-TCT CCA CCT TAT CTC TGT AGA-3'

**Radio-P-H-7 (Fwd):**

5'-AAC TCA CCC TGC CAA GAC GGA-3'

**Radio-P-R-7 (Rev):**

5'-CAG AGA GCC TAT AGG GCC TTC-3'

**Radio-P-H-8 (Fwd):**

5'-AGC AAC CCT ATG CAG GAA ATG-3'

**Radio-P-R-8 (Rev):**

5'-TCC CTT GCA AGA ATG TTT GCC-3'

**Radio-P-H-9 (Fwd): (H-2)**

5'-GAG GTC AGC CTC AGA TAT GTC-3'

**Radio-P-R-9 (Rev): (R-3)**

5'-CCC ACT TGC CTG AGA GTT ATT A-3'

**Radio-P-1500 (Fwd)**

5'-GCC AAA GAA GGC ATT AGA AAC-3'

**Radio-P-1500 (Rev)**

5'-TCT GGC AAG AAC AAC AAG TTC-3'

**2.1.3.2 Oligonukleotide für die STS-Analyse an Chromosome 16q**

**STS-1: D16S514**

**Fwd Primer:**

5'-CTATCCACTCACTTTCCAGG-3'

**Rev Primer:**

5'-TCCCACTGATCATCTTCTC-3'

**STS-2: D16S408**

**Fwd Primer:**

5'-CACTCTTATCCCAGGAACCC-3'

**Rev Primer:**

5'-TGTAACCTTGTGTGCATCCT-3'

**STS-3: D16S308**

**Fwd Primer:**

5'-CAGCCAGGGTAGTAAGGCTAGACCT-3'

**Rev Primer:**

5'-TGGGTGGCAGAGTGAGACCCTGTCT-3'

**STS-4: D16S320**

**Fwd Primer:**

5'-TGCGTGTGCGTGTGCGTG-3'

**Rev Primer:**

5'-CGAAGGCACATCTCCTAATC-3'

### 2.1.4 DNA-Größenmarker

|   |            |
|---|------------|
| 100bp DNA Ladder<br>(100bp, 200bp, 300bp,....., 1000bp)   | Invitrogen |
| Ready to Load 1kb-Leiter<br>(75bp, 134bp, 154bp, 201bp, 220bp, 298bp, 344bp, 396bp,<br>506bp, 1,018kb, 1,636kb, 2,036kb, 3,054kb, 4,072kb, 5,09kb,<br>6,108kb, 7,126kb, 8,144kb, 9,162kb, 10,18kb, 11,198kb,<br>12,216kb) | Invitrogen |
| Lambda DNA//Hind III<br>(564bp, 2027bp, 2322bp, 4361bp, 6557bp, 9416bp, 23130bp)  | Invitrogen |
| Lambda Ladder<br>(48, 5kb, 97kb, 145, 5kb, 194kb, 242kb,....., 1000kb)  | Bio-Rad    |
| Hefe-Marker ( <i>S. cerevisiae</i> )<br>(225kb, 285kb, 365kb, 450kb, 565kb, 610kb, 680kb, 750kb,<br>785kb, 825kb, 945kb, 1020kb, 1125kb, 1600kb, 2200kb)  | Bio-Rad    |

### 2.1.5 Enzyme

|   |            |
|---|------------|
| <i>AluI</i>                               | MP         |
| <i>Asp718I</i>                            | Roche      |
| <i>BamHI</i>                              | BioLabs    |
| <i>BglI</i>                               | Roche      |
| <i>BlnI</i>                               | BioLabs    |
| <i>BstEII</i>                             | BioLabs    |
| <i>EagI</i>                               | Biolabs    |
| <i>EcoRI</i>                              | Biolabs    |
| <i>EcoR91I</i> (Isoschizomer für BstE II) | Fermentas  |
| <i>HaeIII</i>                             | MP         |
| <i>HindIII</i>                            | Roche      |
| Klenow                                    | Amersham   |
| Proteinase K                              | Merk       |
| RNase A                                   | Roche      |
| Trypsin/EDTA                              | Cytogen    |
| <i>SacI</i>                               | Roche      |
| <i>SalI</i>                               | BioLabs    |
| Taq DNA Polymerase                        | Invitrogen |

### 2.1.6 Radioisotope

$\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP Hartmann Analytic

### 2.1.7 Membranen für Southern Blot

|                          |  |          |
|--------------------------|--|----------|
| Hybond <sup>TM</sup> -N+ | (für nicht-radioaktive Hybridisierung) | Amersham |
| Hybond <sup>TM</sup> -N  | (für radioaktive Hybridisierung)       | Amersham |
| Hybond <sup>TM</sup> -XL | (für radioaktive Hybridisierung)       | Amersham |

### 2.1.8 Röntgenfilme

Hyperfilm<sup>TM</sup> Amersham

### 2.1.9 Kulturmedien und Antibiotikallösungen für Bakterien (BAC-Klone) und humane Zellkultur

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| LB (Luria Bertani) Medium             | 10g Bacto Trypton<br>5g Bacto Yeast<br>10g NaCl<br>ad 1L ddH <sub>2</sub> O; autoklavieren<br>50µg/ml Chloramphenicol  |
| LB-Agar                               | 10g Bacto Trypton<br>5g Bacto Yeast<br>10g NaCl<br>1,5% Agar(w/v)<br>ad 1L ddH <sub>2</sub> O; autoklavieren<br>50µg/ml Chloramphenicol                                      |
| Chloramphenicol                       | 60mg/ml in 100%Etanol  |
| Standard-Kulturmedium für Lymphozyten | 90ml RPMI-Medium 1640<br>1ml Penicilin (100U/ml)/Streptomycin (100µg/ml)<br>10ml fötales Kälberserum (FCS)<br>1ml 100mM L-Glutamin<br>2,5ml 10mg/ml Phytohämagglutinin (PHA) |

|  |   |
|--|---|
| Standard-Kulturmedium für LCL-Zellen   | 100ml RPMI-Medium 1640<br>1ml Penicilin (100U/ml)/Streptomycin (100µg/ml)<br>10ml fötales Kälberserum (FKS)<br>1ml 100mM L-Glutamin |
| Standard-Kulturmedium für Fibroblasten | 90ml Chang Medium D<br>1ml Penicilin (100U/ml)/Streptomycin (100µg/ml)  |

### 2.1.10 Kits

|   |             |
|---|-------------|
| Markierungskit für direktes DNA-labelling (ULS)           | Q-Biogene   |
| DIG-Nick Translation Mix                                  | Roche       |
| BioNick™ Labeling System                                  | Invitrogen™ |
| WCP ( <i>Whole Chromosome Painting</i> ) für Chromosom 16 | Vysis       |
| GenClean  | Genetix     |
| Random-primed labelling kit                               | Amersham    |
| DNA-Aufreinigungskit                                      | Qiagen      |
| MLPA-Kit (SALSA P036 Human Telomer Testkits)              | MRC-Holland |

### 2.1.11 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt.

|   |  |
|---|--|
| Blocking-Lösung<br>(für indirekte Markierung, FISH)     | 5% BSA (gelöst in Waschlösung I)                   |
| Bromphenolblau-Lösung (gesättigt)                       | 200mg Bromphenolblau<br>in 10ml ddH <sub>2</sub> O |
| Church-Puffer   | 0.5M NaPi pH 7,2<br>7% SDS<br>5mM EDTA             |
| Denaturierungs-Lösung<br>(für direkte Markierung; FISH) | 70% Formamid<br>2xSSC                              |
| Denaturierungspuffer (für Southern-Blot)                | 1,5M NaCl<br>0,5M NaOH                             |
| Ethidiumbromid-Stammlösung                              | 10mg/ml in ddH <sub>2</sub> O                      |

|   |   |
|---|---|
| Fixierlösung                                  | Methanol:Essigsäure (3:1)   |
| Hybridisierungspuffer<br>(für FISH-Methode)   | 50% deionisiertes Formamid<br>2xSSC<br>10% Dextransulfat  |
| Hypotone Lösung (für Lymphozyten)             | 0,40% KCl   |
| Hypotone Lösung (für Fibroblasten)            | 0,20% KCl   |
| NaPi 1M , pH 6.5                              | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O 103,5g<br>NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O 29,5g<br>ad. 1L ddH <sub>2</sub> O |
| Neutralisierungspuffer<br>(für Southern-Blot) | 3M NaCl<br>0,5 Tris pH 7,0  |
| Plaque-Screen-Puffer                          | 1M NaCl<br>1g/l tetra Natriumdiphosphat<br>0,05M Tris/HCl pH 7,5<br>10ml/l Denhardt's Lösung 100x<br>1% SDS, 5mM EDTA                                 |
| Proteinase K-Stammlösung                      | 10mg/ml in H <sub>2</sub> O   |
| P1-Lösung (für Plasmidpräparation)            | 20% Glucose<br>1M Tris/Cl pH 8,0<br>0,5M EDTA   |
| P2-Lösung (für Plasmidpräparation)            | 0,2M NaOH<br>1% SDS   |
| P3-Lösung (für Plasmidpräparation)            | 3M KAcetat pH 5,5   |
| PBS 10X, pH 7,4                               | 1,38M NaCl<br>0,027M KCl<br>0,1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>0,017M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Autoklavieren)                           |
| RB- Lysispuffer                               | 1mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub><br>114mM NH <sub>4</sub> Cl  |
| Stopp-Puffer ( für FISH-Methode)              | 0,5M EDTA pH 8,0  |
| SSC (20x)                                     | 3M NaCl<br>0,3M NaCitrat pH 7,0   |
| TE (pH 7,5)                                   | 10mM Tris-HCl pH 8,0<br>1mM EDTA  |

|   |  |
|---|--|
| TBE (10x)   | 0,89M Tris-Base<br>0,89M Borsäure<br>25mM EDTA |
| Waschlösung I<br>(für direkte Markierung; FISH)               | 0,4xSSC<br>0,3% NP-40                          |
| Waschlösung II<br>(für direkte Markierung; FISH)              | 2xSSC<br>0,1% NP-40                            |
| Waschlösung I<br>(für indirekte Markierung; FISH)             | 2xSSC<br>0,2% Tween-20                         |
| Waschlösung II<br>(für indirekte Markierung; FISH)            | 0,05xSSC                                       |
| Waschlösung<br>(für PFGE, Southern-Blot, radioaktiv)          | 0,5xSSC<br>0,1% SDS                            |
| Waschlösung I (für PFGE, Southern-Blot,<br>nicht-radioaktiv)  | 2xSSC<br>0,1% SDS                              |
| Waschlösung II (für PFGE, Southern-Blot,<br>nicht-radioaktiv) | 1xSSC<br>0,1% SDS                              |
| Strip-Puffer<br>(für PFGE, Southern-Blot, radioaktiv)         | 0,1xTE<br>0,1% SDS                             |

### 2.1.12 Spezielle Bio-Software

|   |   |
|---|---|
| Isis (für FISH-Bildbearbeitung)           | Metasystem  |
| Ikaros (für Karyotypisierung)             | Metasystem  |
| Excel-Analyseprogramm des NGRM Manchester | MRC-Holland   |
| Repeatmasker-Programm (Version 3.2.7)     | <a href="http://genome.ucsc.edu">http://genome.ucsc.edu</a>                         |
| WebCutter 2                               | <a href="http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/">http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/</a> |

### 2.1.13 Geräte

|                         |               |
|-------------------------|---------------|
| PTC-100 (für PCR)       | Research, ING |
| Nano Drop (DNA-Messung) | Kisker        |
| CHEF-Gerät (für PFGE)   | Biorad        |
| Fluoreszenzmikroskop    | Zeiss         |

Phasenkontrast/ Durchlichtmikroskop

Zeiss

Sonifier

Branson

### 2.1.14 FRA16B-Träger und Kontrollpersonen

Einen Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Personen und Kollektive ist in Abbildung 2.1 grafisch dargestellt. Für die Charakterisierung der FRA16B-Expression bei FRA16B-Träger und Kontrollen wurde die Chemikalie DAPI eingesetzt (48h nach der Kultivierung). Aufgrund des immer verfügbaren frischen Blutes wurden konventionelle zytogenetische Vorversuche bei Proband 1 und den negativen Kontrollen 5 und 6 (NK5 und NK6) durchgeführt.

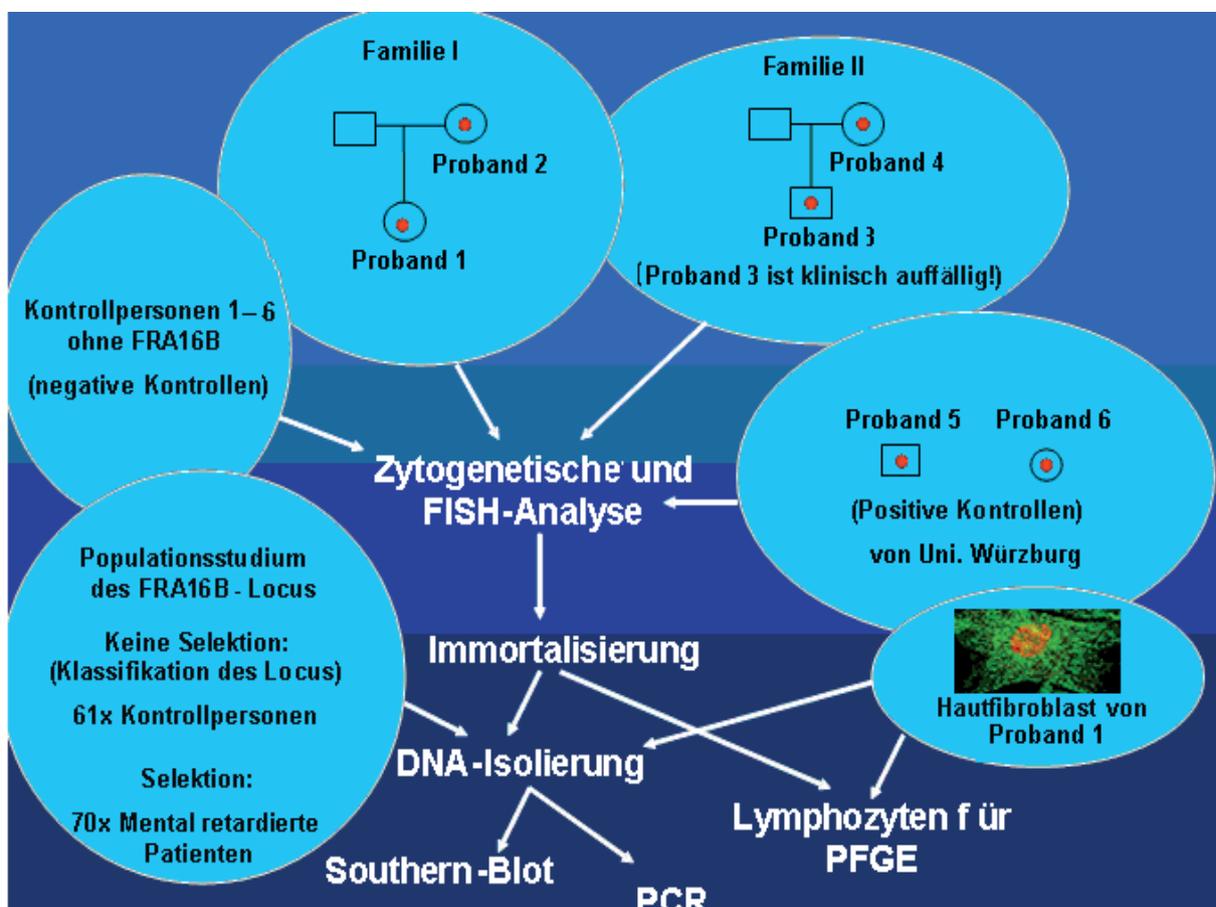


Abb. 2.1: In dieser Arbeit untersuchte Personen

In der Tabelle 2.1 sind die in dieser Arbeit untersuchten Personen aufgelistet.

| untersuchte Personen                     | Labor-Bezeichnung              |
|--|--------------------------------|
| FRA16B-Träger 1                          | Proband 1                      |
| FRA16B-Träger 2<br>(Mutter von Träger 1) | Proband 2                      |
| FRA16B-Träger 3                          | Proband 3 (klinisch auffällig) |
| FRA16B-Träger 4<br>(Mutter von Träger 3) | Proband 4                      |
| FRA16B-Träger 5<br>(Positivkontrolle)    | Proband 5                      |
| FRA16B-Träger 6<br>(Positivkontrollen)   | Proband 6                      |
| 6x FRA16B negativ-<br>Kontrollpersonen   | NK1-NK6                        |
| 61x Kontrollpersonen                     | K1-K61                         |
| 70x mental retardierten Patienten        | MRP1-MRP71                     |

**Tab. 2.1: Abgekürzte Bezeichnungen der untersuchten Personen**

Von den in dieser Arbeit untersuchten Probanden (FRA16B-Träger) war nur Proband 3 klinisch auffällig. Neben einer spontanen FRA16B-Expression zeigte er folgende Auffälligkeiten:

- Verzögerte motorische (Sitzen, Stehen und Laufen) und sprachliche Entwicklung
- Häufige Infekte
- Rundes Gesicht (Brachyzephalus), zurückgesetzte Augenpartie, horizontale Lidachsen, deszendierte Hoden (Genitalien sind ansonsten unauffällig), überlagerte Zehen, weitgesetzte Mamillen

Weitere Beobachtungen:

- Unauffällige neurologische und internistische Untersuchung
- Keine Zuordnung zu einer syndromalen Erkrankung
- Unauffällige Familiengeschichte

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung, Präparation und Darstellung der Chromosomen

In dieser Arbeit wurden für die Chromosomenanalyse peripheres Blut oder immortalisierte Zellen eingesetzt. *In vivo* enthalten nur Zellen des Knochenmarkes und des Chorions ausreichende Anteile mitotisch aktiver Zellen. Lymphozyten des peripheren Blutes werden durch Phytohämagglutinin (PHA) zur Zellteilung angeregt. 0.3-0.5ml Blut wird zu 5ml Kulturmedium gegeben. Die Kultur wird bei 5% CO<sub>2</sub>, 37°C und 8% Feuchtigkeit inkubiert. Nach 72h wird die Kultivierung durch Zugabe von 100µl eines Colchicin-Derivates (Colcemid) für 90 Minuten beendet.

Colcemid unterbricht die Mitose im Stadium der Metaphase, so dass es zu einer Anreicherung von Zellen in der Metaphase kommt. Die Präparation der Chromosomen beginnt mit einer Zentrifugation der Kultur für 10 min bei 1000 rpm und der anschließenden Aufnahme des Zellsediments in leicht hypotoner Lösung. Nach Inkubation für ca. 20 min bei 37° C wird erneut zentrifugiert (10 min bei 1000 rpm). Anschließend wird das Zellsediment in Fixativ aufgenommen. Die Fixierlösung besteht aus einem Gemisch von Methanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1. Das Fixativ wird nach anschließender Zentrifugation 2-3-mal gewechselt. Danach können die fixierten Zellen in eine Pipette aufgenommen und auf einen Objektträger aufgetropft werden. Beim Auftropfen platzen die Zellen, die sich in der Metaphase befinden und Chromosomen haften in mehr oder weniger gespreiteter Form auf dem Objektträger. Diese Objektträger lassen sich für das Chromosomenuntersuchen oder für FISH-Analyse verwenden (Rooney, 2001).

Alle Experimente, bei denen der Einfluss einer unabhängigen Größe auf den mitotischen Index (die Anzahl der Metaphasen in 1000 Lymphozyten) bzw. Chromosomenbrüchigkeit untersucht wurde (Abbildungen 3.1-3.2 und 3.4-3.7), wurden mit der Methode der linearen Regression statistisch analysiert (von Dipl.-Ing. Manfred Beier). Dabei wurden, soweit beteiligt, die Regressionsgeraden von Kontrollen und Probanden miteinander verglichen (t-Test), sowie in allen Fällen für die gepoolten Daten die Steigung der Regressionsgeraden hinsichtlich ihres Abweichens von Null getestet. Für alle Tests wurde als Signifikanzniveau der übliche Wert von  $\alpha = 0,05$  gewählt.

### 2.2.2 GTG-Technik

Nach dem Auftropfen werden die Objektträger für eine Stunde bei 60°C im Wärmeschrank gealtert. Nach einer Vorbehandlung in Trypsinlösung (3-5 sec) oder ohne Vorbehandlung mit Trypsin und anschließendem Waschen in Pufferlösung werden die Objektträger für ca. 6-8 min in 6%-Giemsa-Lösung gefärbt. Nach kurzem Waschen in destilliertem Wasser werden sie getrocknet und mit einem Deckglas und Einschlussmittel als Dauerpräparat eingedeckt.

### 2.2.3 DNA-Isolierung aus peripherem Blut, Lymphozyten-Sediment und Fibroblasten

Mit Hilfe des Qiagen Blood Midi Kits wird aus 5ml peripherem Blut ca. 100-150µg DNA isoliert. Aus ca.  $5 \cdot 10^6$  Hautfibroblasten werden ca. 50-100µg DNA isoliert.

### 2.2.4 DNA-Isolierung aus Bakterien

#### 2.2.4.1 BAC-Klonierungsvektor

Das gesamte menschliche Genom umfasst bei enger Überlappung mehr als 96000 Einzelklone (z.B. CTC BAC-Bibliothek aus humanen Spermien oder RP11 BAC-Bibliothek aus männlichen Lymphozyten). Es besteht die Möglichkeit, fast jede beliebige Genomregion zu untersuchen (<http://genome.cse.ucsc.edu> oder <http://www.ensembl.org/index.html>) und mit Hilfe von BAC-DNA geeignete FISH-Sonden herzustellen. BACs enthalten nur wenig Replikone pro Zelle, wie etwa den Fertilitäts- oder F-Faktor von *E.coli*. Die Klonierungsvektoren sind normalerweise sehr stabil und werden bei der Zellteilung wie das Bakteriengenom repliziert. Bei dieser Arbeit sind RP11 BACs, im pBACe3.6-Vektor, verwendet worden.

#### 2.2.4.2 Plasmid-DNA-Isolierung („Mini Präparation“)

Die *E.coli*-Bakterien aus den Glycerinstocks wurden auf Agarplatten (mit entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde mit einer Einmal-Impföse in 25ml LB-Medium, das Chloramphenicol enthält, überführt. Die Bakterien wurden 16-24 Stunden im Schüttelinkubator bei 37°C und 180rpm inkubiert. Um einen neuen Glycerinstock

anzulegen, wurden von der Bakteriensuspension 1200µl abgenommen, mit 800µl reinem Glycerin vermischt und eingefroren. Die restliche Lösung wurde bei 4000rpm bei 10°C für 10min zentrifugiert. Das verbliebene Pellet wurde mit 600µl P1-Lösung versetzt. Durch langsames Auf- und Abpipettieren wurde das Pellet vollständig resuspendiert und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 1800µl P2-Lösung zugegeben und vorsichtig durch Schwenken gemischt. Das Röhrchen wurde 5min auf Eis gestellt, dann wurden 1500µl P3-Lösung zugegeben und wieder vorsichtig gemischt bis die Lösung ausflockt. Nach 5min auf Eis wurden die Röhrchen 30min bei 4000rpm und 10°C zentrifugiert. Der Überstand aus den zentrifugierten Röhrchen wurde in die neuen 15ml-Röhrchen überführt und durch Schütteln vermischt. Nach 15min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Suspension 30min bei 10°C und 4000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das Pellet im Röhrchen getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden in 300µl TE-Puffer vollständig gelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Es wurden 300µl 4M Ammoniumacetat zugegeben, gründlich gemischt und 10min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße 10min bei 12000rpm zentrifugiert. Der zentrifugierte Überstand wurde daraufhin mit 360µl Isopropanol in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, gut geschüttelt, 10min auf Eis gestellt und 20min bei 12000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 300µl Ethanol 85% gewaschen und 5min bei 12000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde sauber und möglichst vollständig abgesaugt und das Pellet getrocknet, bis es durchsichtig oder zumindest nur noch ganz leicht weißlich war. Mit 20µl TE-Puffer wurde das Pellet resuspendiert und über Nacht im Kühlschrank gelöst. Um die DNA von RNA zu befreien, wurde am folgenden Tag ein RNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurden für je 10µl Probe 1,5µl RNase A zugegeben, und bei 37°C 30min inkubiert. 2µl der Lösung wird auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen und die DNA-Konzentration mit Hilfe des λ-HindIII-Markers gemessen. In der Regel lag die Ausbeute der DNA bei 80-120ng/µl.

### 2.2.5 FISH

Während die Chromosomenanalyse einen Gesamtüberblick über alle im Lichtmikroskop erkennbaren Chromosomenaberrationen gibt, können mit Hilfe der FISH (*Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung*)-Analyse auch submikroskopische Veränderungen nachgewiesen werden. Der weitere Vorteil der FISH-Methode

gegenüber der konventionellen Zytogenetik liegt darin, dass Interphasekerne in Gewebe und Lymphozyten analysiert werden können. Die FISH-Sonden können von genomischen Klonen wie Cosmiden, *BACs* (*bacterial artificial chromosomes*) oder *YACs* (*yeast artificial chromosomes*) hergestellt werden, die mit Fluorochromen markiert werden. Die optimale Länge einer Sonde für eine *In-Situ*-Hybridisierung beträgt 100-300bp. Bei nichtradioaktiver FISH lassen sich die Nukleinsäuren mit unterschiedlichen Methoden direkt oder indirekt markieren.

### 2.2.5.1 Herstellung der eigenen FISH-Sonden

#### Direkte Markierung

Hierbei werden die DNA-Fragmente chemisch direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff anhand eines ULS-Kits (ULS<sup>®</sup>: *universal linkage system* von Q-Biogene) markiert.

#### **Durchführung des Versuchs:**

Die gewonnene DNA aus BACs gelöst in 200µl TE-Lösung wurde zur Proteinentfernung in SST-Röhrchen überführt und mit 1ml Phenol und Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und gemischt. Anschließend wurden sie für 10min bei 2500rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von jeweils 2ml reinem Chloroform wurde 5min gut gemischt, um die Reste von Phenol zu entfernen. Anschließend wurden sie für 10min bei 2500rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und sonifiziert (Sonifier der Firma Branson, *output-control* 30, *Duty Cycle* 30 und *plused* kontinuierlich, 3min bei Intensität 1,5). Durch die Beschallung wurde die DNA in kleinere Fragmente zerlegt. Die optimale Länge für die DNA-Fragmente liegt zwischen 100-300bp. Nach der Sonifikation wurden 10µl DNA-Lösung auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen, um die Länge der DNA-Fragmente zu kontrollieren. Waren die DNA-Fragmente zu groß, dann wurden sie für weitere 30 sek beschallt bis sie die gewünschte Länge erreicht haben. Für die Reinigung von DNA-Lösungen wurden Säulen der Firma GenClean eingesetzt. Diese Säulen besitzen einen Molekularsiebeffekt, der für die Abtrennung von bestimmten Verunreinigungen (wie Oligonukleotide, RNA, Proteine usw.) der DNA optimal ist.

1µg gereinigte DNA wurde nach der Vorschrift des ULS-Kits direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Der in TE gelösten markierten DNA wurde zunächst Lachs-DNA (40µg), sowie Cot-1 (16µg) zugegeben. Anschließend wurde die DNA mit 1/10 Vol Na-Acetat pH 5,2 und Alkohol (5xVol) präzipitiert. Das Gemisch wurde

für 20min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Sediment wurde für ca. 10min bei RT getrocknet und in 40µl Hybridisierungspuffer resuspendiert. In der Regel geht man davon aus, dass ca. 250ng markierte DNA-Sonde für die Hybridisierung der DNA-Zielregionen auf einem Objektträger ausreichend ist. Die markierte DNA, gelöst in Hybridisierungspuffer, kann nun direkt für die FISH verwendet werden. Die Präparate (Objektträger), die sowohl die Metaphasechromosomen als auch die Interphasekerne enthalten, werden für 24h bei Raumtemperatur inkubiert (Alterung). Danach wurden sie zuerst in einer Alkoholreihe (70%, 85%, 100%) für jeweils 10min bei RT behandelt. Anschließend wurden sie bei -20°C in 100% Ethanol gelagert. Vor dem Beginn des Versuches wird der Objektträger zuerst bei RT getrocknet und nach Zugabe von 200µl Denaturierungslösung für 5min bei 75°C erhitzt. Anschließend wurde er noch einmal mit einer eisgekühlten Alkoholreihe behandelt. Nun wurden 10µl von der gelösten markierten DNA mit kompetitiver DNA für 5min bei 75°C denaturiert und auf den getrockneten Objektträger gebracht. Mittels Deckglas wurde die Hybridisierungsstelle vorsichtig abgedeckt und nach der Abdichtung der Deckglasränder mit Fixogum, erneut für 1.5min bei 75°C erhitzt (Co-Denaturierung). Das Präparat wurde für 12-18h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde das Deckglas vorsichtig entfernt. Der Objektträger wurde zuerst für 3min mit Waschlösung I bei 75°C und für 1min mit Waschlösung II bei RT gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde auf den Objektträger vorsichtig 10µl DAPI-Farblösung (5µg/µl) getropft und mit einem Deckglas bedeckt. Das Präparat wurde getrocknet und unter dem Fluoreszenzmikroskop weiter analysiert.

### **Indirekte Markierung**

Die gewonnene DNA aus BACs lässt sich auch durch verschiedene indirekte Methoden mit Fluoreszenzfarbstoffen markieren. Die Methode der Nick-Translation (Rigby et al., 1977) basiert darauf, dass DNase I in Anwesenheit von Mg<sup>2+</sup>-Ionen Einzelstrangbrüche (*nicks*) in beiden Seiten des DNA-Doppelstranges einführt, so dass eine 3'-OH-Gruppe freigelegt wird. Die 5'→3' Exonucleaseaktivität der DNA-Polymerase I entfernt 3' vom Einzelstrangbruch gelegene Nukleotide. Gleichzeitig benutzt die *E.coli* DNA-Polymerase I das 3'-OH- Ende dieser „*nicks*“ als Primer für die 5'-3'-DNA-Synthese, komplementär zum intakten Strang. Durch die gemeinsame Wirkung von Exonuclease- und Polymeraseaktivität der DNA-Polymerase I entsteht in 5'→3' Richtung ein neuer DNA-Strang. Indem man markierte dNTPs (Biotin-16-

dUTP oder Digoxigenin-11-dUTP) in die Nukleotidmischung gibt, markiert man die neuen Komplementärstränge. Der Nachweis erfolgt durch indirekte Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen. Biotin wird nachgewiesen durch Avidin, an welches der Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 3 (Cy3, rot) gebunden ist. Digoxigenin (DIG) wird nachgewiesen durch einen Anti-Dig-Antikörper, an dem der Farbstoff Fluorescein (grün) gebunden ist.

### Durchführung des Versuches:

#### I: Markierung der Sonde

##### Biotinmarkierung:

- Wasserbad mit 15°C vorbereiten
- Pro Markierungsansatz:

5µl dNTP-Puffer

5µl Enzym-Mix (DNA-Polymerase+DNaseI)

1µg DNA

-----

ad 50µl ddH<sub>2</sub>O

- Für 120min im vorbereiteten Wasserbad inkubieren, danach Reaktion auf Eis vorübergehend stoppen
- 3µl auf ein 1%iges Agarosegel auftragen, falls notwendig weiter inkubieren (optimale DNA-Fragmentlänge: 300-500bp)
- Ist die gewünschte Fragmentgröße erreicht, Reaktion der gesamten, auf Eis stehenden, Probe mit Stopp-Puffer beenden.
- Bei -20°C lagern.

##### Digoxigenin-Markierung

- Wasserbad mit 15°C vorbereiten
- Pro Markierungsansatz:

4µl DIG-Markierung (Enzym-Mix+dNTPs)

1µg DNA(Xµl)

-----

ad 20µl ddH<sub>2</sub>O

- Für 120min im vorbereiteten Wasserbad inkubieren, danach Reaktion auf Eis vorübergehend stoppen
- 3µl auf ein 1%iges Agarosegel auftragen, falls notwendig weiter inkubieren (optimale DNA-Fragmentenlänge: 300-500bp)
- Ist die gewünschte Fragmentgröße erreicht, Reaktion der gesamten, auf Eis stehenden, Probe durch Zugabe von Stopp-Puffer und Inkubation für 10min bei 65°C beenden
- Bei -20°C lagern.

### II: Fällung und Hybridisierung

- Nun werden die beiden unterschiedlich markierten DNA-Sonden gemischt und präzipitiert:

50µl Biotin-Sonden  
20µl DIG-Nick-Sonden  
40µl Lachssperma-DNA  
50µl Cot-1-DNA  
16µl 3M Natriumacetat PH 5,2 (1/10 V)  
500µl 100 %iges EtOH

-----  
Total: 676µl

- Nach der DNA-Präzipitierung wird das Sondengemisch in 50µl Hybridisierungspuffer aufgenommen
- Für jeden FISH-Versuch wird zwischen 5-10µl (100-250ng markierte DNA) eingesetzt werden (Hybridisierung wie bei direkt markierten DNA-Sonden)

### III: Nachweis und Waschen

- Waschlösung I auf 37°C und Waschlösung II auf 42°C vorwärmen
- Fixogum und Deckglas mit Pinzette abnehmen und FISH-Präparat bei 37°C 3x5min in Waschlösung I waschen, gelegentlich schütteln
- Danach 3x 5 min bei 42°C in Waschlösung II waschen und gelegentlich schütteln
- Auf das Präparat 200µl Blocking-Lösung geben, großes Deckglas auflegen und 30min bei 37°C inkubieren und danach die Lösung abtropfen lassen

- Master Mix pro Präparat ansetzen:
  - 150µl Blocking-Lösung
  - 0,2µl AvidinCy3
  - 1µl anti-DIG-Antikörper
- 150µl des Master-Mixes auf die Präparate pipettieren, großes Deckglas auflegen und 60min lichtgeschützt bei 37°C inkubieren
- Präparate 3x5min bei 37°C in vorgewärmter Waschlösung I waschen
- DAPI-Lösung/Master Mix/pro Präparat herstellen:
  - 3,3ml Waschlösung I
  - 1µl DAPI (lichtempfindlich)
- Präparate mit 0,5ml DAPI-Master Mix für 3 min lichtgeschützt inkubieren
- 3x mit jeweils ddH<sub>2</sub>O in Küvette spülen, trocknen lassen und auf jeden Objektträger einen Tropfen Stabilisator-Mounting Lösung geben und ein großes Deckglas auflegen

#### **2.2.5.2 FISH mit WCP 16 (Vysis Kit)**

Eine besondere und viel gebrauchte Form von *single copy* Sequenz-Sonden sind die *whole chromosome paints* (WCP), die das ganze Chromosom markieren. Damit lassen sich Chromosomenrearrangements, wie intrachromosomale Mikrotranslokationen nachweisen, die mit konventioneller Zytogenetik nicht zu detektieren sind.

#### **Durchführung des Versuches:**

- 5µl WCP Sonde mit 7µl Puffer und 0,5µl ddH<sub>2</sub>O in einem Eppendorfgefäß mischen (nach Vorschrift der Firma Vysis)
- Hybridisierung und Waschen erfolgt wie nach den Vorschriften der direkt markierten DNA-Sonden

#### **2.2.5.3 FISH mit Subtelomersonden für Chromosom 16**

Die Subtelomerregionen der Chromosomen besitzen eine hohe Dichte von Genen. Chromosomale Aberrationen in diesen Regionen sind schwer mit der konventionellen Chromosomenanalyse festzustellen, da die G-Banden meist negativ sind. Die FISH-Methode ist für die Analyse dieser Regionen gut geeignet. Die angesetzten Vysis DNA-Proben für die Subtelomerregionen haben eine Länge von ca. 60-175kb mit einem Abstand von 100-300kb zum Telomer.

### **Durchführung des Versuches:**

- 1,5µl Sonde mit 3µl Puffer und 0,5µl ddH<sub>2</sub>O in einem Eppendorfgefäß mischen (nach Vorschrift der Firma Vysis)
- Hybridisierung und Waschen erfolgt nach den Vorschriften der direkt markierten DNA-Sonden

#### **2.2.5.4 FISH an isolierten Fibroblasten aus Haut**

Eine zu den Lymphozyten alternative Möglichkeit für zytogenetische Untersuchungen bieten z.B. Fibroblasten. Eine somatische Stabilisierung der Chromosomenaberrationen lässt sich durch Analyse eines anderen Gewebes, wie z.B. Fibroblasten, verfolgen. Zur Analyse von Hautfibroblasten wurde von Proband 1 unter sterilen Bedingungen eine Hautbiopsie von 3mm Durchmesser am Oberarm mittels einer sterilen Hautstanze entnommen; die Hautbiopsie wurde in Chang D Medium überführt und mit einem sterilen Skalpell in Hautstückchen von ½mm Kantenlänge zerschnitten. Diese Hautstückchen wurden dann unter einem Glasdeckgläschen in Plastikgewebekulturflaschen fixiert und mit Chang D Medium kultiviert. Nach 7 Tagen wurde der um die Hautstückchen entstandene Fibroblasten-Monolayer mit Trypsin/EDTA abgelöst, und die Zellen subkultiviert. Die Fibroblasten standen dann für zytogenetische, molekularzytogenetische und molekulargenetische Untersuchungen zur Verfügung.

#### **2.2.5.5 FISH an G<sub>0</sub>-Lymphozyten**

Bestimmte Chromosomenaberrationen lassen sich durch die Kulturbedingungen selektiv beeinflussen. Deshalb ist es wichtig, dass man neben der Untersuchung von kultivierten Lymphozyten auch die nicht kultivierten G<sub>0</sub>-Lymphozyten untersucht. Dafür wurde 1ml, in Heparin aufgenommenes peripheres Blut, nach Behandlung mit einer leicht hypotonen Lösung für ca. 20min bei 37°C, für 10min bei 1000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in Fixativ aufgenommen und auf einen Objektträger getropft. Der Objektträger wurde bei RT für 24h gealtert und nach Behandlung mit einer Alkoholreihe in 100% Ethanol bei -20°C gelagert.

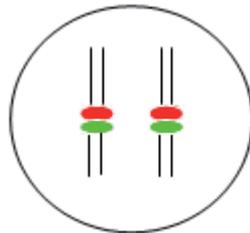
#### **2.2.5.6 Grundlage der FISH-Analyse in dieser Arbeit**

Bei FISH-Analysen in dieser Arbeit wurden die FISH-Signale von Chromatiden oder Chromosomen analysiert und differenziell ausgewertet. Rote und grüne Signale flankieren proximal bzw. distal die FRA16B-Region. Bei der Auswertung wurden

immer 100 Interphasekerne in der G<sub>0</sub>-Phase und 50 Interphasekerne in der Standardkultivierung mit oder ohne zusätzlichen Chemikalieneinsatz ausgewertet. Außerdem wurden immer 50 Metaphasen unter Standardbedingungen ausgewertet. Bei der FISH-Analyse müssen die folgenden Hinweise berücksichtigt werden:

### 1. G<sub>0</sub> und G<sub>1</sub>-Phasen

Hier liegt die DNA diploid vor (2n). Jede Zelle enthält jeweils ein Chromosom von den Eltern (homologe Chromosomen). FISH-Signale sind in der Regel Chromosomensignale, können aber manchmal gespalten werden, was man als Chromatidensignale bezeichnet. Die Chromosomen-FISH-Signale weisen meistens ein einheitliches Signal auf, das beide Schwesterchromatiden repräsentiert (Abbildung 2.2).

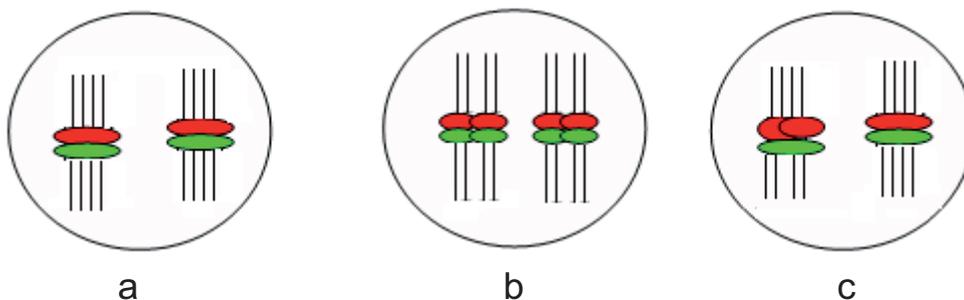


**Abb. 2.2: Homologe Chromosomen 16 in der G<sub>0</sub>- bzw. in der G<sub>1</sub>-Phase**

Rote und grüne Signale flankieren proximal bzw. distal die FRA16B-Region (Chromosomensignale).

### 2. S-, G<sub>2</sub>- und Metaphasen

Ab dem Ende der S-Phase bis hin zur Anaphase ist der DNA-Gehalt 4fach (4n) und die Chromosomen liegen verdoppelt vor. Die Schwester-Chromatiden liegen in der Regel nebeneinander und die Signale werden entweder als einzelne Chromatid-Signale (2.3b) oder, falls die Chromatiden dicht beieinander liegen, als Chromosomensignale (2.3a) gesehen (Abbildung 2.3a-c).



**Abb. 2.3a-c: Unterschiedliche FISH-Signale der 16q21-Region**

Die Rot-Grün-Signale liegen im Normalfall zusammen. Sie können als Chromosomensignale (a) oder Chromatidensignale (b) oder gemischt zu sehen sein (c). Rote und grüne Signale entsprechen Proben, die die FRA16B-Region proximal bzw. distal flankieren.

## 2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in-vitro*-Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente, die zwischen zwei bekannten Oligonukelotid-Primern liegen.

### 2.2.6.1 PCR-Bedingungen für radioaktive Marker 1,3,4,6,8 und 9 (siehe Abbildung 2.5)

Ansatz:

|             |                   |
|-------------|-------------------|
| 100ng       | genomische DNA    |
| 1,5mM /3*mM | MgCl <sub>2</sub> |
| 0,4mM       | dNTPs             |
| 1x          | Reaktionspuffer   |
| 10pM        | Primer H          |
| 10pM        | Primer R          |
| 49,5ml      | H <sub>2</sub> O  |
| 0,5µl       | DNA-Polymerase    |

Programm:

| Schritte  | Temperatur | Dauer |
|-----------|------------|-------|
| 1         | 94°C       | 5min  |
| 2         | 94°C       | 1min  |
| 3         | 55°C       | 1min  |
| 4         | 72°C       | 1min  |
| 5 2→4 x35 |            |       |
| 6         | 72°C       | 10min |
| 7         | 4°C        | ∞     |

\* 3mM wurde später nur für Marker 1 verwendet.

### 2.2.6.2 PCR-Bedingungen für radioaktive Marker 2 und 5

Ansatz:

|        |                   |
|--------|-------------------|
| 100ng  | genomische DNA    |
| 1,5mM  | MgCl <sub>2</sub> |
| 0,4mM  | dNTPs             |
| 1x     | Reaktionspuffer   |
| 10pM   | Primer H          |
| 10pM   | Primer R          |
| 49,5ml | H <sub>2</sub> O  |
| 0,5µl  | DNA-Polymerase    |

Programm:

| Schritte | Temperatur | Dauer |
|----------|------------|-------|
| 1        | 94°C       | 5min  |
| 2        | 94°C       | 1min  |

|           |      |        |
|-----------|------|--------|
| 3         | 50°C | 1,5min |
| 4         | 72°C | 1min   |
| 5 2→4 x35 |      |        |
| 6         | 72°C | 10min  |
| 7         | 4°C  | ∞      |

### 2.2.6.3 PCR-Bedingungen für nicht-radioaktive 1500bp Marker

Ansatz:

|        |                   |
|--------|-------------------|
| 100ng  | genomische DNA    |
| 1,5mM  | MgCl <sub>2</sub> |
| 0,5mM  | dNTPs             |
| 1,5mol | Dig-11-dUTPs      |
| 10pM   | Primer H          |
| 10pM   | Primer R          |
| 1x     | Reaktionspuffer   |
| 49,5ml | H <sub>2</sub> O  |
| 0,6µl  | DNA-Polymerase    |

Programm:

| Schritte  | Temperatur | Dauer   |
|-----------|------------|---------|
| 1         | 94°C       | 2min    |
| 2         | 94°C       | 1min    |
| 3         | 62°C       | 1min    |
| 4         | 72°C       | 1,15min |
| 5 2→4 x35 |            |         |
| 6         | 72°C       | 10min   |
| 7         | 4°C        | ∞       |

### 2.2.7 Dot-Blot

Um eine geeignete Sonde für die Southern-Blot Analyse zu finden, die optimal funktioniert und wenig Hintergrund verursacht, wurden die ausgewählten Sonden (PCR-Produkte von Marker 1-8) aus der FRA16B-Region gegen das gesamte humane Genom hybridisiert.

Durchführung:

- Ca. 100ng PCR-Produkt wird auf eine Nylonmembran aufgetropft und mit 25ng radioaktiv markierter humaner genomischer DNA hybridisiert
- Die Sonden mit dem geringsten Hintergrund wurden für die weitere Analyse ausgewählt

## 2.2.8 Agarosegelelektrophorese

### Durchführung

- 0,7%iges Agarosegel gießen
- Die verdauten genomischen DNA-Fragmente zusammen mit zwei DNA-Größenmarkern ( $\lambda$  HindIII und 1Kb Marker) auftragen und bei 95 V für 24h auftrennen
- Das Gel fotografieren und Markerspuren vom Gel abschneiden
- Das Gel blotten
- Die DNA durch *UV-crosslinking* an die Hybond-Membran kovalent binden

## 2.2.9 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Eine modifizierte Form der Agarosegelelektrophorese, die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE), dient dazu, große DNA-Fragmente aufzutrennen. Vor der Einführung der PFGE (Schwartz und Cantor, 1984) war eine Auftrennung von DNA-Fragmenten nur bis zu einer Größe von etwa 50kb möglich. Durch die Anwendung von gepulsten elektrischen Feldern ist die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 50-2000kb möglich. Gepulste Felder sind elektrische Felder, die ihre Orientierung regelmäßig nach einem bestimmten Intervall (Pulszeit) verändern. Die DNA-Fragmente werden nach jedem Wechsel des Feldes neu orientiert und können erst dann ihre Wanderung fortsetzen. Kürzere Fragmente erreichen die neue Orientierung schneller als lange und wandern daher schneller, wodurch es zu einer Auftrennung kommt. Durch die Variation der Pulszeiten kann die Auftrennung der Fragmentgröße optimiert werden (Abbildung 2.4).

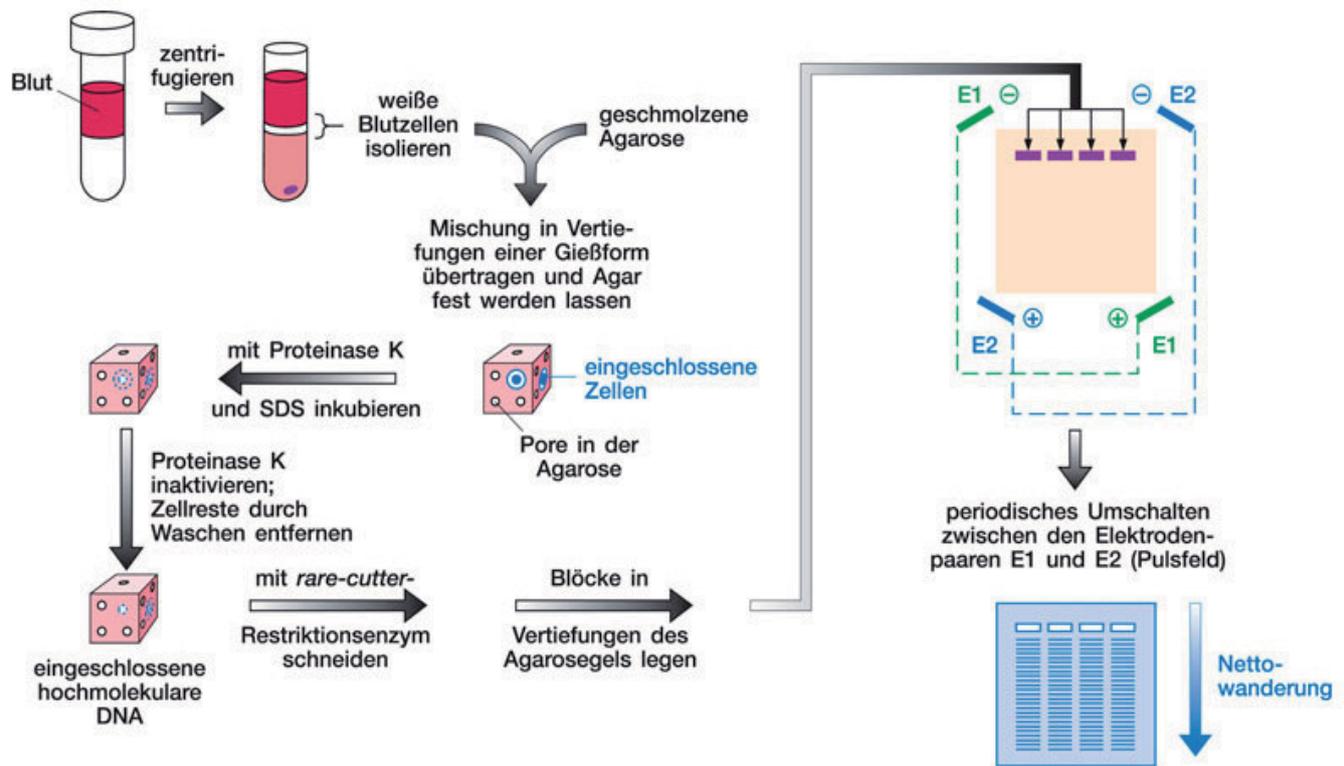


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Auftrennung von hochmolekularer DNA aus Blutzellen mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese (nach Strachan & Read, 2004)

## Durchführung des Versuches

### DNA-Präparation aus peripherem Blut

- Blockformer in verdünnter HCl (0,1 N) 1h inkubieren
- 3-4x mit H<sub>2</sub>O spülen
- 1x mit 70% Ethanol spülen, trocknen
- auf einer Seite mit Klebeband abdichten und auf Eis setzen.
- 5ml Blut mit 1x PBS auf 13ml auffüllen
- mit RB-Lysispuffer auf 50ml auffüllen
- 30min auf Eis inkubieren
- 15min bei 2000rpm zentrifugieren
- zum Pellet 25ml RB-Lysispuffer geben, 5-10 min auf Eis inkubieren
- 10min bei 2000rpm zentrifugieren
- Zellen in 20ml eiskaltem 1xPBS waschen und die Zahl an Leukozyten bestimmen
- 10min bei 1500rpm zentrifugieren
- in PBS resuspendieren, dabei die Zellzahl auf  $1 \times 10^6/40\mu\text{l}$  einstellen

- gleiches Volumen 1%ige Low melt-Agarose in 1xPBS zugeben, auf 50°C halten
- mischen und 80µl pro Slot in Blockformer gießen
- 10min auf Eis auskühlen lassen
- Blöcke in 1% Sarkosyl/ 0,5 M EDTA mit 2 mg/ml Proteinase K geben (pro Block mindestens 1 mg)
- 2-3 Tage bei 50-55°C inkubieren
- Blöcke 3x in TE waschen
- PMSF (Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid)-Behandlung für die Inaktivierung der Proteinase K durchführen
- Blöcke in 0,5 M EDTA bei 4°C lagern

#### DNA-Präparation aus Zellkulturzellen (Lymphozyten oder Fibroblasten)

- Zellen 2x mit PBS waschen
- Zellzahl auf  $1 \times 10^6/40\mu\text{l}$  einstellen
- gleiches Volumen 1% LMP-Agarose in 1xPBS zugeben
- weiteres Vorgehen wie bei DNA-Präparation aus Blut

#### Restriktionsverdau der DNA

- pro Block 500µl TE zugeben und 30 min bei 37°C inkubieren
- Block zur Äquilibration in 300µl Restriktionspuffer für 30 min, unter einmaligem Pufferwechsel, leicht schütteln
- Verdau:

|         |  |
|---------|--|
| 120µl   | Restriktionspuffer (1x)                      |
| 5µl     | BSA (10mg/ml)                                |
| 5µl     | Spermidin (nur bei <i>High-Salt-Puffer</i> ) |
| 80-100U | entsprechende Restriktionsenzyme             |
- Ansatz für 12-16 h bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubieren

#### Herstellung des PFGE-Gels

- 1%-iges Agarosegel in 0,5 TBE vorbereiten
- Die Aktivität der Restriktionsenzyme mit 200µl 0,5 EDTA stoppen.
- Die verdauten Blöcke in die Geltaschen einlegen
- Mit 1%iger LMP-Agarose die Taschen luftfrei auffüllen

- Die Elektrophorese wird für eine optimale Auflösung der DNA-Größe von 20-500kb folgendermaßen eingestellt:  
**Switchzeiten I: 20-50 für 8h**  
**Switchzeiten II: 30-70 für 20h**  
**Spannung: 200V**
- Gel in mit 0,5xTBE-Puffer aufgefüllte Kammer legen und befestigen
- Die Elektrophorese starten
- Nach Beendigung des Gellaufs das Gel in einem EtBr-Bad 15-30min färben und fotografieren (UV-Licht Maximum 30sec)
- Das Gel zusammen mit den Markern ( $\lambda$  HindIII, Lambda Ladder, Hefe-Marker) blotten

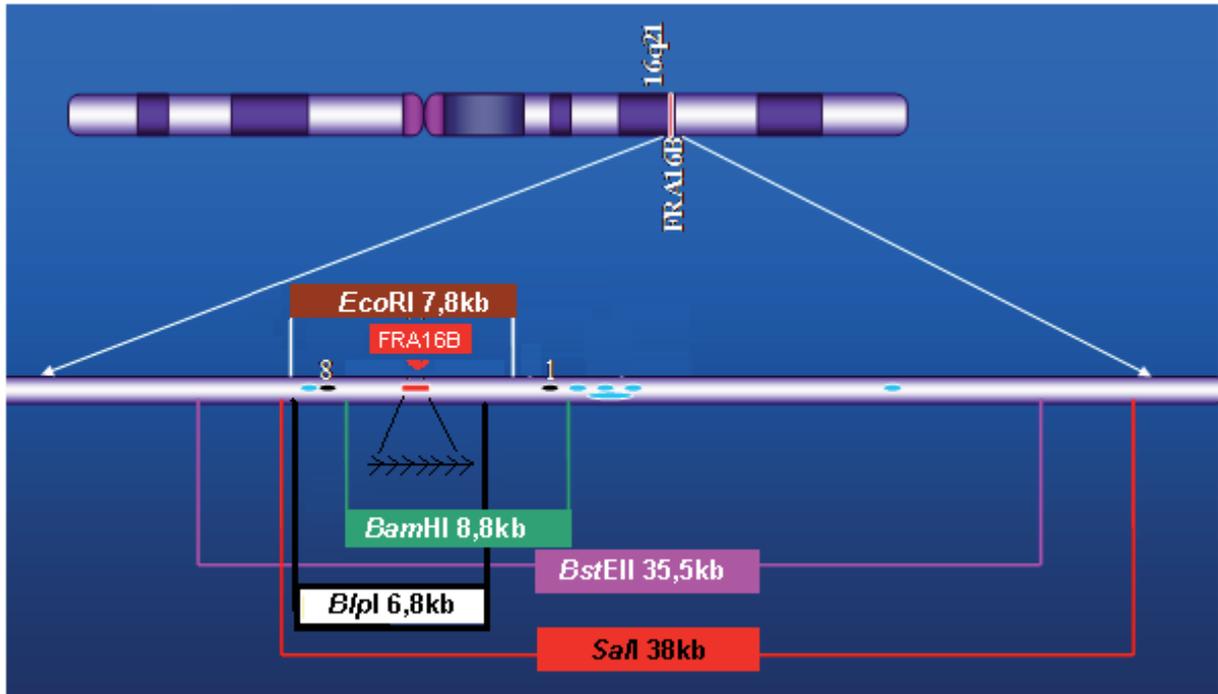
## 2.2.10 Southern Blot

Der Southern Blot ist eine molekularbiologische Methode zur Übertragung (*Blotten*) der in der Gelelektrophorese aufgetrennten DNA auf eine Membran (häufig Nitrocellulose oder Nylon). Auf der Membran ist anschließend der spezifische Nachweis von DNA-Sequenzen durch die Hybridisierung mit chemisch oder radioaktiv-markierten komplementären Gensonden möglich.

### 2.2.10.1 Herstellung radioaktiver Sonden für die Untersuchung der FRA16B-Region

Für die Herstellung einer Sonde zur Untersuchung des FRA16B-Locus wurden mehrere Sequenzen in dieser Region ausgewählt (Abbildung 2.5). Die Sequenzen wurden manuell nach geringem AT-Gehalt ausgewählt (Länge: zwischen 600-1650bp) und auf Sequenzhomologien mit Hilfe der Datenbank (<http://genome.ucsc.edu>) kontrolliert. Die PCR-Bedingungen der ausgewählten Sequenzen wurden optimiert. Um die Sonden auszuwählen, die am wenigsten Hintergrund verursachen, wurde ein Dot-Blot durchgeführt. Dabei wurden zwei Sequenzen (Sonde-1=624bp und Sonde-8=598bp) für weitere Untersuchungen ausgewählt. Nach dem Verdau der genomischen DNA (entweder isoliert aus Lymphozyten und Fibroblasten oder intakte Lymphozyten in Agarose-Blöcken) mit entsprechenden Restriktionsenzymen wurden die DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese (oder Pulsfeldgelelektrophorese) getrennt und anschließend auf eine Nylon-Membran (Hybond-N, Amersham) gebunden. Die Sonden wurden radioaktiv markiert und der Filter nach der Hybridisierung und dem Waschen auf

einen Röntgenfilm aufgelegt. Nach der Filmentwicklung wurden die Ergebnisse analysiert.



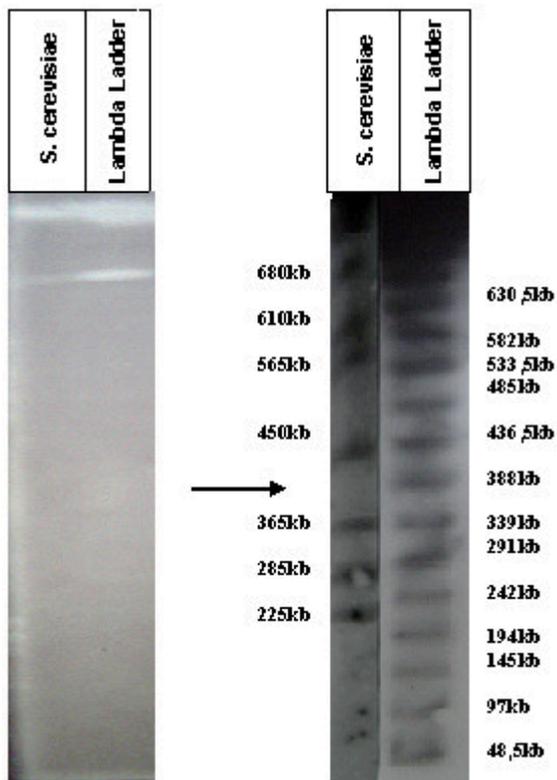
**Abb. 2.5: Schematische Darstellung der ausgewählten Restriktionsenzyme und Sonden für die PFGE-Analyse**

Die FRA16B-Region wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten. Mit Hilfe radioaktiv markierter Sonden (1 und 8) kann man die Variabilität oder Expansion dieses Locus analysieren. **8: Sonde 8**, **1: Sonde 1**. Blaue Punkte: die 6 anderen untersuchten DNA-Sonden in dieser Region, die nicht optimal waren.

### 2.2.10.2 Etablierung von Southern-Blot und PFGE-Analyse

Aufgrund der AT-reichen Region war die Auswahl der DNA-Sonden besonders schwierig. Bei der Optimierung der PFGE musste darauf geachtet werden, dass eine optimale Trennung zwischen 10-500kb stattfindet. Die Auftrennung der DNA erfolgte nach der sog. CHEF-Methode (contour-clamped-homogenous-eletric-field), mit hexagonaler Anordnung der Elektroden (Chu et al., 1986). Das elektrische Feld wechselt zwischen zwei Orientierungen in einem Winkel von 120°. Vorteil dieser Methode ist der gleichmäßige Lauf der DNA in allen Spuren. Die käuflichen Größenmarker, *Lambda Ladder* (48,5-1000kb) und *S.cerevisiae* (225-2200kb) zeigten keine sichtbaren Banden nach Anfärbung des Geles mit EtBr. Deshalb habe ich sie nach Transfer auf die Nylon-Membran mit ihren eigenen radioaktiv markierten DNA-Sonden sichtbar gemacht (Abbildung 2.6). Bei der Optimierung des Southern-Blots wurde die HCL-Behandlung (saure Hydrolyse der DNA) durch 30sek UV-Licht

ersetzt. Die Neutralisierung der Membran wurde erst nach dem DNA-Transport in einer Denaturierungslösung durchgeführt.



**Abb. 2.6: Erhöhung der Intensität der Banden von käuflichen Größenmarkern**

Aufgrund der geringeren Konzentration der Lambda- und Hefe-Marker konnten sie erst nach der Hybridisierung mit den entsprechenden radioaktiv markierten DNA-Sonden sichtbar gemacht werden (rechts). Mit EtBr-Anfärbung sieht man ganz schwache oder gar keine Banden der aufgetragenen Größenmarker (links).

### 2.2.10.3 Transfer von DNA auf eine Nylon-Membran

Die verdauten DNA-Fragmente lassen sich durch verschiedene Methoden übertragen.

#### Durchführung des Versuches:

##### I. Alkalischer Transfer

Beim Photographieren wird das Gel für 30sek mit UV bestrahlt. Durch die Strahlung kommt es zu sogenannten *nicks* in den DNA-Molekülen, was den Transfer erleichtert. Anschließend wird das Gel 2x ½h in Denaturierungslösung (1,5M NaCl/0,5M NaOH) inkubiert. Dabei wird es leicht geschüttelt und der Puffer nach ½h gewechselt.

##### **Aufbau der Blot-Brücke**

In eine Plastikwanne wird ausreichend Denaturierungspuffer gegeben. Anschließend wird eine Glasplatte darüber gelegt und es werden 2 Lagen 3mm Whatman-Papier,

die vorher mit dem Denaturierungspuffer getränkt werden, über die Glasplatte gelegt, so dass von beiden Seiten ein Kontakt mit dem Denaturierungspuffer besteht. Danach wird vorsichtig das Gel auf das Papier gelegt. Anschließend wird die geschnittene Nylonmembran (Hybond-XL oder Hybron N, Amersham-Bioscience), die man vorher in Wasser getränkt hat, auf das Gel aufgelegt und mit einer Glaspipette mögliche Luftblasen entfernt. Danach werden noch 4 weitere, in Denaturierungspuffer getränkte, Whatman-Filterpapiere auf die Nylonmembran gelegt. Zum Abschluss kommen saugfähige Papierhandtücher darauf. Am Ende wird eine Glasplatte mit einem Gewicht von 1 kg auf die Papierhandtücher gelegt. Dieses Gewicht beschleunigt den vertikalen DNA-Transfer auf die Membran. Das Blotten von PFGE-Gelen dauert 2-3 Tage.

### **Abbau der Blot-Brücke**

- Der Blot wird abgebaut und der Filter markiert
- Der Filter wird neutralisiert (2min in 50mM NaPi PH 6,5, leicht schütteln)
- Die Membran wird für 10min bei RT getrocknet
- Die Membran wird mit UV-Licht bestrahlt. Bei der Strahlung werden durch sog. *Cross-Linking* die DNA-Fragmente kovalent mit der Membran verbunden

## **II. Nicht-alkalischer Transfer**

Der nicht-alkalische DNA-Transfer unterscheidet sich von der alkalischen Methode in folgenden Punkten:

- Nach der Denaturierung (1x 30min) wird das Gel für 2x15min mit Neutralisierungspuffer gewaschen und dann geblottet
- Der Transferpuffer ist hier 20xSSC
- Nach dem Blotten wird keine Neutralisierung benötigt
- Die angewendete Nylonmembran hier ist Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham-Bioscience), die positiv geladen ist.

### **2.2.11 Hybridisierung der Nylon-Membranen**

#### **I: Nicht-Radioaktiv**

##### Markierung und Hybridisierung

- Die Membran (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham) wird nach der UV-Bestrahlung oder nach 2-stündiger Inkubation bei 80°C kurz in 2xSSC-Lösung gespült und zusammen mit einem Nylon-Netz gerollt und in einer Glasröhre für 1h mit Easy-Hyb-Hybridisierungspuffer bei 42°C und 10rpm vorhybridisiert.
- 400ng Digoxigenin-markierte Sonde wird für 5min bei 95°C denaturiert und auf Eis gestellt
- Die denaturierte Sonde wird direkt zu 20ml bei 42°C vorgewärmtem DIG Easy-Hyb-Puffer gegeben
- Der Hyb-Puffer, der als Vorhybridisierung eingesetzt wurde, wird verworfen und frischer Hyb-Puffer mit der markierten Sonde zugegeben
- ÜN wird bei 42°C hybridisiert

### Waschen und Detektieren

- 2x5min bei Raumtemperatur mit 2xSSC/0,1% SDS-Puffer und einmaligem Pufferwechsel waschen
- 2x15min bei 65°C mit vorgewärmtem 1xSSC/0,1% SDS-Puffer und einmaligem Pufferwechsel waschen
- Equilibrierung der Membran für 1-5min mit 100ml Waschlösung I
- Inkubation für 60min in 20ml Blocking-Puffer bei RT
- Zugabe von 10µl *Anti-digoxigenin-AP-Conjugate* und weitere 30min schütteln bei RT
- 2x15min mit 200ml Waschlösung II leicht schütteln mit einmaligem Wechsel
- 1-5min Equilibrierung der Membran in Detektionspuffer
- 5min mit 2 ml Nachweisreagenz (CPD-Star in Detektionspuffer, Firma Roche) inkubieren, nach 5min überschüssiges Reagenz entfernen
- Einen Röntgenfilm auflegen

## **II: Radioaktiv**

### Markierung und Hybridisierung

- Die Membran wird mit einem Nylon-Netz gerollt und für 2h bei 65°C in einer Glasröhre mit Church-Puffer vorhybridisiert
- 25ng der radioaktiv markierten DNA-Sonde werden nach Vorschrift des *Random primed labelling-Kits* (Amersham) markiert und durch eine GenClean-Säule gereinigt

- Die Sonden werden für 5min bei 95°C denaturiert
- Der Church-Puffer wird verworfen und die denaturierten Sonden werden mit 10ml, bei 65°C vorgewärmten, frischen Church-Puffer in die Röhre gegeben
- Die Membran wird ÜN bei 65°C hybridisiert

### Waschen und Detektieren

- Die Membran wird 3x½h mit (0,5xSSC/0,1% SDS)-Puffer bei 65°C gewaschen
- Alle ½ h wird die Waschlösung gewechselt
- Die Membran wird getrocknet und mit einem Röntgenfilm und Screen bei 80°C für mind. 3 Tage exponiert
- Die Signale werden ausgewertet

## 2.2.12 Mikrosatelliten-Analyse bei Proband 4 und seinen Eltern

Die PCR-Bedingungen für die STS-Analyse an Chromosom 16q wurde an 4 Mikrosatelliten-Markern (D16S514, D16S408, D16S308, D16S320) etabliert.

Ansatz:

|        |                   |
|--------|-------------------|
| 100ng  | genomische DNA    |
| 1,5mM  | MgCl <sub>2</sub> |
| 0,4mM  | dNTPs             |
| 10pM   | Primer H          |
| 10pM   | Primer R          |
| 1x     | Reaktionspuffer   |
| 49,5ml | H <sub>2</sub> O  |
| 0,5µl  | DNA-Polymerase    |

Programm:

| Shritt    | Temperatur | Dauer |
|-----------|------------|-------|
| 1         | 94°C       | 5min  |
| 2         | 94°C       | 1min  |
| 3         | 55°C       | 1min  |
| 4         | 72°C       | 1min  |
| 5 2→4 x35 |            |       |
| 6         | 72°C       | 10min |
| 7         | 4°C        | ∞     |

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Zytogenetische Ergebnisse an Lymphozyten

Die optimale Darstellung der menschlichen Chromosomen und eine ausreichende Anzahl an Metaphasen sind abhängig von den Kultivierungsbedingungen der Lymphozytenkultur. Um einen Einfluss der Kulturbedingungen auf die Chromosomenbrüchigkeit, den mitotischen Index (die Anzahl der Metaphasen in 1000 Lymphozyten) und auf die FRA16B-Expression zu überprüfen, wurden 4 elementare Kultur-Parameter (Kultivierungstemperatur, Kulturzeit, PHA (Phytohämagglutinin)-Konzentration und Colcemidzeit) bei einem FRA16B-Träger (Probanden 1) und zwei negativen Kontrollpersonen (NK5, NK6) analysiert und verglichen. Für die FRA16B-Expression ergaben sich bei verschiedenen Kulturbedingungen keine signifikanten Veränderungen. Auch die mitotischen Indizes zwischen dem Probanden 1 und beiden negativen Kontrollen zeigten keine Auffälligkeiten.

Eine Temperaturerhöhung (bei 39, 40 und 41°C) während der Kultivierung führte als einzige Veränderung zu einer signifikanten Reduzierung des mitotischen Index (Abbildungen 3.1) und einer erhöhten Chromosomenbrüchigkeit (Abbildungen 3.2). Bei 41°C zeigten die Kulturen fast keine Interphasekerne oder Metaphasechromosomen.

#### 3.1.1 Einfluss der Kultivierungstemperatur

##### 3.1.1.1 Mitotischer Index in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur

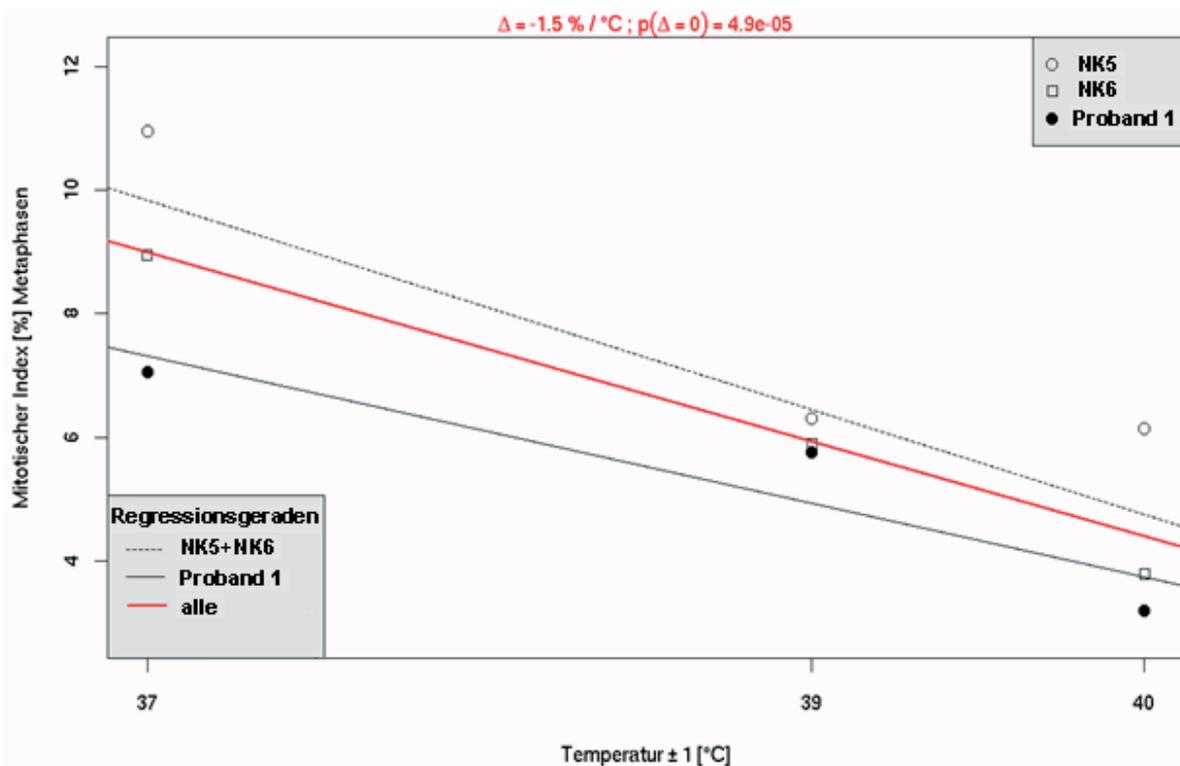
Der mitotische Index wurde bei 2 negativen Kontrollen (NK5, NK6) und Proband 1 untersucht. Dabei wurden jeweils 1000 Lymphozyten untersucht und die Anzahl der Metaphasen ausgewertet (Tabelle 3.1).

| Untersuchte Personen | Temperatur                            |      |      |
|----------------------|---------------------------------------|------|------|
|                      | 37°C                                  | 39°C | 40°C |
|                      | <b>Mitotischer Index (Mittelwert)</b> |      |      |
| NK5                  | 109,5                                 | 63   | 61,5 |
| NK6                  | 89,5                                  | 59   | 38   |
| Proband 1            | 70,5                                  | 57,5 | 32   |

**Tab. 3.1: Mitotische Indizes bei Proband 1 und beiden negativen Kontrollen bei erhöhter Kultivierungstemperatur**

NK: negative Kontrolle.

Eine Temperaturerhöhung während der Kultivierung der Lymphozyten führt zu einer signifikanten Reduzierung des mitotischen Index (p-Wert= 0,000049) bei allen Proben (Abbildung 3.1). Allerdings gab es zwischen den negativen Kontrollen und dem Proband 1 keinen signifikanten Unterschied bei der mitotischen Indexabnahme (p-Wert= 0,29).



**Abb. 3.1: Darstellung des Temperatur-Einflusses auf den mitotischen Index**

Mit zunehmender Temperatur während der Kultivierung, reduziert sich die Anzahl der Metaphasen pro 1000 Lymphozyten bei Proband 1 und beiden negativen Kontrollen. Die Steigungen der Regressionsgeraden von negativen Kontrollen und Proband 1 zeigen keinen nachweisbaren Unterschied (p-Wert= 0,29). Insgesamt wird bei den gepoolten Daten eine signifikante (p-Wert= 0,000049) Abnahme des mitotischen Index von 1,5 %/°C beobachtet. NK: negative Kontrolle.

### 3.1.1.2 Zunahme von Chromosomenbrüchen in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur

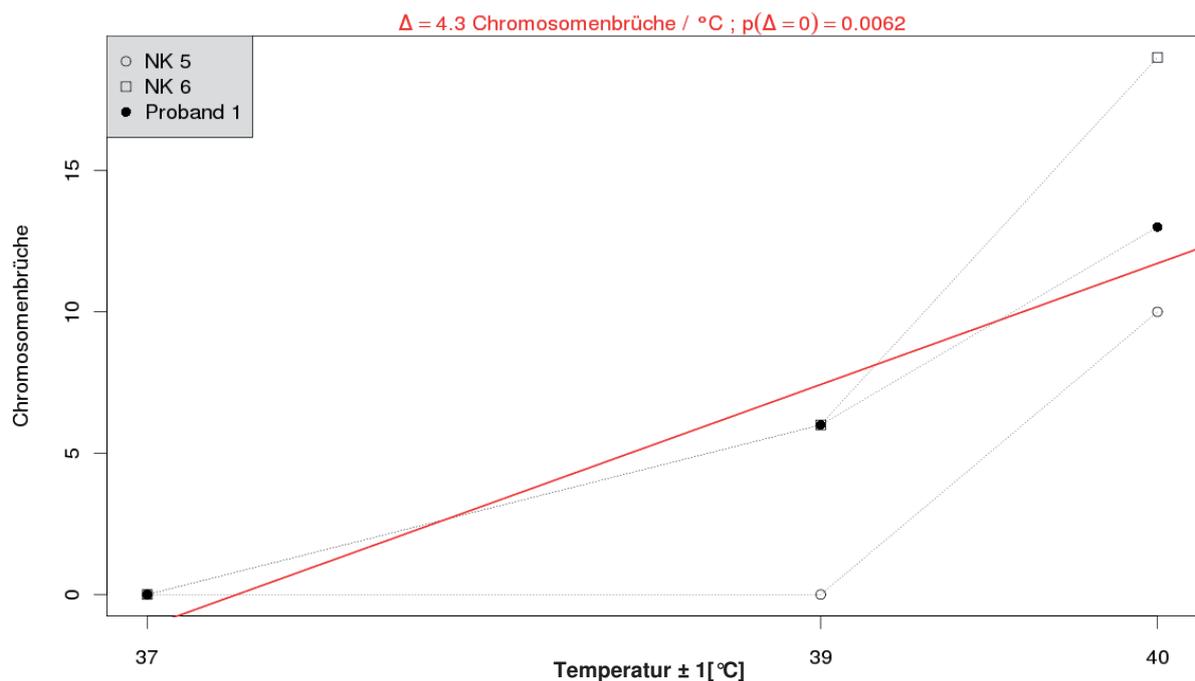
Dieser Parameter wurde bei 2 negativen Kontrollen (NK5, NK6) und Proband 1 untersucht (Tabelle 3.2).

| Untersuchte Personen | Temperatur                                   |      |      |
|----------------------|--|------|------|
|                      | 37°C   | 39°C | 40°C |
|                      | Anzahl der Chromosomenbrüche [50 Metaphasen] |      |      |
| NK5                  | 0  | 0    | 10   |
| NK6                  | 0  | 6    | 19   |
| Proband 1            | 0  | 6    | 13   |

**Tab. 3.2: Chromosomenbrüche bei Proband 1 und beiden negativen Kontrollen in Abhängigkeit von der Temperatur**

NK: negative Kontrolle.

Während eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur zu einer signifikanten Reduzierung des mitotischen Index führt, sind gleichzeitig mit zunehmender Kultivierungstemperatur vermehrt Chromosomenbrüche bei Proband 1 und beiden negativen Kontrollen zu beobachten (Abbildung 3.2).



**Abb. 3.2: Graphische Darstellung der Chromosomenbrüchigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur**

Die erhöhte Temperatur führt allgemein zu einer erhöhten Chromosomenbrüchigkeit bei Proband 1 und beiden negativen Kontrollen. Für die gepoolten Daten von negativen Kontrollen und Proband 1 ergibt sich ein signifikanter ( $p$ -Wert= 0,0062) Anstieg der Expression von Chromosomenbrüchen von 4,3/°C. NK: negative Kontrolle.

Zusätzlich wurden die Bruchregionen der gefundenen Chromosomenbrüche (bei den negativen Kontrollen (NK5, NK6) und Proband 1) nach Temperaturerhöhung mittels Giemsa-Färbung exakt definiert und mit der Lage aller aktuell bekannter FSs (siehe Tabelle 8.1 und 8.2) verglichen (Tabelle 3.3).

Dabei wurden entsprechende p-Werte folgendermaßen berechnet:

**CFS:** Länge = 654,89Mb; beobachtet = 19 Brüche;  $= 41 * 654,89/3200 = 7,95 \rightarrow p(X \geq 20) = 0,00112225$ .

**RFS:** Länge = 205,2Mb; beobachtet = 4 Brüche;  $= 41 * 205,2/3200 = 2,43 \rightarrow p(X \geq 4) = 0,2703490$

Erklärung:

Anteil der gefundenen CFSs:  $19/41=46,3\%$ , gesamte Länge dieser 19 Regionen = 654,89MB. Vergleicht man diese Länge zur Gesamtlänge des menschlichen Genoms:  $654,89/3200\text{Mb} = 20,46\%$ , ergibt sich mit den ermittelten 46,3% ein signifikant höherer Wert als der erwartete Wert von 20,46% (p-Wert = 0,0011225) (weitere Erklärung: siehe Diskussion).

| <b>Brüchigkeit</b>     | <b>FSs</b>                 | <b>Brüchigkeit</b>                 | <b>FSs</b>      |
|------------------------|----------------------------|------------------------------------|-----------------|
| 1p11-12 (NK5)          | Keine Zuordnung            | 7q11.2 (NK6)                       | FRA7A (RFS)     |
| 1p21 (NK6)             | FRA1E (CFS)                | 7q22 (P1)                          | FRA7F (CFS)     |
| 1p32 (NK6)             | FRA1B (CFS)                | 7q31 (NK5)                         | FRA7G (CFS)     |
| 1p36 (P1)              | FRA1A (CFS)                | 8q11 (NK6)                         | Keine Zuordnung |
| 1q12 (P1)              | FRA1J (CFS)                | 4x8q22<br>(2xNK6+2xNK5)            | FRA8A+B (CFS)   |
| 2x1q21 (2xNK6)         | FRA1F (CFS)                | 9q11 (NK6)                         | Keine Zuordnung |
| 1q32 (NK6)             | Keine Zuordnung            | 2x9q22 (NK5+P1)                    | FRA9D (CFS)     |
| 2p13 (NK5)             | FRA2E (CFS)                | 2x10q221 (NK6+P1)                  | FRA10D (CFS)    |
| 2q21 (P1)              | FRA2F (CFS)                | 2x10q24 (2xNK6)                    | Keine Zuordnung |
| 2q33 (NK6)             | Keine Zuordnung            | 11p13 (P1)                         | FRA11E (CFS)    |
| 3x3p21<br>(1xNK6+2xP1) | Keine Zuordnung            | 11q23 (P1)                         | FRA11G (CFS)    |
| 4p14 (NK6)             | Keine Zuordnung            | 12q13 (P1)                         | FRA12A (RFS)    |
| 2x4q12 (NK5+NK6)       | FRA4B (RFS)                | 2x12q15 (2xP1)                     | Keine Zuordnung |
| 4q21 (P1)              | Keine Zuordnung            | 12q22 (NK6)                        | Keine Zuordnung |
| 4q27 (NK5)             | FRA4E<br>(Unklassifiziert) | 14p11-12 (NK6)                     | Keine Zuordnung |
| 3x4q31<br>(2xP1+1xNK6) | FRA4C (CFS)                | 17p11 (P1)                         | Keine Zuordnung |
| 5q11.2 (NK6)           | Keine Zuordnung            | 17q21 (P1)                         | Keine Zuordnung |
| 5q13 (NK6)             | FRA5A (RFS)                | 17q23.1 (NK5)                      | FRA17B (CFS)    |
| 5q15 (NK6)             | FRA5D (CFS)                | <b>Total (CFS)</b>                 | <b>19/41</b>    |
| 5q22 (P1)              | Keine Zuordnung            | <b>Total (RFS)</b>                 | <b>4/41</b>     |
| 5q33 (NK5)             | Keine Zuordnung            | <b>Total<br/>(Unklassifiziert)</b> | <b>1/41</b>     |
| 6q15 (NK6)             | FRA6G (CFS)                | <b>Total<br/>(Keine Zuordnung)</b> | <b>17/41</b>    |
| 6q25 (NK6)             | FRA6B (CFS)                |                                    |                 |

**Tab. 3.3: Vergleich der identifizierten Bruchregionen bei der Temperaturerhöhung mit bekannten FSs**

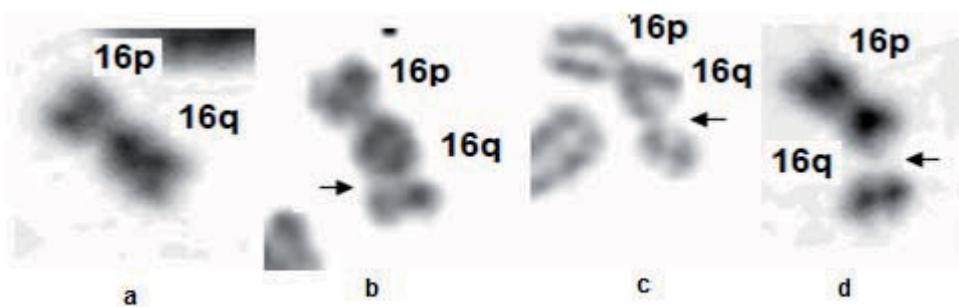
59% (24/41) der entsprechenden Brüche durch die erhöhte Temperatur liegen in bekannten FSs-Regionen. 41% (17/41) der Chromosomenbrüche konnten nicht zu bekannten FSs zugeordnet werden. CFS: Common Fragile Site RFS: Rare Fragile Site P1: Proband 1, NK: negativ Kontrolle.

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Kultivierungstemperatur bei Lymphozyten zu einer signifikanten Erhöhung von Chromosomenbrüchen in CFSs führt.

### 3.1.2 DAPI-Einfluss auf zytogenetische FRA16B-Expression

DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) ist als Chemikalie bekannt, die eine deutliche Bindung an AT-reiche Regionen der DNA, wie beim FRA16B-Locus, aufweist (Pineda De Castro et al., 2002). FRA16B-Expression kann effektiv durch DAPI und Berenil induziert werden (Schmid et al., 1986). Für die Charakterisierung der FRA16B-Träger wurde in dieser Arbeit neben der Untersuchung des Einflusses von Kulturbedingungen der Einfluss von DAPI auf die FRA16B-Expression untersucht. Dabei wurden alle negativen Kontrollen (NK1-NK6) und 5 Probanden (P1, P2, P4, P5 und P6) nach DAPI-Behandlung sowohl mit zytogenetischen Methoden als auch mittels FISH untersucht (Tabelle 3.4). Bei dem Probanden 3 wurde nach Einsatz von DAPI keine Lymphozytenproliferation beobachtet.

Bei der zytogenetischen Analyse der FRA16B-Manifestation konnte ich verschiedene FRA16B-Expressionsformen an Chromosom 16 nachweisen (Abbildung 3.1).



**Abb. 3.3: Verschiedene FRA16B-Expressionsformen bei zytogenetischen Untersuchungen**

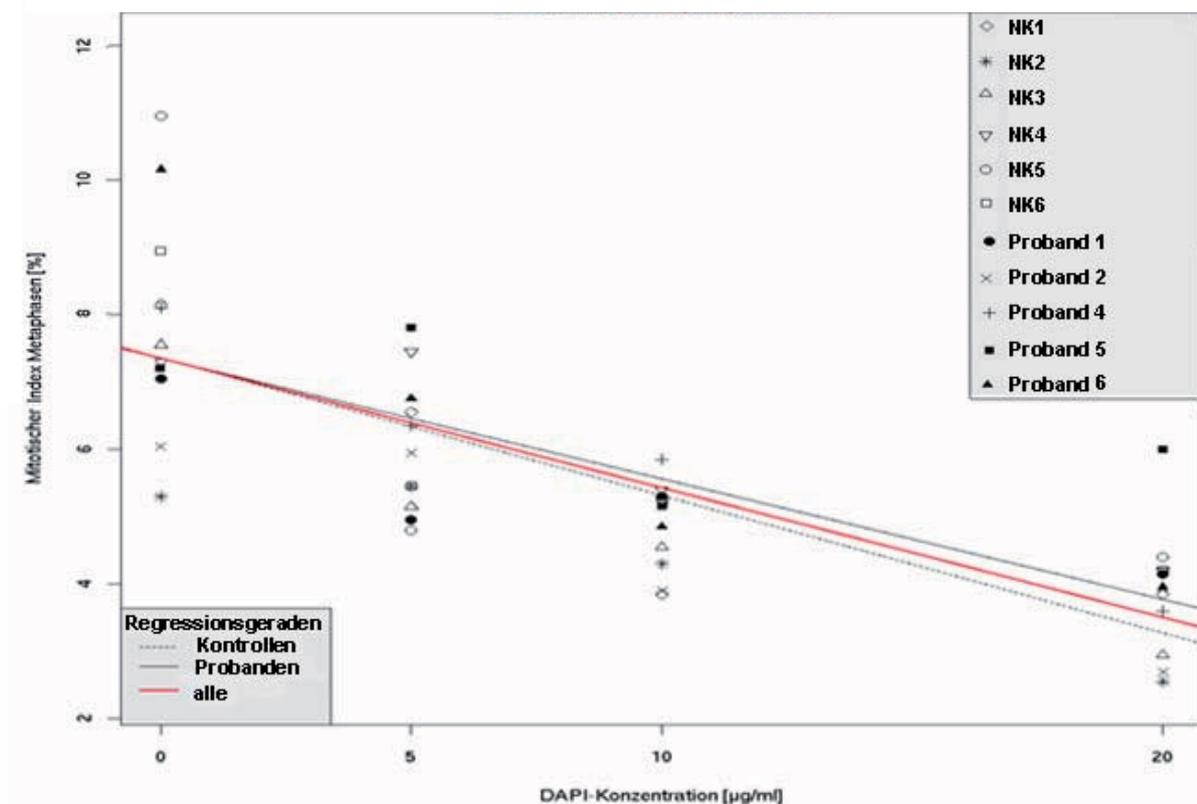
**a:** Strukturell unauffälliges Chromosom 16, **b:** Fragilität an Chromosom 16q (Pfeil), **c:** Chromatidbruch in 16q (Pfeil), **d:** Chromosomenbruch mit Entstehung eines azentrischen Fragmentes (Pfeil).

Bei der Kultivierung mit DAPI zeigten alle negativen Kontrollen (NK1-NK6) keine FRA16B-Manifestation. Die Proliferationsstudien bei allen negativen Kontrollen und Probanden zeigten eine signifikante Reduzierung des mitotischen Index (gepoolte p-Werte=  $2,4 \cdot 10^{-16}$ , Abbildungen 3.4), die jedoch zwischen diesen beiden Gruppen fast gleich war (p-Wert= 0,52).

| Untersuchte Personen | DAPI-Konzentration             |        |         |         |
|----------------------|--------------------------------|--------|---------|---------|
|                      | 0µg/ml                         | 5µg/ml | 10µg/ml | 20µg/ml |
|                      | Mitotischer Index (Mittelwert) |        |         |         |
| NK1                  | 81,5                           | 65,5   | 52,5    | 38,5    |
| NK2                  | 53                             | 54,5   | 43      | 25,5    |
| NK3                  | 75,5                           | 51,5   | 45,5    | 29,5    |
| NK4                  | 73                             | 74,5   | 54      | 42      |
| NK5                  | 109,5                          | 48     | 38,5    | 44      |
| NK6                  | 89,5                           | 54,5   | 52      | 42      |
| Proband 1            | 70,5                           | 49,5   | 53      | 41,5    |
| Proband 2            | 60,5                           | 59,5   | 39      | 27      |
| Proband 4            | 81                             | 63,5   | 58,5    | 36      |
| Proband 5            | 72                             | 78     | 51,5    | 60      |
| Proband 6            | 101,5                          | 67,5   | 48,5    | 39,5    |

**Tab. 3.4: Mitotische Indizes bei negativen Kontrollen und Probanden in Abhängigkeit der DAPI-Konzentration**

NK: negative Kontrolle.



**Abb. 3.4: Graphische Darstellung des mitotischen Index in Abhängigkeit der DAPI-Konzentration (Probanden und Kontrollen)**

Die erhöhte DAPI Konzentration führt zu einer deutlichen Reduzierung des mitotischen Index bei allen Probanden (FRA16B-Träger) und negativen Kontrollen. Die beobachtete Abnahme des mitotischen Index um 0,2 % / µg/ml ist signifikant (p-Wert= 2,4 E-16). NK: negative Kontrolle.

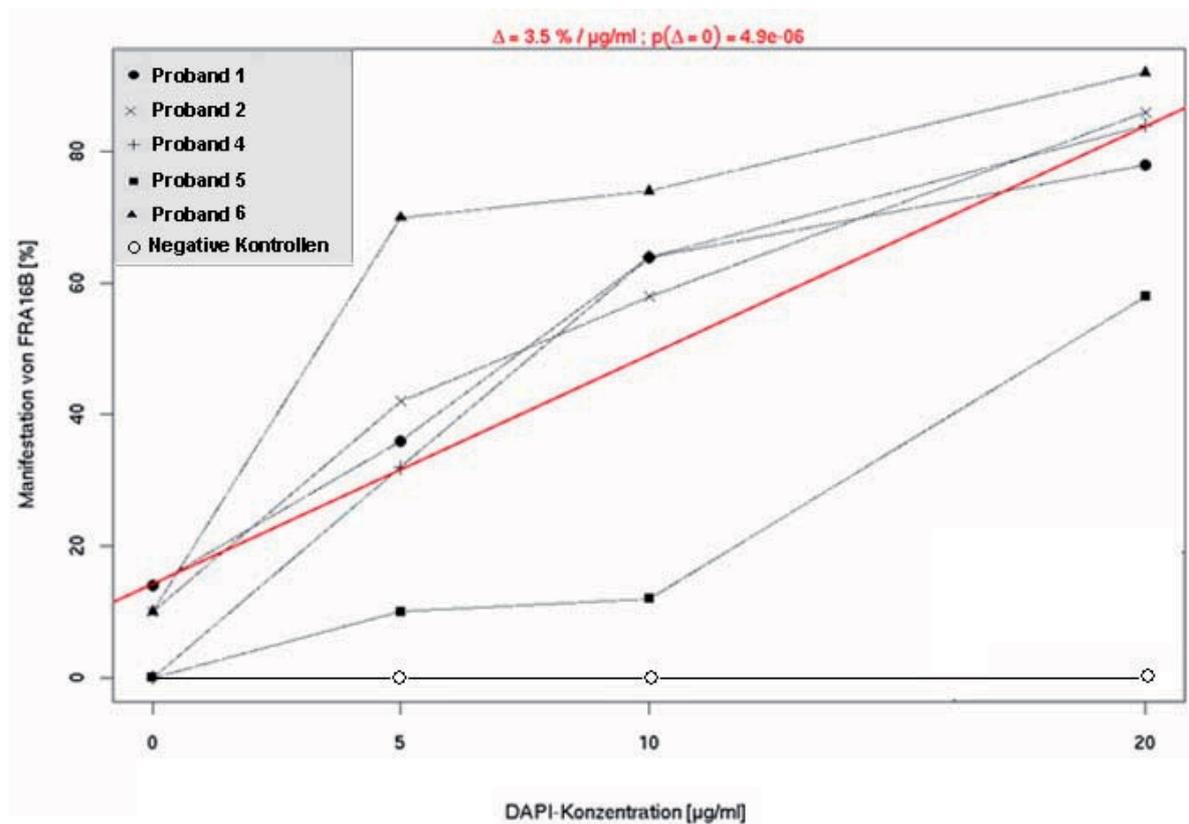
Die zunehmende DAPI-Konzentration (Tabelle 3.5) führte bei den 5 Probanden zu einer signifikant erhöhten FRA16B-Manifestation bis zu 90% (gepoolte p-Werte = 0,0000049).

| Untersuchte Personen | DAPI-Konzentration                          |        |         |         |
|----------------------|---|--------|---------|---------|
|                      | 0µg/ml                                      | 5µg/ml | 10µg/ml | 20µg/ml |
|                      | Manifestation von FRA16B [%][50 Metaphasen] |        |         |         |
| NK1                  | 0   | 0      | 0       | 0       |
| NK2                  | 0   | 0      | 0       | 0       |
| NK3                  | 0   | 0      | 0       | 0       |
| NK4                  | 0   | 0      | 0       | 0       |
| NK5                  | 0   | 0      | 0       | 0       |
| NK6                  | 0   | 0      | 0       | 0       |
| Proband 1            | 14  | 36     | 64      | 78      |
| Proband 2            | 10  | 42     | 58      | 86      |
| Proband 4            | 0   | 32     | 64      | 84      |
| Proband 5            | 0   | 10     | 12      | 58      |
| Proband 6            | 10  | 70     | 74      | 92      |

**Tab. 3.5: Manifestation der FRA16B bei negativen Kontrollen und Probanden in Abhängigkeit der DAPI-Konzentration**

NK: negative Kontrolle.

Die FRA16B-Expression von Lymphozyten von Proband 5 zeigte sich mit einer Verzögerung auf die Zunahme der DAPI-Konzentration. Sie steigt bei maximaler DAPI-Konzentration (20µg/ml) nur bis ca. 58%. Bei den negativen Kontrollen (NK1-NK6) wurde keine FRA16B-Manifestation mit Zunahme der DAPI-Konzentration festgestellt.



**Abb. 3.5: Expression von FRA16B in Abhängigkeit der DAPI-Konzentration bei den Probanden**

Die Wirkung der DAPI-Konzentration auf die Manifestation von FRA16B ist bei allen Probanden ähnlich, mit einem signifikanten ( $p$ -Wert= 0,0000049) mittleren Anstieg von 3,5 % / $\mu\text{g/ml}$  (Beschreibung der Probanden und negativen Kontrollen: siehe Seite 23+24).

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die erhöhte DAPI-Konzentration eine umgekehrte Korrelation des mitotischen Index bei Kontrollen und Probanden und eine direkte Korrelation der FRA16B-Expression bei Probanden hat.

### 3.1.3 2-Aminopurin-Einfluss auf die zytogenetische FRA16B-Expression

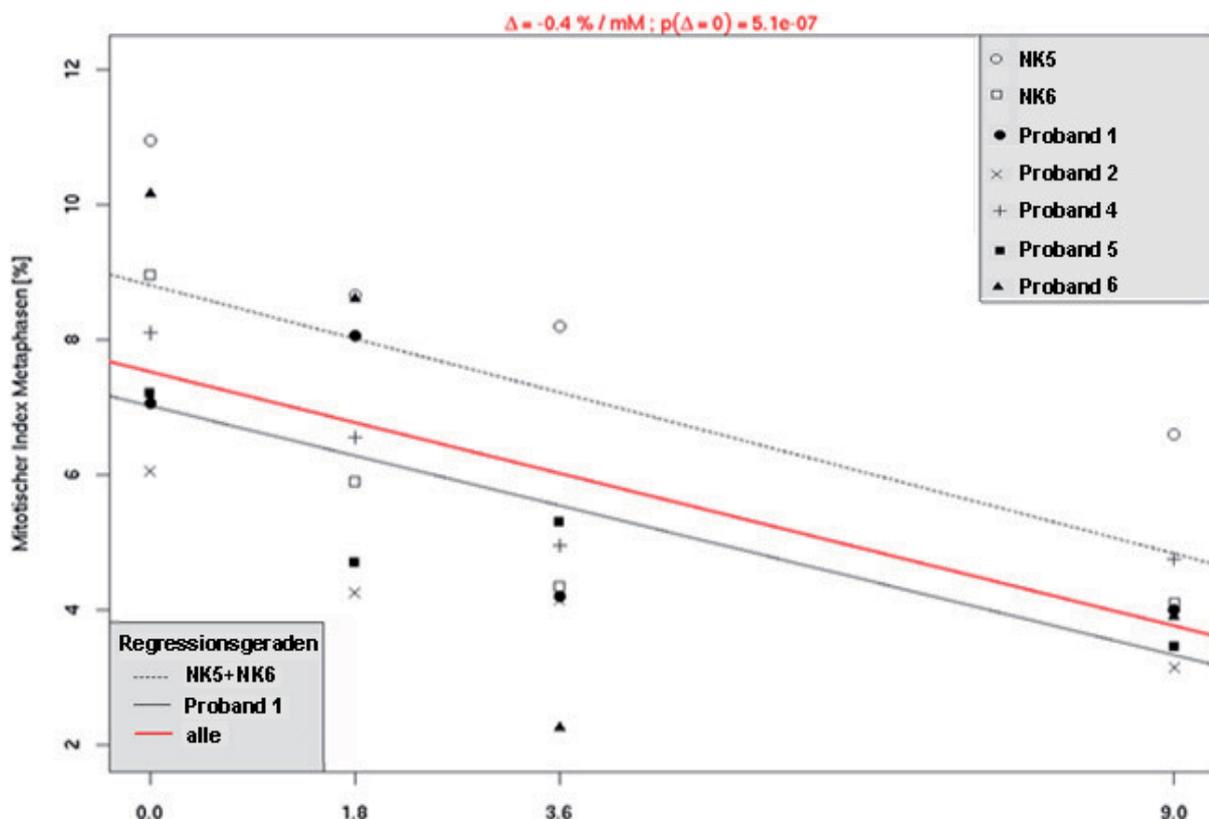
Bei 2-Aminopurin handelt es sich um einen Inhibitor für Proteinkinasen, besonders für ATM (Ataxia telangiectasia mutated)- und ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related)-Genprodukte, die als Checkpointproteine eine zentrale Rolle bei der Fortsetzung des Zellzyklus und der Reparatur von FSs spielen. Ein 2-Aminopurin-Einsatz erhöht durch sogenannten DNA-Replikationsstress die Chromosomenbrüche an CFSs (Casper et al.; 2002). Der Einfluss von 2-Aminopurin auf FRA16B-Expression ist, im Gegensatz zu DAPI, in der Literatur nicht bekannt. Neben der Untersuchung des Einflusses von DAPI auf die FRA16B-Expression, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von 2-Aminopurin untersucht. Nach Einwirkung von 2-Aminopurin

kommt es zu einer signifikanten Reduzierung der Metaphasenanzahl bei den negativen Kontrollen 5 und 6 und den Probanden (gepoolte p-Werte= 0,00000051; Abbildung 3.6). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden untersuchten Gruppe festgestellt (p-Wert= 0,84). Bei dem Probanden 3 wurde nach Einsatz von 2-Aminopurin keine Lymphozytenproliferation beobachtet.

| Untersuchte Personen | 2-Aminopurin-Konzentration     |       |       |      |
|----------------------|--------------------------------|-------|-------|------|
|                      | 0mM                            | 1,8mM | 3,6mM | 9mM  |
|                      | Mitotischer Index (Mittelwert) |       |       |      |
| NK5                  | 109,5                          | 86,5  | 82    | 66   |
| NK6                  | 89,5                           | 59    | 43,5  | 41   |
| Proband 1            | 70,5                           | 80,5  | 42    | 40   |
| Proband 2            | 60,5                           | 42,5  | 41,5  | 31,5 |
| Proband 4            | 81                             | 65,5  | 49,5  | 47,5 |
| Proband 5            | 72                             | 47    | 53    | 34,5 |
| Proband 6            | 101,5                          | 86    | 22,5  | 39   |

**Tab. 3.6: Mitotische Indizes bei zwei negativen Kontrollen und 5 Probanden in Abhängigkeit der DAPI-Konzentration**

NK: negative Kontrolle.



**Abb. 3.6: Mitotischer Index in Abhängigkeit der 2-Aminopurin Konzentration**

Die erhöhte Konzentration von 2-Aminopurin führt zu einer Reduzierung des mitotischen Index. Kontrollen und Probanden reagieren offensichtlich gleich (p-Wert= 0,84). Im Mittel nimmt der mitotische Index signifikant (p-Wert= 0,00000051) um 0,4 %/mM ab. NK: negative Kontrolle.

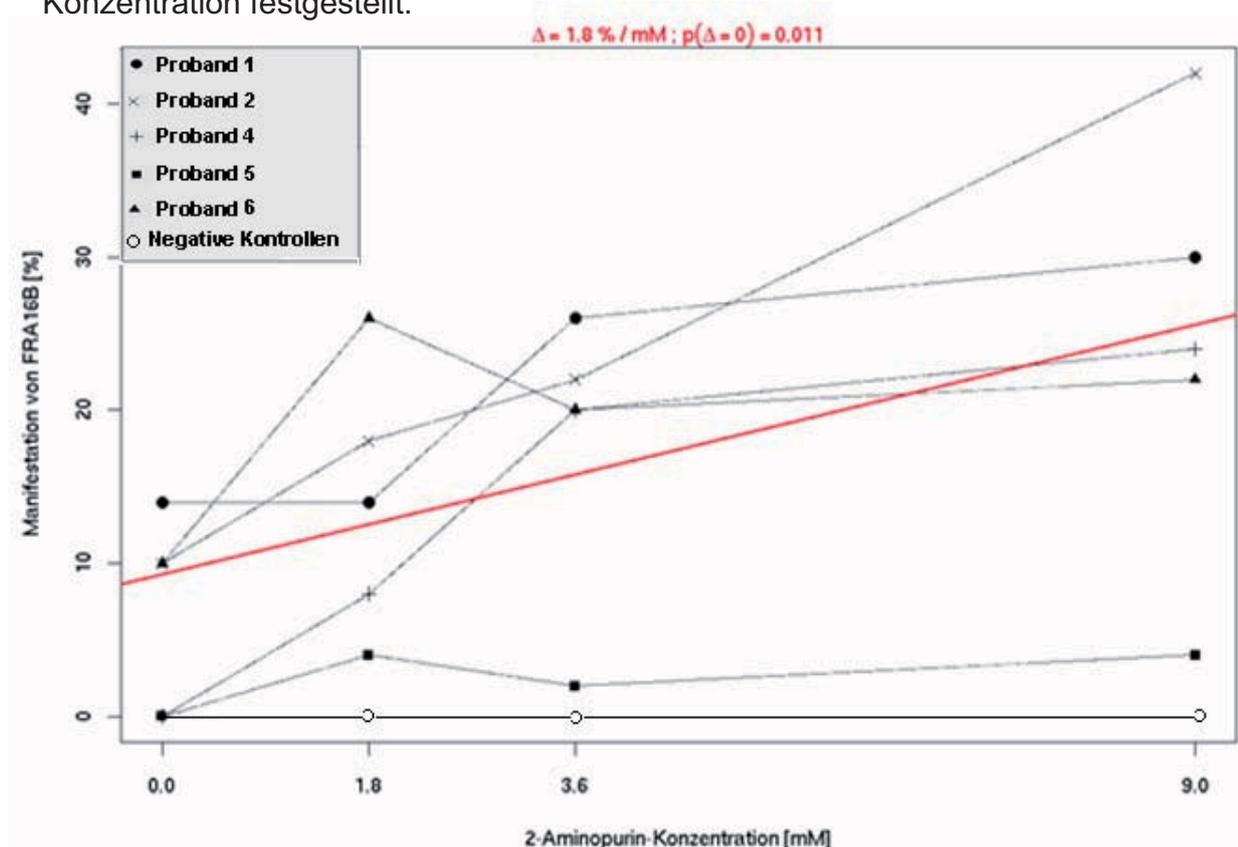
Bei Kultivierung mit 2-Aminopurin (24h vor der Fixierung) erhöhte sich die FRA16B-Expression bei allen Probanden (Tabelle 3.7).

| Untersuchte Personen | 2-Aminopurin-Konzentration                   |       |       |     |
|----------------------|--|-------|-------|-----|
|                      | 0mM  | 1,8mM | 3,6mM | 9mM |
|                      | Manifestation von FRA16B [%] [50 Metaphasen] |       |       |     |
| NK5                  | 0  | 0     | 0     | 0   |
| NK6                  | 0  | 0     | 0     | 0   |
| Proband 1            | 14   | 14    | 26    | 30  |
| Proband 2            | 10   | 18    | 22    | 42  |
| Proband 4            | 0  | 8     | 20    | 24  |
| Proband 5            | 0  | 4     | 2     | 4   |
| Proband 6            | 10   | 26    | 20    | 22  |

**Tab. 3.7: Expression von FRA16B bei den Probanden und beiden negativen Kontrollen in Abhängigkeit der 2-Aminopurin Konzentration**

NK: negative Kontrolle.

Die Zunahme der FRA16B-Expression durch ansteigende Konzentration von 2-Aminopurin war bei den untersuchten Probanden unterschiedlich. Während Proband 1 und 2, 4, und Proband 6 ein ähnliches Muster zeigten, ändert sich die FRA16B-Manifestation bei Proband 5 fast gar nicht (Abbildung 3.7). Es wurde keine FRA16B-Expression bei den Kontrollen 5 und 6 während der Zunahme der 2-Aminopurin Konzentration festgestellt.



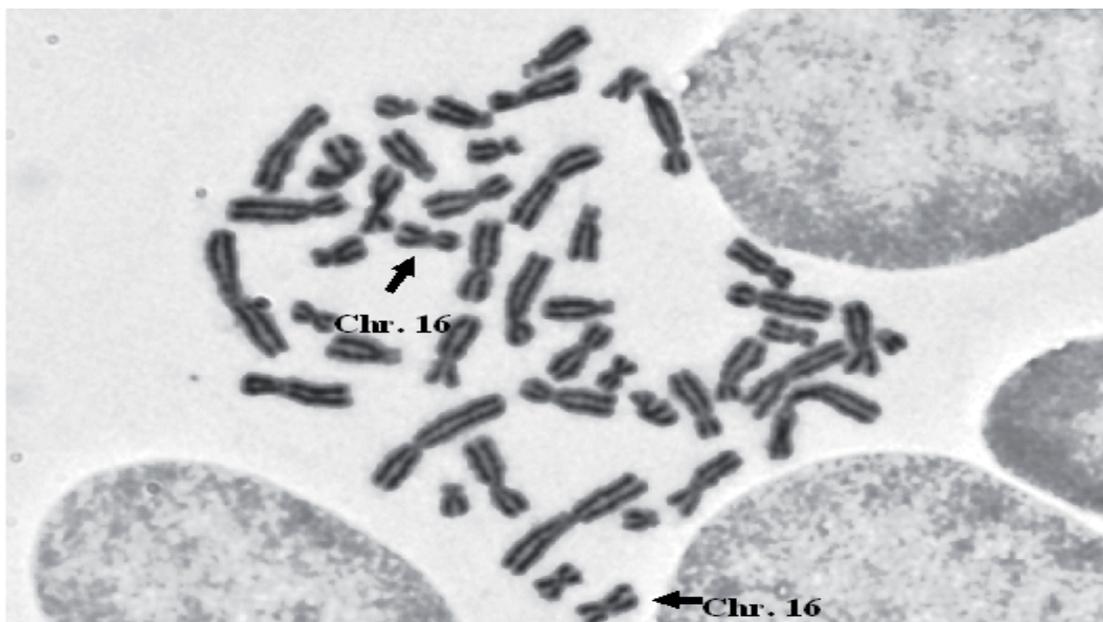
**Abb. 3.7: Expression von FRA16B in Abhängigkeit der 2-Aminopurin Konzentration bei den Probanden**

Ein Anstieg der 2-Aminopurin-Konzentration führt bei allen Probanden zu einer erhöhten FRA16B-Expression, die sich jedoch zwischen den Probanden unterscheidet. Im Mittel lässt sich jedoch ein signifikanter Anstieg ( $p$ -Wert= 0,011) von 1,8 %/mM beobachten. Proband 4 und Proband 5 zeigten keine spontane FRA16B-Expression, deshalb ist bei 0mM keine FRA16B-Expression zu sehen.

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die erhöhte 2-Aminopurin-Konzentration eine umgekehrte Korrelation des mitotischen Index bei den Kontrollen und Probanden und eine direkte Korrelation mit der FRA16B-Expression bei den Probanden aufweist.

### 3.2 Untersuchung dermalen Fibroblasten von Proband 1 auf FRA16B-Expression

Die dermalen Fibroblasten des Probanden 1 wurden nach der Isolierung und Subkultivierung mit Colcemid behandelt und direkt mit Giemsa angefärbt. Dabei wurden 50 Metaphasen analysiert (Abbildung 3.8). Eine spontane FRA16B-Expression, die in den Lymphozyten des Probanden 1 mit bis zu 14% gefunden wurde, ist in den dermalen Fibroblasten nicht nachweisbar.



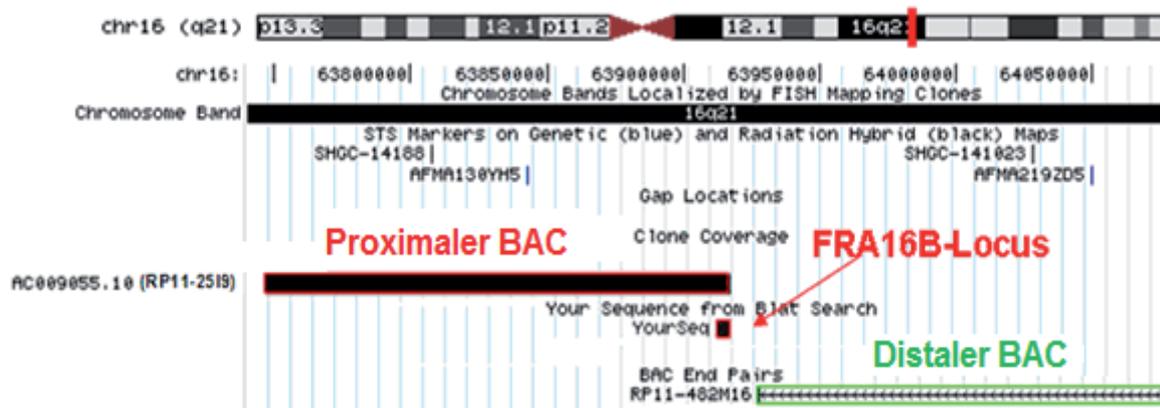
**Ab. 3.8: Giemsafärbung der Metaphasenchromosomen in dermalen Fibroblasten des Probanden 1**

Die homologen Chromosomen 16 von dermalen Fibroblasten zeigten keine Hinweise auf FRA16B-Expression. Die Chromosomen sind direkt nach dem Auftropfen und ohne Trypsin-Behandlung mit Giemsa angefärbt.

### 3.3 FISH-Analysen

#### 3.3.1 Auswahl der FISH-Sonden für die Untersuchung der FRA16B-Region

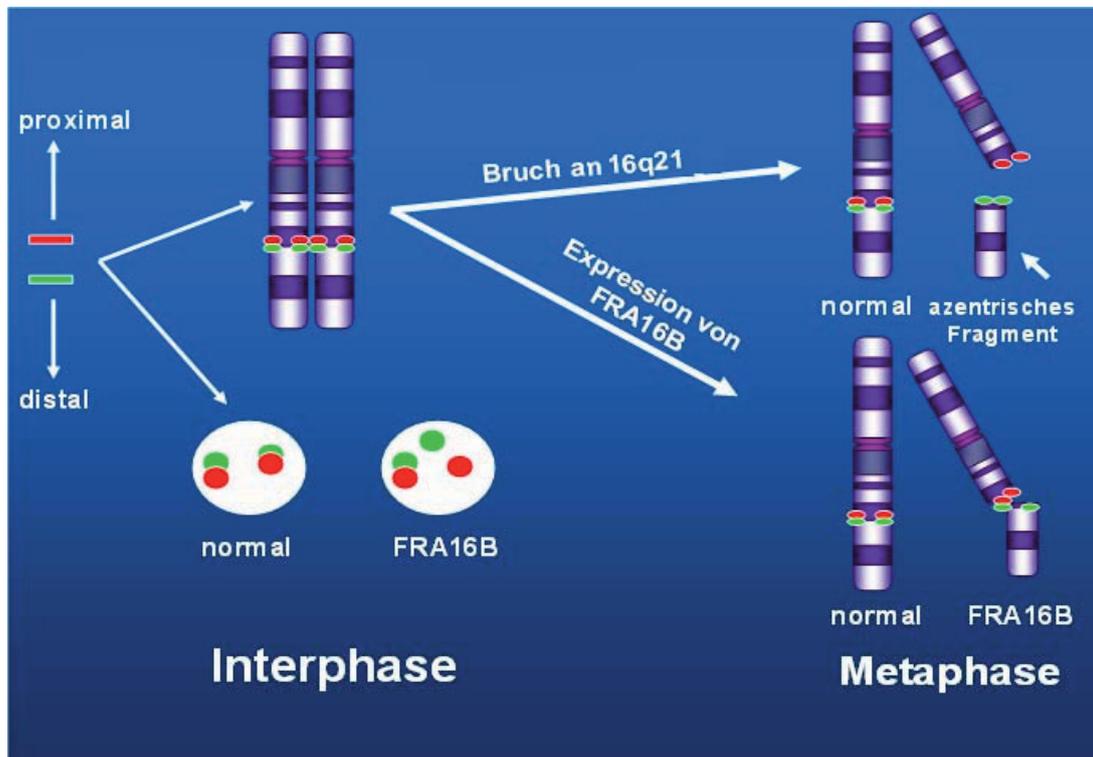
Für die Charakterisierung von fragilen Stellen bieten FISH-Analysen mit DNA-Sonden eine sinnvolle Ergänzung zu konventionellen chromosomalen Färbemethoden. Die vollständige Sequenzierung des Chromosoms 16 (Martin et al., 2004) und die besondere Struktureigenschaft der FRA16B-Region erlaubte es FISH-Sonden auszuwählen, die geeignet sind die Fragilität an 16q21 in Metaphasechromosomen und, insbesondere auch, Interphasekernen (besonders in G<sub>0</sub>-Phasen) zu untersuchen. Es wurden zwei BACs, die die FRA16B-Region flankieren, ausgewählt (Abbildung 3.9). Die Sequenz des proximalen BAC ist bekannt. Er enthält 7 Kopien der 33bp-Minisatelliten aus der FRA16B-Region. Die überlappende FRA16B-Region mit dem proximalen BAC beträgt ca. 4,5kb, das bedeutet, der proximale BAC liegt zu ca. 97% außerhalb der FRA16B-Region. Der distale BAC überlappt nicht mit der FRA16B-Region und liegt 10kb entfernt vom proximalen BAC.



**Abb. 3.9: Lage der ausgewählten BACs in der FRA16B-Region**

Die Länge des proximalen BAC (AC009055.10; RP11-256I9) mit bekannter Sequenz beträgt 170,8kb (63746672-63917502), an seinem distalen Teil überlappt er mit der FRA16B-Region (63 912 000-63 916500= 4500bp). Die Länge des distalen BAC (RP11-482M16) beträgt 149kb (63 927 589-64 076 659). Der distale BAC liegt in 10kb Entfernung zum proximalen BAC. FRA16B ist zwischen zwei STS-Markern (AFMA130YH5-AFMA219205) lokalisiert (siehe Pfeil) (Modifiziert nach: <http://genome.ucsc.edu>, hg18).

In normalen Lymphozyten sieht man die FISH-Signale der beiden ausgewählten BACs, die die FRA16B-Region flankieren, sowohl in Metaphasen als auch in Interphasen immer direkt nebeneinander. Findet ein Bruch an 16q21 statt, dann kommt es zu einer Trennung der beiden Signale (rot-grün) an der FRA16B-Region (Abbildung 3.10).



**Abb. 3.10: Schematische Darstellung der ausgewählten BAC-Proben und ihre Verteilung in den homologen Chromosomen 16 und Interphasekernen**

Die ausgewählten BAC-Proben lassen die FRA16B-Manifestation in den Metaphasechromosomen und den Interphasenkernen durch die Trennung der Signale beobachten.

### 3.3.2 FISH-Ergebnisse der FRA16B-Region in Metaphasen

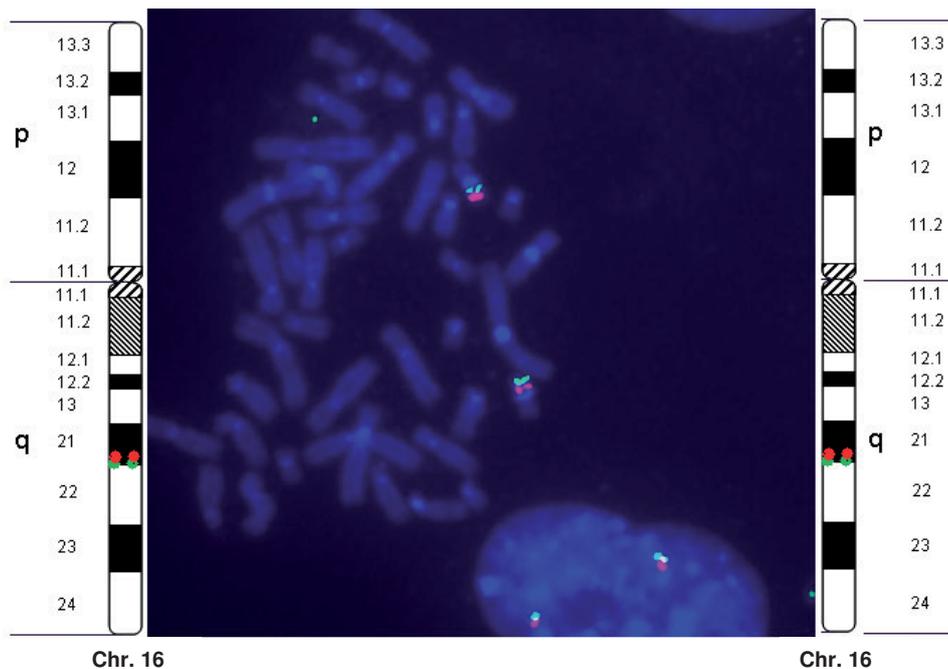
#### 3.3.2.1 Keine FRA16B-Expression

In normalen Zellen ohne FRA16B-Expression ist keine deutliche Trennung der roten und grünen DNA-Sonden in Interphasen und Metaphasen zu sehen (Abbildung 3.11a und 3.11b).



**Abb. 3.11a: FISH-Signale in Lymphozyten von normalen Zellen ohne FRA16B-Expression (rote/grüne-Signale zusammen)**

Fluoreszenz-markierte BAC-Sonden (RP11256I9=rot, RP11-482M16=grün), die die FRA16B-Region proximal bzw. distal flankieren.

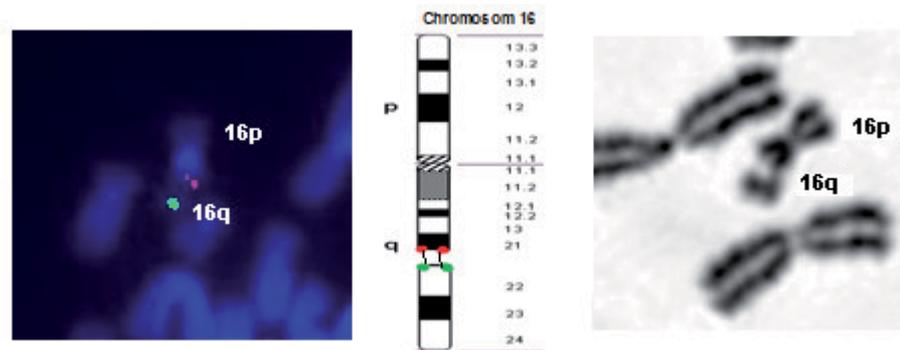


**Abb. 3.11b: FISH-Signale in normalen Fibroblasten ohne FRA16B-Expression (rote/grüne-Signale zusammen)**

Fluoreszenz-markierte BAC-Sonden (RP11-256I9=rot, RP11-482M16=grün), die die FRA16B-Region proximal bzw. distal flankieren.

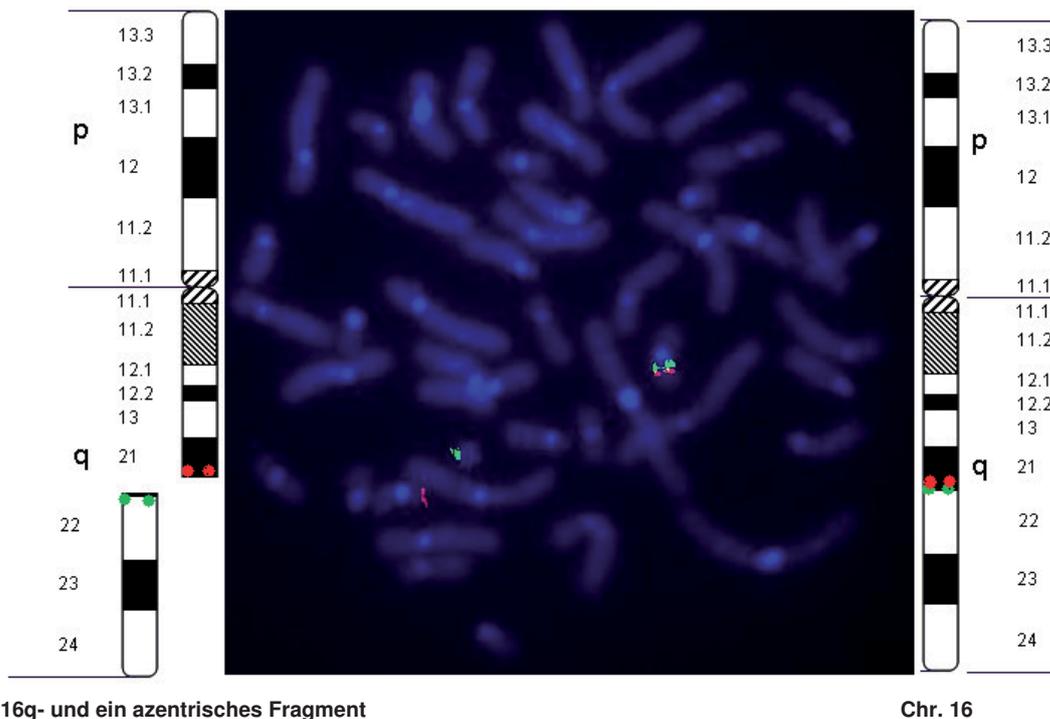
### 3.3.2.2 FRA16B-Expression

Bei FISH- und konventioneller zytogenetischer Analyse der FRA16B-Expression ist die Struktur von Chromosom 16 eindeutig darstellbar. (Abbildungen 3.12 -3.16).



**Abb. 3.12: Fragilität an Chromosom 16q21 (FRA16B-Expression)**

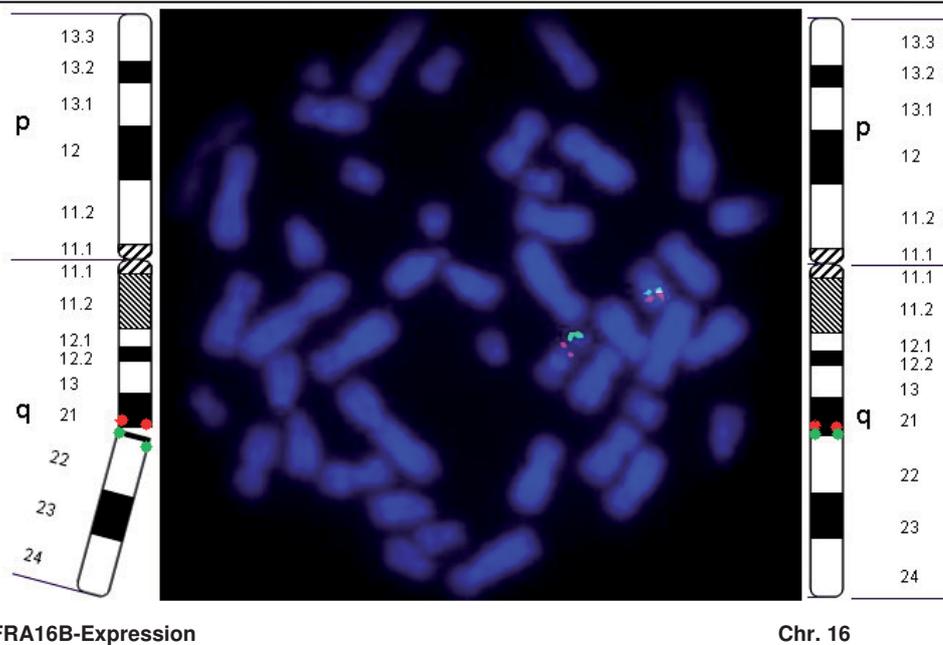
Die Bruchstelle ist noch mit Chr. 16 verbunden, links: FISH-Darstellung, rechts: konventionelle Giemsa-Färbung (BAC-Sonden: RP11-256I9=rot, RP11-482M16=grün).



**Abb. 3.13: FRA16B mit einem azentrischen Fragment**

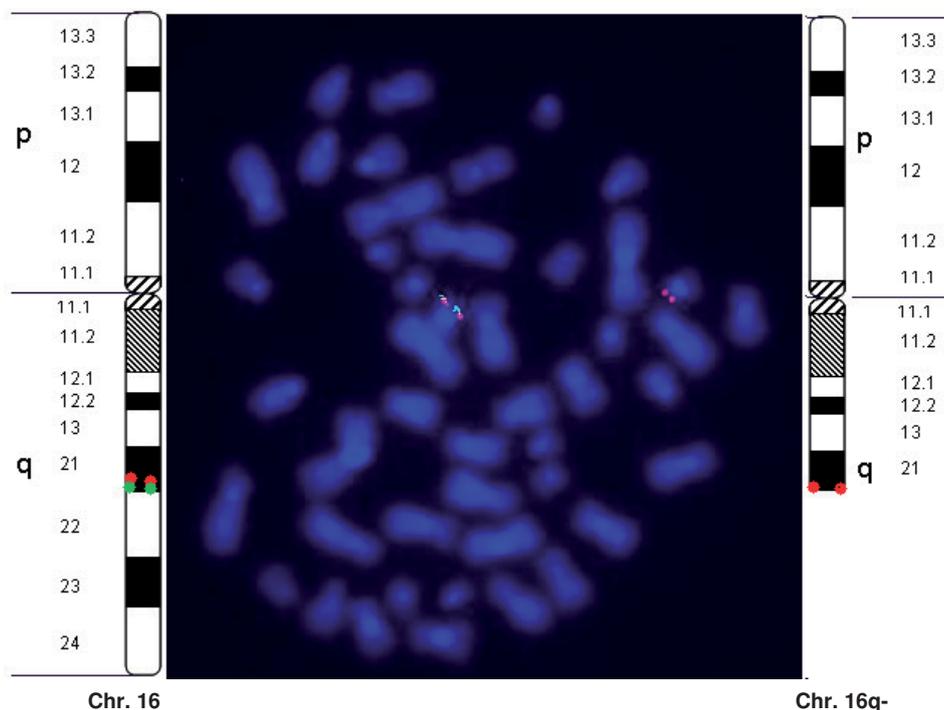
FISH-Signale zeigen einen kompletten Bruch an beiden Chromatiden des Chromosoms 16 mit einem azentrischen Fragment (ein Chromosomenbruchstück ohne Zentromer) in der Lymphozyten-Metaphase. Eine Fluoreszenz-markierte distale BAC-Sonde (grün) ist getrennt auf einem azentrischen Fragment zu sehen (BAC-Sonden: RP11-256I9=rot, RP11-482M16=grün).

Bei der FRA16B-Expression kann der Bruch nur an einem Chromatid stattfinden (Abbildungen 3.14).



**Abb. 3.14: FRA16B-Expression mit einem Bruch an einem Chromatid in einer Lymphozyten-Metaphase (BAC-Sonden: RP11-256I9=rot, RP11-482M16=grün).**

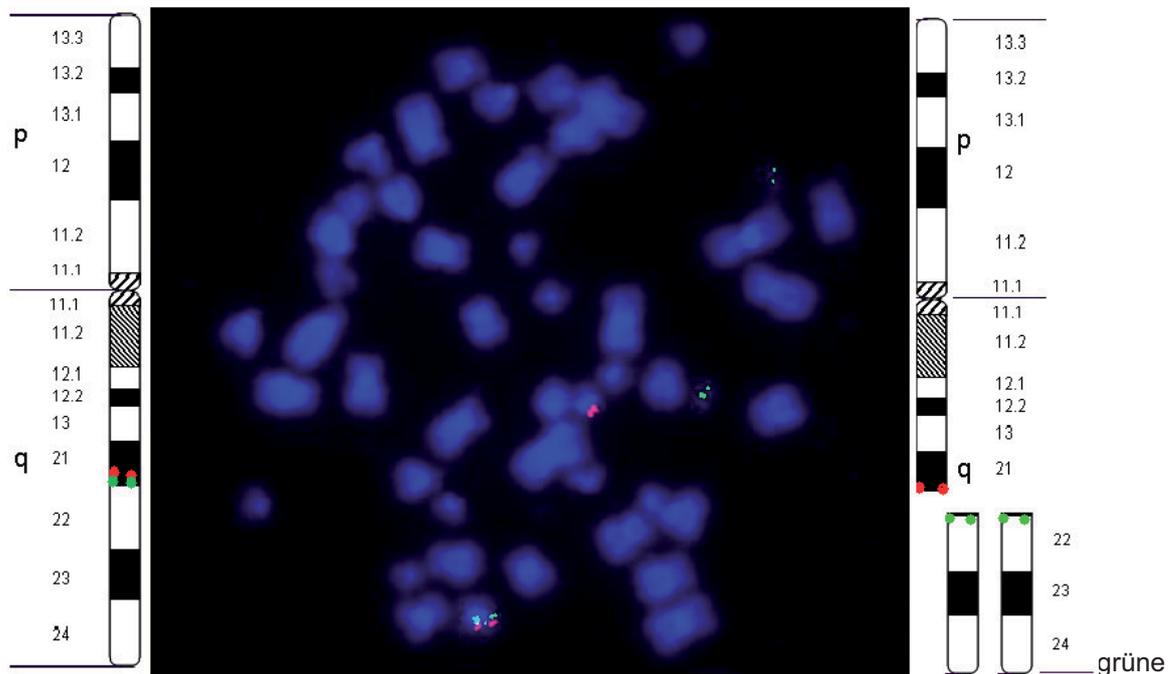
Wenn ein azentrisches 16q Fragment entsteht, kann es aufgrund fehlender Zentromersequenzen in der darauf folgenden Metaphase verloren gehen. Es entsteht eine Zelle mit terminaler Deletion an Chromosom 16q (Abbildungen 3.15).



**Abb. 3.15: Verlust des q-Arms von Chromosom 16 in einer Lymphozyten-Metaphase**

**Links:** Ein normales Chromosom 16 (Fluoreszenz-markierte BAC-Sonden (rote und grüne Signale liegen zusammen)). **Rechts:** Terminale Deletion an 16q (16q<sup>-</sup>)(das grüne Signal vom distalen BAC fehlt) (BAC-Sonden: RP11-256I9=rot, RP11-482M16=grün).

Diese Aberration (16q-) fand sich sehr selten, ebenso wie die Entstehung zweier azentrischer Fragmente, verursacht durch eine Fehlverteilung (Abbildung 3.16).

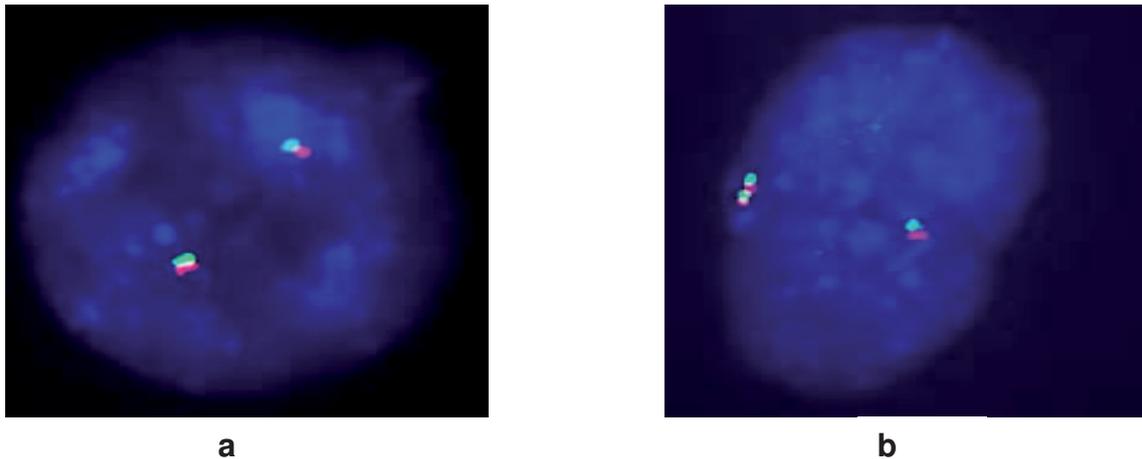


Signale Chr. 16 (zusammen). Rechts oben: Ein Chromosom 16 mit einem Chromosom 16q- und zwei azentrischen Fragmenten. Zwei azentrische Fragmente 16q. Fluoreszenz-markierte distale BAC-Sonden (grüne Signale) sind getrennt auf beiden azentrischen Fragmenten zu sehen (BAC-Sonden: RP11-25619=rot, RP11-482M16=grün).

### 3.3.3 FISH-Ergebnisse in Interphasen

#### 3.3.3.1 Keine FRA16B-Expression

Bei der FISH-Analyse zu FRA16B-Expression, besonders an Interphasen ist die strukturelle Zuordnung zum Chromosom 16 schwieriger und bedarf einer genaueren Erläuterung. In normalen Zellen bleiben die FISH-Signale in den Interphasen zusammen. Mit ausgewählten Fluoreszenz-markierten BAC-Sonden konnte ich die FRA16B-Region (Abbildungen 3.17a,b) kolokalisieren und eine FRA16B-Expression (Abbildungen 3.18a,b) auch in Interphasen nachweisen.

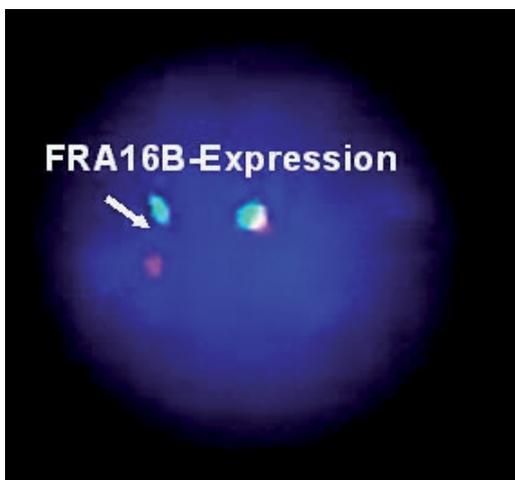


**Abb. 3.17a,b : Kolokalisation der flankierenden Proben: FISH-Signale in Interphasen ohne FRA16B-Expression**

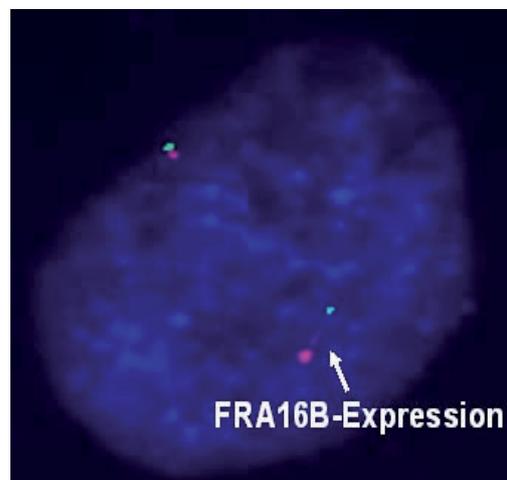
3.17a: FISH-Signale in Lymphozyten. 3.17b: FISH-Signale in dermalen Fibroblasten (BAC-Sonden: RP11-256I9=rot, RP11-482M16=grün).

### 3.3.3.2 Expression von FRA16B

Hier wurde untersucht, ob die FRA16B-Expression auch in Interphase-Zellen nachweisbar ist (Abbildungen 3.18a, 3.18b).



**Abb. 3.18a: FRA16B-Expression in der Lymphozyten-Interphase**



**Abb. 3.18b: FRA16B-Expression in dermalen Fibroblasten (Interphase)**

### 3.3.4 Zusammenfassung der FISH-Ergebnisse

Der Nachweis der FRA16B-Expression ist mit konventionellen zytogenetischen Färbemethoden nur an Metaphasen möglich. Dabei ist der Nachweis der FRA16B-Brüchigkeit besonders dann ungenau, wenn die Chromosomen nach Giemsa-Färbung oder GTG-Bänderung eine starke Quellung aufweisen oder Metaphasen

nicht hoch aufgelöst sind. FISH-Analysen zeigen hier jedoch, dass molekularzytogenetische Methoden den Nachweis der FRA16B-Expression zweifelsfrei in Interphasen und Metaphasen ermöglichen.

Um die zytogenetischen Ergebnisse der FRA16B-Expression mit FISH-Ergebnissen in Metaphasen zu vergleichen und um die Induzierbarkeit der FRA16B-Expression in Interphasekernen zu untersuchen, wurden die Metaphasen und Interphasen der Probanden und negativen Kontrollen bei nativen Zellen, bei Standardkultivierung und bei einem Einsatz von erhöhter Konzentration von DAPI ausgewertet. Für die FISH-Analyse an Interphasekernen und Metaphasechromosomen wurden folgende Präparate der Probanden ausgewertet: G<sub>0</sub>-Phase (nicht proliferierende Zellen), Standardkultivierung (ohne DAPI-Behandlung), Standardkultivierung nach Einsatz verschiedener DAPI-Konzentration ((DAPI-I: 5µg/ml DAPI), (DAPI-II: 10µg/ml DAPI) und DAPI-III: 20µg/ml DAPI)) (Tabelle 3.8). Die untersuchten Interphasen und Metaphasen der negativen Kontrollen wiesen bei Standardkultivierung und nach DAPI-Behandlung keine FRA16B-Expression auf.

| Probanden →                                       | P1<br>Lymph.   | P1<br>Fibr. | P2<br>Lymph. | P3<br>Lymph. | P4<br>Lymph. | P5<br>Lymph. | P6<br>Lymph. |
|---|--|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Zellphasen ↓                                      | Auswertung:<br>50 Metaphasechromosomen und 100 Interphasekerne [%] |             |              |              |              |              |              |
| Go-Phase<br>(native Zellen)                       | 8  | NM          | 5            | 17           | 7            | 12           | 13           |
| Metaphasechromosomen<br>bei Standardkultivierung  | 18   | 0           | 13           | 16           | 0            | 0            | 13           |
| Interphasekerne<br>bei Standardkultivierung       | 12   | 0           | 8            | 8            | 6            | 4            | 12           |
| Metaphasechromosomen<br>bei DAPI-I Kultivierung   | 40   | 0           | 33           | KP           | 40           | 14           | 63           |
| Interphasekerne<br>bei DAPI-I Kultivierung        | 16   | 8           | 10           | KP           | 14           | 6            | 20           |
| Metaphasechromosomen<br>bei DAPI-II Kultivierung  | 56   | 14          | 66           | KP           | 63           | 16           | 68           |
| Interphasekerne<br>bei DAPI-II Kultivierung       | 18   | 10          | 24           | KP           | 18           | 8            | 26           |
| Metaphasechromosomen<br>bei DAPI-III Kultivierung | 66   | KM          | 92           | KP           | 76           | 47           | 89           |
| Interphasekerne<br>bei DAPI-III Kultivierung      | 24   | 16          | 34           | KP           | 26           | 14           | 30           |

**Tab. 3.8: Zusammenfassung der FISH-Analysen bei Probanden**

Mit zunehmender DAPI-Konzentration erhöht sich die FRA16B-Expression bei allen Probanden in Interphasen und Metaphasen; dabei fällt die Zunahme der FRA 16B-Expression in Interphasen deutlich geringer aus als in den Metaphasen. Die Separation der Fibroblasten-Zellen aus den entnommenen Hautgeweben ließ sich aus technischen Gründen nicht durchführen. Eine direkte FISH-Analyse an den G<sub>0</sub>-Interphasen der Fibroblasten bei Proband 1 war damit nicht möglich gewesen. Bei Proband 1-Fibroblasten waren nach DAPI-III-Behandlung keine Metaphasen auffindbar und die Lymphozyten des Probanden 3 zeigten nach DAPI-Behandlung keine Proliferation.

G<sub>0</sub>-Interphasekerne: Interphasekerne frisch isolierter peripherer Lymphozyten der untersuchten Probanden ohne Kultivierung. Standardkultivierung: Kultivierung unter Standardbedingungen, ohne DAPI-Einsatz. DAPI-Kultivierung: Kultivierung bei Standardbedingungen mit DAPI-Behandlung. DAPI-I: 5µg DAPI/ml. DAPI-II: 10µg/ml DAPI. DAPI-III: 20µg/ml DAPI. Lymph.: Lymphozyten. Fibr.: Fibroblasten NM: nicht möglich. KM: keine Metaphase. KP: keine Zellproliferation.

Nach diesen FISH-Analysen konnte gezeigt werden:

**I. G<sub>0</sub>-Interphasen ohne Zellkultivierung**

G<sub>0</sub>-Interphasen, direkt aus frischem peripheren Blut ohne Kultivierung isoliert, zeigten bei allen untersuchten Probanden eine unterschiedliche Brüchigkeit für die FRA16B-Region auf. Während Proband 3 (klinisch auffällig) mit 17% eine deutliche FRA16B-Expression aufweist, zeigte Proband 4 (Mutter von Proband 3) nur 7%. Dieser Unterschied ist zwischen Proband 1 und Proband 2 (Mutter von Proband 1) deutlich geringer (8% resp. 5%).

**II. Metaphasen**

Die FISH-Analysen zur FRA16B-Expression in Metaphasen bestätigen die zytogenetischen Ergebnisse mit konventionellen Färbemethoden. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der Zunahme der DAPI-Konzentration und der Erhöhung der FRA16B-Expression. Während nach Standardkultivierung die Metaphasenchromosomen der Fibroblasten von Proband 1, Lymphozyten von Proband 4 und bei Proband 5 keine spontane FRA16B-Expression aufweisen, zeigte sich bei den anderen Probanden eine FRA16B-Expression von 13-18%. Während die spontane FRA16B-Expression nach Standardkultivierung bei Proband 1 und Proband 2 (Mutter von Proband 1) keinen großen Unterschied zeigte (18% resp. 13%), ist ein Unterschied bei Proband 3 und Proband 4 (Mutter von Proband 3) deutlich zu erkennen (16% resp. 0%). Die FRA16B-Expressionsrate erhöht sich zwar bei Proband 5 mit zunehmender DAPI-Konzentration, fällt aber geringer aus im

Vergleich zu anderen Probanden (nur bis 47% bei DAPI-III). Die Metaphasechromosomen und Interphasekerne der dermalen Fibroblasten von Proband 1 (bei Standardkultivierung) zeigten nach den FISH-Analysen weder eine spontane noch eine induzierte FRA16B-Expression. Die FRA16B-Expressionsraten an den Metaphasechromosomen dermalen Fibroblasten ist deutlich geringer als bei Lymphozyten des Probanden 1. Nach der DAPI-III-Behandlung ließen sich keine dermalen Metaphasechromosomen darstellen. Es wurde jedoch eine FRA16B-Expression von 16% in den Interphasen gefunden. Außerdem wurden bei dermalen Metaphasechromosomen keine azentrischen Fragmente, doppelte Chromatidenbrüche oder seltene Formen der FRA16B-Brüchigkeit, die in den Lymphozyten von Proband 1 gefunden wurden, festgestellt.

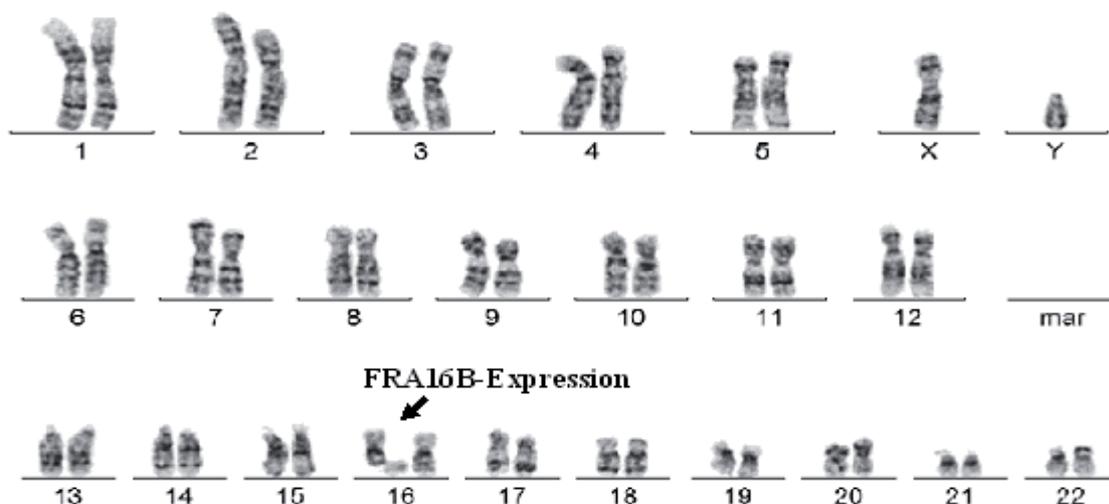
### III. Interphasen (nach Zellkultivierung)

Auch in kultivierten Zellen zeigte sich bei zunehmender DAPI-Konzentration eine Erhöhung der FRA16B-Expression, allerdings waren die FRA16B-Expressionsraten in den Interphasen bei allen Probanden deutlich geringer als in den Metaphasen.

## 3.4 Analyse von Proband 3 und seinen Eltern

### 3.4.1 Zytogenetische und FISH Ergebnisse

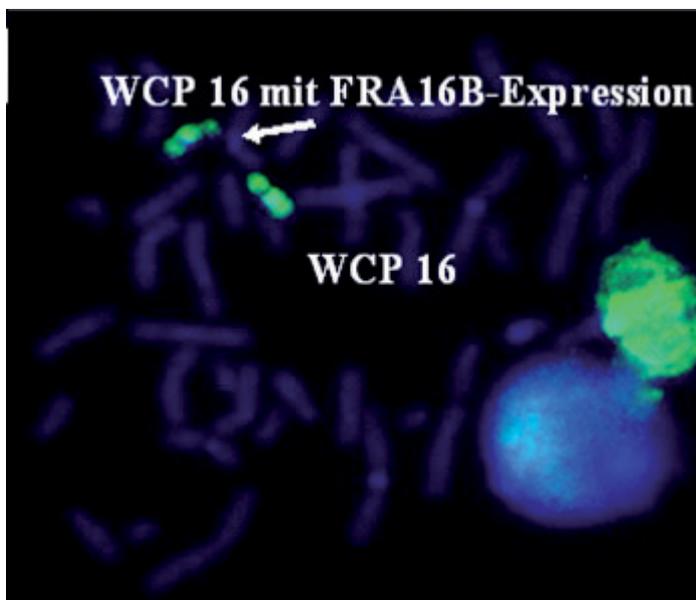
Proband 3 ist klinisch auffällig. Die zytogenetische Analyse des Probanden 3 zeigte eine spontane FRA16B-Expression in 16% in Metaphasenchromosomen (Abbildung 3.19), die ich in der FISH-Analyse nachweisen konnte.



**Abb. 3.19: Karyotypisierung von Proband 3**

Die einzige Auffälligkeit ist hier ein Chromatidbruch an 16q21. Karyotyp: 46,XY,fr(16)(q21)[50]

Bei der Kultivierung der Zellen mit DAPI (induzieren FRA16B-Expression) war der Vater des Probanden 3 unauffällig, bei der Mutter zeigte sich jedoch ebenfalls eine induzierbare FRA16B-Expression. Ein Hinweis dafür, dass dieses aberrante Chromosom von mütterlicher Seite stammt und nicht *de novo* ist. Um zu analysieren, ob die FRA16B-Expression beim Kind mit einer interchromosomalen Umstrukturierung assoziiert ist, wurde eine FISH-Analyse mit einer WCP-Sonde (*whole chromosome painting*) von Chromosom 16 durchgeführt. Die Analyse erbrachte keinen Hinweis für eine balancierte Translokation zwischen dem Chromosom 16 und anderen Chromosomen oder unbalancierten Translokationen bei dem Proband 3 und seinen Eltern (Abbildungen 3.20). Um zu analysieren, ob die FRA16B-Expression mit einer 16q21→qter Deletion assoziiert ist, wurde eine FISH-Untersuchung der Subtelomere (16p+16q) von Proband 3 und seinen Eltern durchgeführt. Es wurden hier 150 Interphasen und 50 Metaphasen untersucht. Bei dem Proband 3 wurde bei 2/150 Interphasen und bei 1/50 (insgesamt ca. 1,5%) und bei der Mutter nur 3/150 Interphasen (ca. 1,5%) eine 16q-Deletion festgestellt. Bei dem Vater wurde keine 16q-Deletion festgestellt.



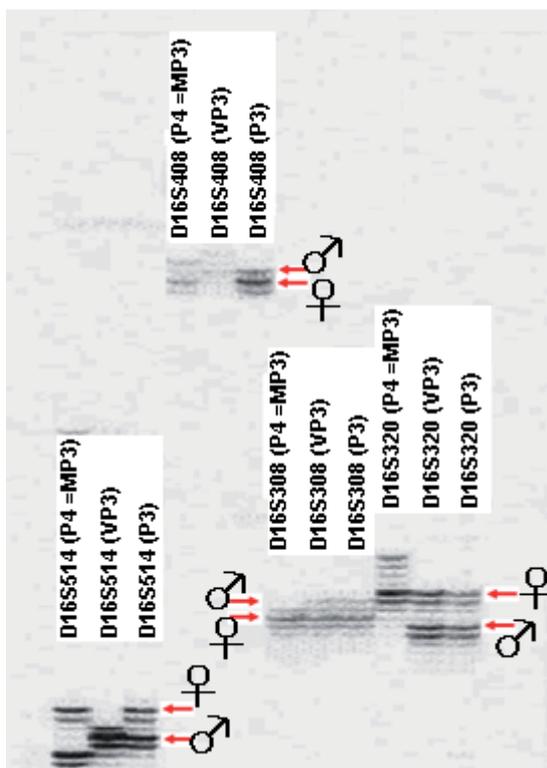
**Abb. 3.20: WCP (16); Proband 3**

Es ist keine Translokation zwischen Chromosom 16 und anderen Chromosomen feststellbar. Der Pfeil zeigt eine FRA16B-Expression (WCP-Sonde: von Fa. Vysis).

### 3.4.2 Mikrosatelliten-Analyse

Uniparentale Disomie bedeutet, dass ein Individuum beide Allele eines Chromosoms von nur einem Elternteil geerbt hat. Dabei spricht man von Isodisomie, wenn es sich um das gleiche elterliche Chromosom in duplizierter Form handelt, bzw. von Heterodisomie, wenn die beiden verschiedenen Exemplare eines Chromosoms von nur einem Elternteil stammen. Bei den meisten Chromosomen kommt dieser Situation vermutlich keine pathologische Bedeutung zu. Im Zusammenhang mit genetischem Imprinting (Prägung) kann eine Disomie jedoch eine Überexpression oder einen Ausfall der genetischen Expression bewirken (z.B. bei Angelman-Syndrom oder Prader-Willi-Syndrom auf Chromosom 15). In einem solchen Fall können sich die maternalen und paternalen Merkmale nicht gegenseitig ergänzen.

Um eine upd16 (uniparentale Disomie von Chr. 16) bezogen auf FRA16B-Expression auszuschließen, wurde eine Mikrosatelliten-Analyse an Chromosom 16 bei Proband 3 und seinen Eltern durchgeführt. Dafür wurden vier Mikrosatelliten Marker (D16S514, D16S408, D16S308, D16S320) des Chromosoms 16 ausgewählt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 6%igen Polyacrylamidgel (PAA-Gel) aufgetrennt. Die Ergebnisse zeigen, dass für alle vier Marker des Probanden 3 ein Allel von der Mutter und ein Allel vom Vater stammten (Abbildung 3.21). Damit konnte eine uniparentale Disomie von Chromosom 16 (upd(16)) ausgeschlossen werden.



**Abb. 3.21: Die Ergebnisse der PCR-Analyse der vier Mikrosatelliten Marker**

Die Ergebnisse zeigen, dass die Allele von beiden Eltern stammen. Die stärkere obere Bande (als Beispiel rote Pfeile bei Proband 3) entspricht dem Hauptallel, darunter zwei schwächere „Stotterbänder“. Die Stotterbänder direkter repetitiver Dinukleotide entstehen vermutlich aufgrund falscher Basenpaarungen bei gegeneinander verschobenen Strängen (Hauge und Litt, 1993). P3: Proband 3, P4: Proband 4, MP3: Mutter von Proband 3, VP3: Vater von Proband 3, ♀: kennzeichnet das mütterliche Allel, ♂: kennzeichnet das väterliche Allel.

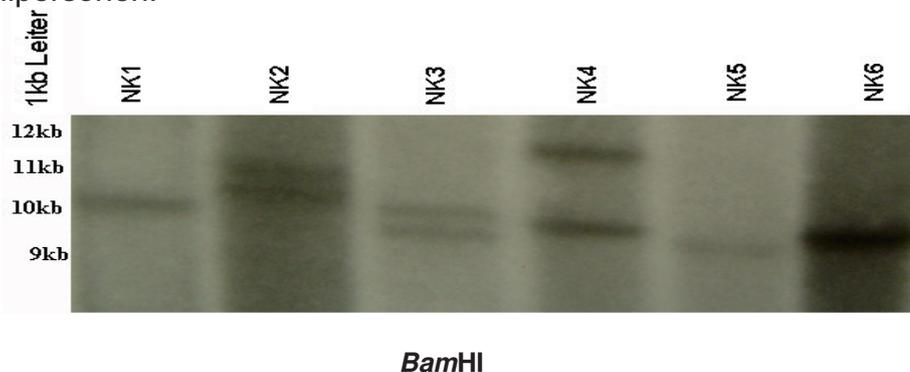
## 3.5 Southern-Blot und Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) der FRA16B-Region

### 3.5.1 Southern-Blot Untersuchungen der FRA16B-Region

Um einen Überblick über die Allelverteilung und Fragmentgröße der FRA16B-Region zu erhalten, wurde die genomische DNA von Kontrollpersonen aus Blut und FRA16B-Trägern (Probanden) aus immortalisierten Lymphozyten isoliert und nach Behandlung mit verschiedenen Restriktionsenzymen durch Southern-Blot Analyse mit entsprechenden radioaktiv markierten Markern analysiert.

#### 3.5.1.1 Kontrollpersonen

Die genomische DNA von 6 negativen Kontrollen wurde zuerst mit *Bam*HI verdaut. Der Southern-Blot wurde mit der radioaktiv markierten Sonde 1 (siehe Abbildung 2.5) hybridisiert. Die Variabilität der Länge der FRA16B-Fragmente bei den 6 negativen Kontrollen liegt, wegen der Existenz von Minisatelliten-DNA und anderen VNTRs (*variable number tandem repeats*), die in der FRA16B-Region vorkommen, zwischen 9,5kb und 12kb (Abbildung 3.22). Die zytogenetischen und FISH-Analysen zeigten keine FRA16B-Manifestation (mit oder ohne DAPI-Behandlung) bei diesen Kontrollpersonen.



**Abb. 3.22: Southernblotanalyse zum Nachweis der Variabilität der FRA16B-Region bei negativen Kontrollen**

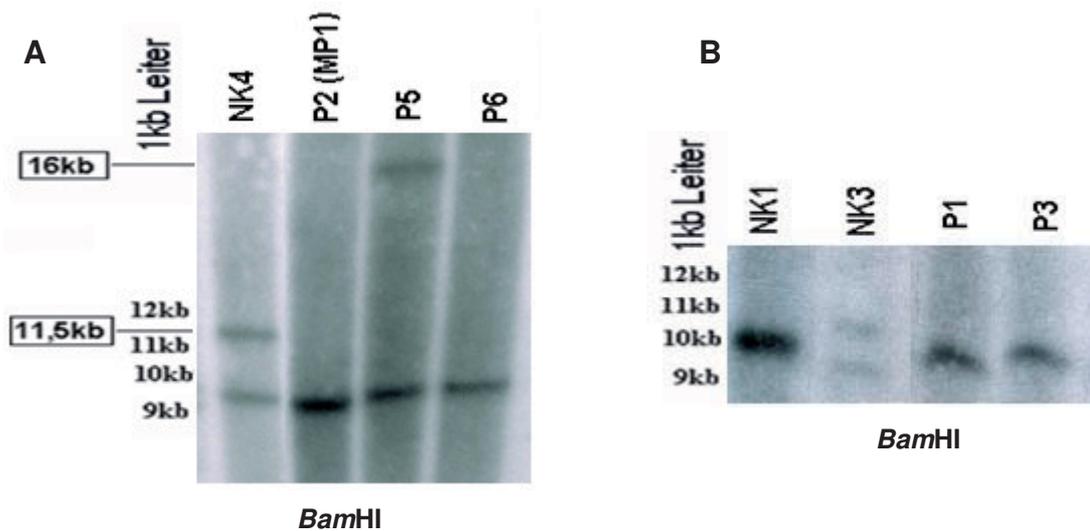
Die Variabilität der FRA16B-Region liegt bei den untersuchten negativen Kontrollpersonen zwischen ca. 9,5-12kb. NK: negative Kontrollen.

#### 3.5.1.2 FRA16B-Probanden

##### A. Gelelektrophorese:

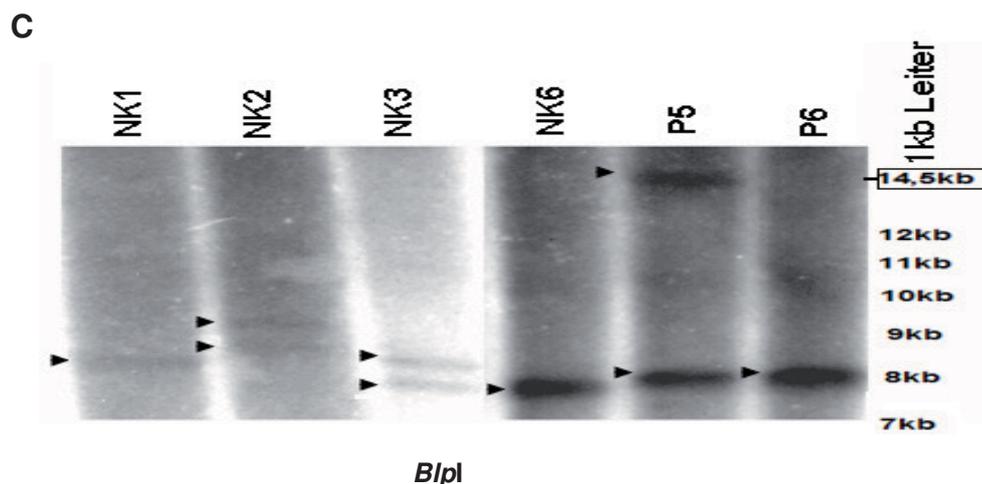
Die genomische DNA der Probanden wurde mit *Bam*HI geschnitten und der radioaktiv markierten Sonde 1 (siehe Abbildung 2.5) hybridisiert (Abbildung 3.23A,

und 3.23B). Zusätzlich wurde bei einigen negativen Kontrollen und den Probanden 5 und 6 mit dem Enzym *BlnI* geschnitten und mit der radioaktiv markierten Sonde 8 (Siehe Abbildung 2.5) hybridisiert (Abbildung 3.23C). Während die Probanden 1, 2, 3 und 6 nur eine Bande aufweisen, konnte bei Proband 5 eine expandierte Bande sowohl in der mit *Bam*HI (Abbildung 3.23A) als auch *BlnI* geschnittenen DNA (Abbildung 3.23C) nachgewiesen werden.



**Abb. 3.23A/B: FRA16B-Region bei Probanden**

Southern-Blot Analyse von Probanden und einigen negativen Kontrollen. Die Probanden 1, 2, 3, 6 zeigen nur eine Bande bei ca. 9,5kb. Die zweite Bande des Probanden 5 wurde anhand des Größenmarkers berechnet (~16kb). Proband 4 wurde hier nicht analysiert. NK: negative Kontrolle, P: Proband, MP1: Mutter von Proband.



**Abb. 3.23C: Variabilität der FRA16B-Region bei den Probanden 5 und 6 und einigen Kontrollen**

Während Proband 6 und NK 6 nur eine Bande aufweisen, zeigten die NK1, NK2, NK3 und Proband 5 eine Allelvariabilität von 8-14,5kb. Die zweite Bande des Probanden 5 wurde anhand des Größenmarkers berechnet (~14,5kb). Die Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet. NK: negative Kontrolle, P: Proband.

Der Unterschied in der Fragmentgröße zwischen den aus den Sequenzdaten abgeleiteten Werten (Abbildung 2.5) und den experimentell durch die Southern-Blot Analyse erhaltenen Größen bei Abbildungen 3.22, 3.23A/B/C, 3.27 und 3.28 kann verschiedene Ursachen haben (siehe Diskussion). Dieser Unterschied hat aber keinen Einfluss auf die Auswertung der Expansionslänge der FRA16B-Region der analysierten Personen.

Wie man in den Abbildungen 3.23A, 3.23B und 3.23C feststellt, sieht man bei Proband 1, Proband 2, Proband 3 und Proband 6 nur eine Bande. Das zweite Allel hat entweder die gleiche Größe wie das erste oder ist sehr groß, so dass man es nicht im Southern-Blot identifizieren kann (siehe Abbildungen 3.24-3.26). Sehr große DNA-Fragmente können durch die Scherkräfte bei der DNA-Präparation fragmentiert werden. Um zu untersuchen, ob die DNA während der Isolierung geschert wurde, wurde die isolierte genomische DNA auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen und durch PFGE getrennt. Nach der Auftrennung konnte gezeigt werden, dass die genomische DNA zwischen 50 und 300kb groß ist. Die Qualität der DNA war damit für die Southern-Blot Analyse zum Nachweis großer FRA16B-Expansionen bis ca. 50kb ausreichend.

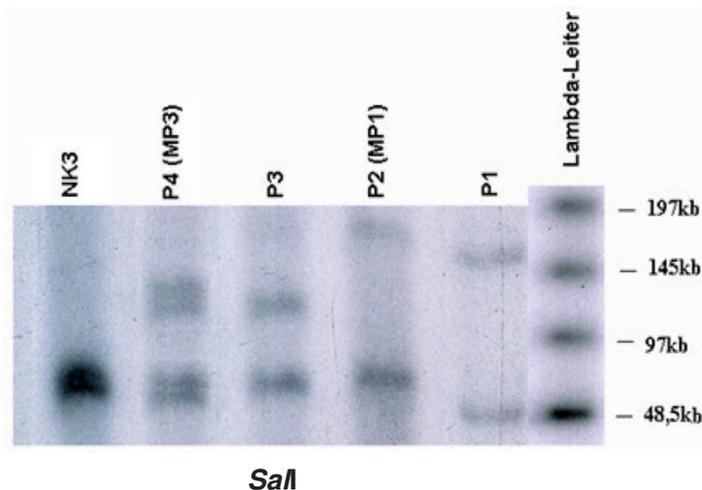
### 3.5.2 PFGE-Analyse der FRA16B-Region

Für die Messung der Länge expandierter Allele von FRA16B-Trägern, die mit der herkömmlichen Gelelektrophorese nicht dargestellt werden können, ist die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) gut geeignet. Aus Blut wurden die Lymphozyten isoliert und in einer „*low melt*“-Agarose eingeschlossen. Um eine mögliche somatische Instabilität des expandierten Allels zu untersuchen, wurde bei Proband 1 DNA aus Hautfibroblasten analysiert. Hautfibroblasten von Proband 1 wurden aus mehreren Subkultivierungen mit Hilfe von Trypsin isoliert und nach der mikroskopischen Zellzahl-Bestimmung wie bei Lymphozyten in einer „*low melt*“-Agarose eingeschlossen. Die weiteren Behandlungen, wie DNA-Isolierung und Verdau, erfolgten in den Agaroseblöcken, so dass die genomische DNA nicht geschert wird. Die Restriktionsfragmente in den Agaroseblöcken wurden in einem 1%igen Agarosegel mit Hilfe der PFGE nach ihrer Größe getrennt und mit der radioaktiv markierten Sonde 1 (siehe Abbildung 2.5) hybridisiert. Zuerst wurden verschiedene Restriktionsenzyme auf ihre Eignung für die PFGE-Analyse der

FRA16B-Region untersucht. *BstEII* und besonders das selten schneidende, CpG-methylierungssensitive Enzym *SalI* erwiesen sich als am besten geeignet.

Ausgewählte PFGE-Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.24-3.26 dargestellt. Die Größe der Wildtyp- und expandierten Allele wurden anhand des Größenmarkers abgeschätzt. Der Unterschied in der Fragmentgröße zwischen den aus den Sequenzdaten abgeleiteten Werten und den experimentell durch die PFGE-Analyse erhaltenen Größen bei Abbildungen 3.24-3.26 kann verschiedene Ursachen haben (siehe Diskussion). Relevant ist hier der Unterschied zwischen den beiden Allelen, der einen Hinweis auf die Größe der Locus-Expansion gibt. Die Ergebnisse zeigen keine Unterschiede in der Expansion zwischen Fibroblasten- und Lymphozyten-DNA von Proband 1 und der Lymphozyten-DNA von Proband 2 (kein intrafamiliärer und somatischer Expansionsunterschied). Die unterschiedliche Höhe der Banden von P1 und P2 in Abbildung 3.24 ist durch eine unterschiedliche DNA-Menge bedingt (siehe Diskussion). Die Wildtyp-Allele von P1 und P2, wie bei Abbildungen 3.23A/B gezeigt, haben die gleiche Fragmentgröße von ~9,5kb. Weitere PFGE-Analysen (Bilder nicht gezeigt) bestätigten dieses Ergebnis.

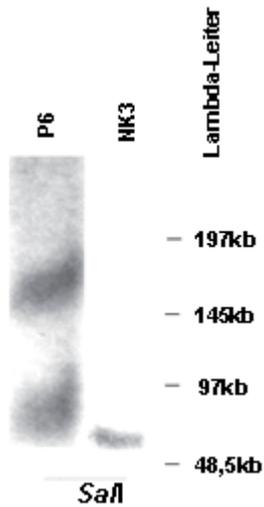
Auch für Proband 3 und Proband 4 gilt kein intrafamiliärer Expansionsunterschied. Damit kam es bei der Weitergabe von der Mutter auf die Tochter bzw auf den Sohn nicht zu einer Größenänderung des expandierten Fragmentes.



**Abb. 3.24: Expansionslänge der FRA16B-Region im Lymphozyten-Genom von Proband 1, Proband 2, Proband 3, Proband 4 und negative Kontrolle 3**

Die Abbildung zeigt, dass das expandierte Allel von Proband 1 bei ca. 160kb, bei Proband 2 bei ca. 180kb, bei Proband 3 und Proband 4 bei ca. 120kb liegt. Der Effekt der Doppelbanden bei Proband 4 ist wahrscheinlich auf einen Artefakt beim Beladen des PFGE-Gels mit dem DNA-haltigen Agaroseblock zurückzuführen. Kontrolle 3 zeigt nur eine stark ausgeprägte Bande bei ca. 70kb. Das Wildtyp-Allel liegt bei alle Probanden außer Proband 1 bei ca. 70kb. Das Wildtyp-Allel liegt bei Proband 1 liegt bei ca. 48,5kb. Die aufgetragene DNA-Menge bei Proband 1 ist ca. die Hälfte wie bei den anderen Probanden. P: Proband, MP: Mutter von Proband, NK: negative Kontrolle.

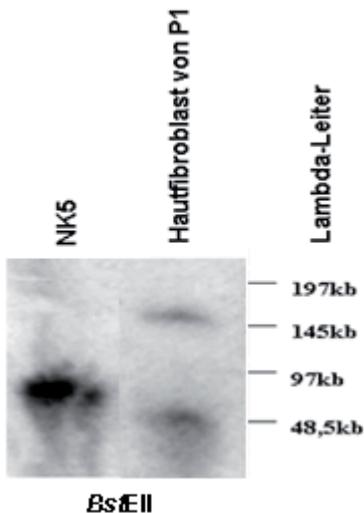
Das expandierte Fragment bei Proband 6 wurde auf etwa 160kb bestimmt. (Abbildung 3.25).



**Abb. 3.25: Expansionslänge der FRA16B-Region im Lymphozyten-Genom von Proband 6 und negative Kontrolle 3**

Die Abbildung zeigt, dass das expandierte Allel von Proband 6 eine Größe von ca. 160kb hat. Negative Kontrolle 3 zeigt nur eine Bande bei ca. 70kb. Das Wildtyp-Allel liegt bei beiden bei ca. 70kb.

Die Größe des Wildtyp-Allels aus Fibroblasten-DNA von Proband 1 wurde mit ca. 48,8kb und das expandierte Allel mit ca. 160kb abgeschätzt. Es zeigte sich damit keine Veränderung der FRA16B-Region des Probanden 1 gegenüber DNA aus Lymphozyten. (Abbildung 3.26). Die negative Kontrolle 5 zeigte nur eine Bande bei ca. 70kb. Die Homozygotie der FRA16B-Region bei Kontrolle 5 konnte damit in der PFGE nachgewiesen werden. Vergleicht man die Größe der beiden Wildtyp-Allele, dann stellt man fest, dass die aufgetragene DNA-Konzentration eine Rolle bei dem Laufverhalten spielt.



**Abb. 3.26: Expansionslänge der FRA16B-Region in Hautfibroblasten von Proband 1**

Abbildung 3.26 zeigt, dass das expandierte Allel der Fibroblasten-DNA bei ca. 160kb und das Wildtyp-Allel bei ca. 48,5kb liegt. Die Kontrolle 5 zeigt nur eine Bande bei ca. 70Kb. P1: Proband 1, NK5: negative Kontrolle 5.

Die Größen der verschiedenen expandierten Allele bei den Probanden sind in Tabelle 3.9 dargestellt.

| Probanden                           | Länge der Expansion an FRA16B-Region in Lymphozyten ( $\pm 15\text{kb}$ ) |
|-------------------------------------|---|
| Proband 1                           | ~110kb  |
| Proband 1                           | ~110kb (DNA aus Hautfibroblasten)   |
| Proband 2<br>(Mutter von Proband 1) | ~110kb  |
| Proband 3                           | ~50kb   |
| Proband 4<br>(Mutter von Proband 3) | ~50kb   |
| Proband 5                           | ~6,5kb (Ergebnisse der Southern-Blot Analyse von Abbildung 3.23A/C)       |
| Proband 6                           | ~90kb   |

Tab. 3.9: Zusammenfassung der FRA16B-Expansionslänge bei den Probanden

### 3.6 Analyse des FRA16B-Locus bei 61 Kontrollpersonen

Um die normale Variabilität der FRA16B-Region innerhalb weiterer Kontrollpersonen zu untersuchen, wurde die vorhandene genomische DNA von 61 Kontrollen mit *EcoRI* verdaut und nach dem Blot auf eine Nylon-Membran mit einer radioaktiv markierten Sonde 8 (siehe Abbildung 2.5) hybridisiert (Abbildung 3.27).

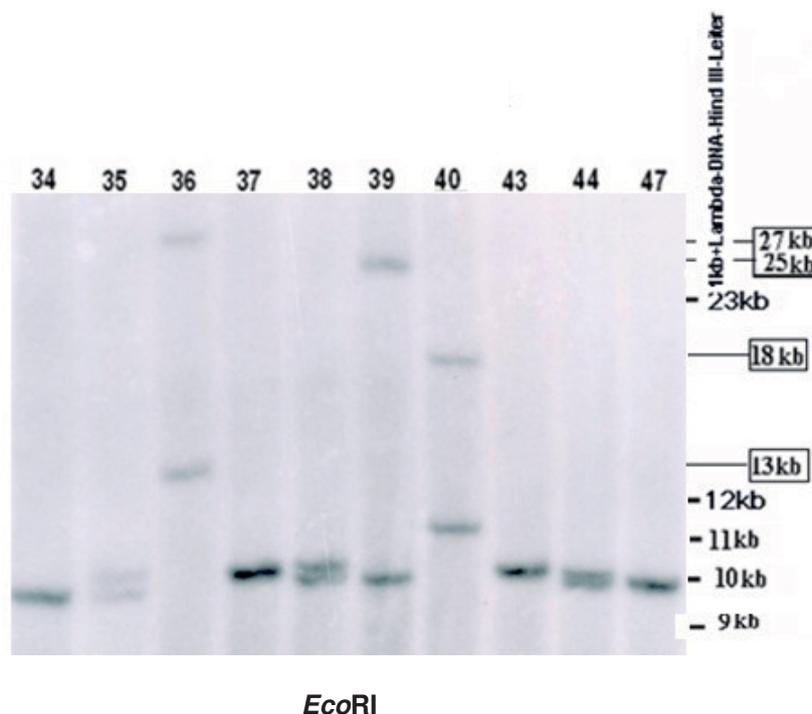


Abb. 3.27: Die Variabilität der FRA16B-Region bei Kontrollpersonen

Nr. 36 und 40 zeigen für beide Allele eine FRA16B-Expansion mit unterschiedlicher Länge. Die beiden Banden der Kontrollen 36 und 40 und die zweite Bande der Kontrolle 39 wurden anhand des Größenmarkers berechnet. Die Größe der expandierten Fragmente wurde für die Kontrolle 36 auf 13 und 27kb bestimmt, für Kontrolle 39 auf 25kb und Kontrolle 40 auf 11,5 und 18kb.

Durch die Ergebnisse der Southern-Blot Analyse der 61 Kontrollpersonen mit dem Enzym *EcoRI* lassen sich die FRA16B-Allele nach ihrer Fragmentgröße und Häufigkeit in folgende 3 Gruppen unterteilen (Tabelle 3.10):

| Gruppe  | Allel-Größe    | Anzahl der Allele (n) | Anteil (Prozent) |
|---|----------------|-----------------------|------------------|
| <b>A</b><br>Keine Locus-Expansion<br>(häufigstes Allel) | 9,5-10kb       | n=96                  | 78,7%            |
| <b>B</b><br>Kurze Locus-Expansion                       | >10kb<br>≤11kb | n=17                  | 13,9%            |
| <b>C</b><br>Intermediäre<br>Locus-Expansion             | >11kb<br>≤27kb | n=9                   | 7,4%             |

**Tab. 3.10: Allelverteilung und Klassifikation der FRA16B-Region bei 61 untersuchten Kontrollen (122 Allele)**

Die Ergebnisse der Southern-Blot Analyse von 61 Kontrollen sind in Tabelle 3.11 zusammengefasst.

| Lab. Nr. | Klasse | Lab. Nr. | Klasse | Lab. Nr.     | Klasse             |
|----------|--------|----------|--------|--------------|--------------------|
| 1        | A/A    | 25       | A/A    | 52           | A/A                |
| 2        | A/B    | 26       | A/A    | 53           | A/B                |
| 3        | A/A    | 27       | A/A    | 54           | A/B                |
| 4        | A/C    | 29       | A/A    | 55           | A/B                |
| 5        | A/C    | 30       | A/A    | 56           | A/A                |
| 7        | A/A    | 31       | A/B    | 57           | A/A                |
| 8        | A/B    | 32       | A/A    | 58           | A/B                |
| 9        | A/A    | 33       | A/A    | 60           | A/A                |
| 10       | A/B    | 34       | A/A    | 61           | A/A                |
| 11       | A/A    | 35       | A/A    | 62           | A/A                |
| 12       | A/A    | 36       | C/C    | 63           | A/A                |
| 13       | A/A    | 37       | A/A    | 64           | A/B                |
| 14       | A/A    | 38       | A/B    | 65           | B/B                |
| 15       | A/B    | 39       | A/C    | 66           | A/A                |
| 16       | A/A    | 40       | C/C    | 67           | A/A                |
| 17       | A/A    | 43       | A/A    | 68           | A/A                |
| 18       | A/A    | 44       | A/B    | 69           | A/B                |
| 19       | A/B    | 47       | A/A    | 70           | A/B                |
| 21       | A/A    | 48       | A/C    | 71           | A/A                |
| 22       | A/C    | 50       | A/A    | <b>Total</b> | <b>61 Personen</b> |
| 24       | A/A    | 51       | A/A    |              |                    |

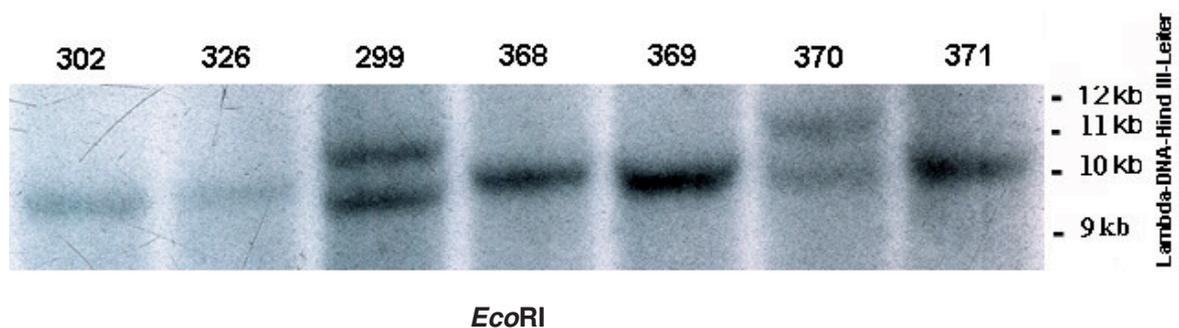
**Tab. 3.11: Ergebnisse des Southern-Blots von 61 Kontrollen**

Zum Nachweis sehr großer Locus-Expansionen (größer als >27kb), die extrem selten vorkommen, müsste eine PFGE-Analyse bei allen 61 Kontrollen durchgeführt werden. Hierfür war das benötigte Material, in *low melt* Gel eingebettete Zellen, nicht

vorhanden. Wenn man die Expansionslänge der Probanden (Tabelle 3.9) und Kontrollpersonen (Tabelle 3.10) zusammenfasst, zeigt sich, dass es sich bei FRA16B um eine variable Region handelt, die vorher nicht molekular untersucht wurde. Aufgrund der unterschiedlichen Allel-Längen der FRA16B-Region wurden die FRA16B-Träger in 3 Gruppen (A: keine Locus-Expansion, B: kurze Locus-Expansion, C: Intermediäre Locus-Expansion) unterteilt.

### 3.7 Variabilität der FRA16B-Region bei 70 selektionierten Personen

Um zu untersuchen, ob sich die Variabilität der FRA16B-Region bei mental retardierten Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen unterscheidet wurden 70 Patienten mit ungeklärter geistiger Retardierung untersucht. Die vorhandene genomische DNA der Patienten wurde mit *EcoRI* geschnitten und mit der radioaktiv markierten Sonde 8 (siehe Abbildung 2.5) hybridisiert (Abbildung 3.28).



**Abb. 3.28: Die Variabilität der FRA16B-Region bei mental retardierten Patienten**

Southern-Blot Analyse der FRA16B-Region. Die variablen Allele konnten auch hier nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Southern-Blot Analyse von 70 Patienten sind in Tabelle 3.12 zusammengefasst.

| Lab. Nr. | Klasse | Lab. Nr. | Klasse | Lab. Nr.     | Klasse             |
|----------|--------|----------|--------|--------------|--------------------|
| 106      | A/A    | 252      | A/B    | 325          | A/A                |
| 119      | A/A    | 262      | A/A    | 326          | A/A                |
| 138      | A/A    | 270      | A/A    | 346          | A/A                |
| 168      | A/A    | 271      | A/A    | 362          | A/C                |
| 174      | A/A    | 272      | A/A    | 364          | A/A                |
| 198      | A/B    | 274      | A/A    | 365          | B/C                |
| 202      | A/A    | 275      | A/A    | 367          | B/B                |
| 203      | A/A    | 279      | A/A    | 368          | A/A                |
| 206      | A/A    | 282      | A/A    | 369          | A/A                |
| 207      | A/A    | 290      | A/A    | 370          | A/B                |
| 208      | A/A    | 293      | B/C    | 371          | A/A                |
| 209      | A/A    | 294      | A/A    | 375          | A/A                |
| 222      | A/A    | 295      | A/B    | 376          | A/A                |
| 230      | A/A    | 296      | A/A    | 377          | A/A                |
| 238      | B/B    | 297      | A/B    | 378          | A/A                |
| 239      | B/B    | 298      | A/B    | 379          | A/A                |
| 240      | B/B    | 299      | A/B    | 380          | A/A                |
| 241      | A/A    | 302      | A/A    | 382          | A/A                |
| 242      | A/A    | 319      | A/A    | 383          | A/A                |
| 243      | A/B    | 320      | B/B    | 389          | A/A                |
| 248      | B/B    | 321      | A/A    | 410          | A/B                |
| 249      | A/A    | 322      | A/B    | 417          | A/C                |
| 250      | B/B    | 323      | A/B    | <b>Total</b> | <b>70 Personen</b> |
| 251      | A/C    | 324      | A/A    |              |                    |

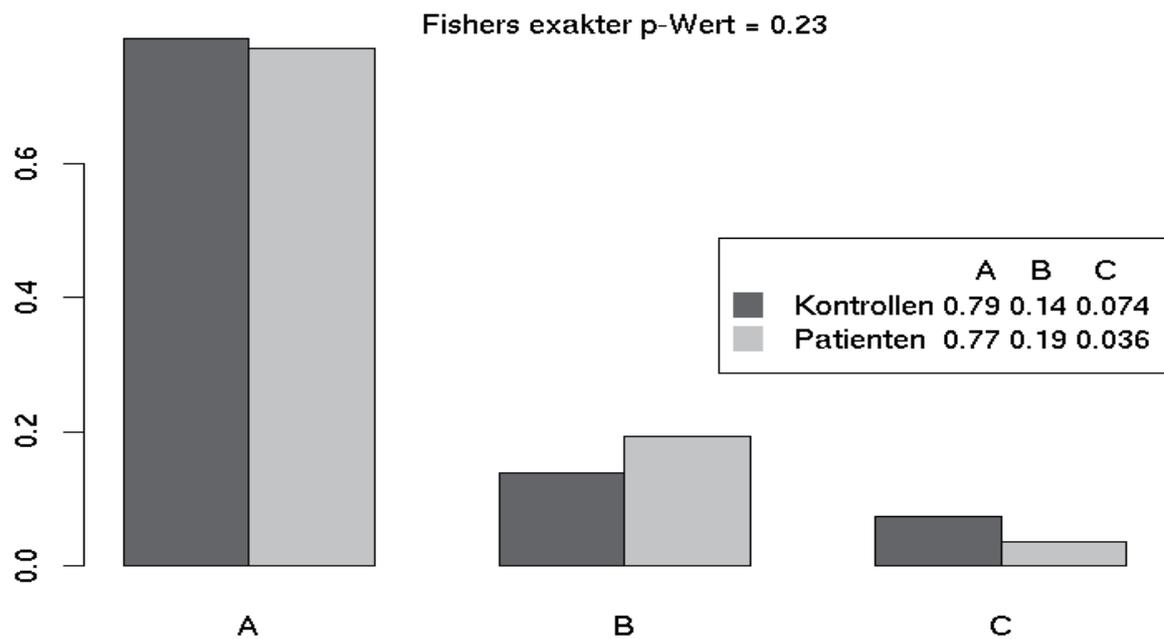
Tab. 3.12: Ergebnisse der Southern-Blot Analyse von mental retardierten Patienten.

Wie bei den Kontrollpersonen wurden die verschieden großen FRA16B-Allele der 70 Patienten in die drei Gruppen geteilt (Tabelle 3.13).

| Gruppe   | Allel-Größe    | Anzahl der Allele (n) | Anteil (Prozent) |
|--|----------------|-----------------------|------------------|
| <b>A</b><br>Keine<br>Locus-Expansion<br>(häufigstes Allel) | 9,5-10kb       | n=108                 | 77,1%            |
| <b>B</b><br>Kurze<br>Locus-Expansion                       | >10kb<br>≤11kb | n=24                  | 17,1%            |
| <b>C</b><br>Intermediäre<br>Locus-Expansion                | >11kb<br>≤27kb | n=8                   | 5,8%             |

Tab. 3.13: Allelverteilung und Klassifikation der FRA16B-Region bei 70 untersuchten mental retardierten Patienten.

Beim Vergleich der Allelverteilung der FRA16B-Region von beiden Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ( $p$ -Wert= 0.23) (Abbildung 3.29).



**Abb. 3.29: Graphische Darstellung der Allelverteilung der FRA16B-Region bei Kontrollen und mental retardierten Patienten**

Allelverteilung der FRA16B-Region bei Kontrollen und mental retardierten Patienten.

Zwischen Kontrollen und Patienten besteht kein Unterschied in der Allelverteilung, was durch einen Fisher-Test bestätigt wird: p-Wert = 0,23.

In diesem Kapitel (molekulargenetischer Teil) konnte bei der Analyse aus genomischer DNA von 143 Personen (6 Probanden, 6 negativen Kontrollen, 61 weiteren, nicht zytogenetisch untersuchten, Kontrollpersonen und 70 nicht zytogenetisch untersuchten mental retardierten Patienten) gezeigt werden, dass die FRA16B-Region in diesen Personen (0,1kb-110kb) ein variabler Locus ist. Außerdem konnte ich zeigen, dass es eine stabile Weitergabe der expandierten Allele zwischen den Generationen in beiden untersuchten Familien gibt. Anhand von zwei untersuchten unterschiedlichen Geweben des Probanden 1 konnte nachgewiesen werden, dass die Weitergabe somatisch stabil erfolgt. Die Allelverteilung der FRA16B-Region zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen 60 Kontrollen und 71 mental retardierten Patienten.

## 3.8. Bioinformatische Analyse

### 3.8.1 Das Programm „*AT-Block-Finder*“

Um charakteristische Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede bei der AT-Organisation zwischen dem FRA16B-Locus und anderen AT-reichen Regionen im Genom zu ermitteln, wurde das gesamte menschliche Genom systematisch nach AT-Blöcken verschiedener Mindestgröße und mit unterschiedlichem Mindest-AT-Gehalt durchsucht. Zu diesem Zweck wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Ing. Manfred Beier eine spezielle Bio-Software (*AT-Block-Finder*) entwickelt, mit der sich diese Suche automatisieren lässt. Zunächst wurde mit einer festen Suchfenstergröße (minimale Größe, Option -n) nach einem Bereich mit mindestens dem gewünschten AT-Gehalt (Option -p) gesucht. Bei Erfolg wurde dieser Bereich symmetrisch auf die vorgegebene maximale Fenstergröße (Option -x) erweitert und dann jedes mögliche Subfenster zwischen diesen beiden Größen auf den höchsten AT-Gehalt hin untersucht (der Kernbereich, der in Großbuchstaben ausgegeben wird). Abschließend wurde noch ausgehend vom Maximalfenster durch Zusammenziehen seiner Grenzen ein äußerer "Hüllbereich" ermittelt, in dem der vorgegebene AT-Gehalt gerade erreicht wird (Kleinbuchstaben). Die Suchmethode geht von einem kontinuierlichen An- und Abschwelen des AT-Gehalts im Genom aus. Die Anzahl gefundener Bereiche stellt also nur ein Minimum dar.

### 3.8.2 Ziele der Entwicklung dieses Programms

Das erste Ziel war ein besseres Verständnis der AT-Organisation in der FRA16B-Region selbst. In Abbildung 3.30a ist die AT-Dichte in 1kb-Blöcken innerhalb der 50kb-Umgebung am FRA16B-Locus dargestellt. Die spezielle AT-Organisation in der FRA16B-Region und ein Vergleich mit der gesamten menschlichen Genomsequenz sollten bei einer genauen Charakterisierung dieser Region helfen. Bei einer Analyse der Region mit einem Repeatmasker-Programm (Version 3.2.7 bei: <http://genome.ucsc.edu>, Update: 1.05.09) zeigte sich, dass außer den bekannten 33bp-Minisatelliten, die in der Mitte dieser Region liegen, andere verstreute repetitive Elemente wie LINE und SINE, einfache variable Mikrosatelliten ((TA)<sub>n(1-12)</sub>, variabel kurze AT-reiche Minisatelliten und andere weniger komplexe Satelliten vorkommen. Durch ihren Aufbau aus hypervariablen Mikro- und Minisatelliten sowie

hochrepetitiven verstreuten DNA-Familien, SINEs und LINEs, unterscheidet sich die FRA16B-Region sowohl im AT-Gehalt als auch in der Sequenzzusammensetzung von seiner Umgebung (Abbildung 3.30a und 3.30b).

Abb. 3.30a

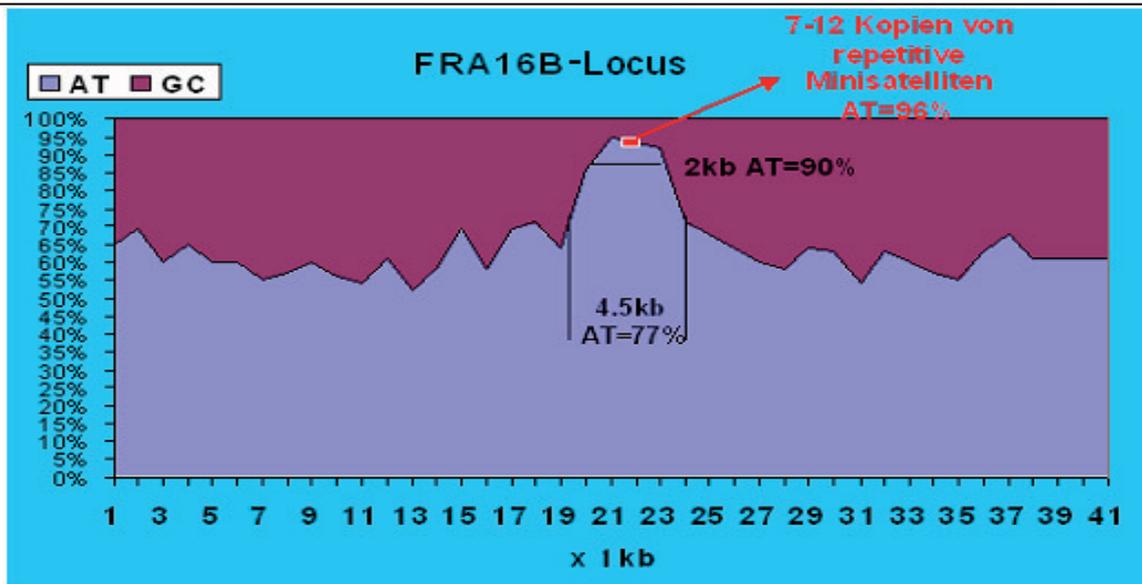


Abb. 3.30b

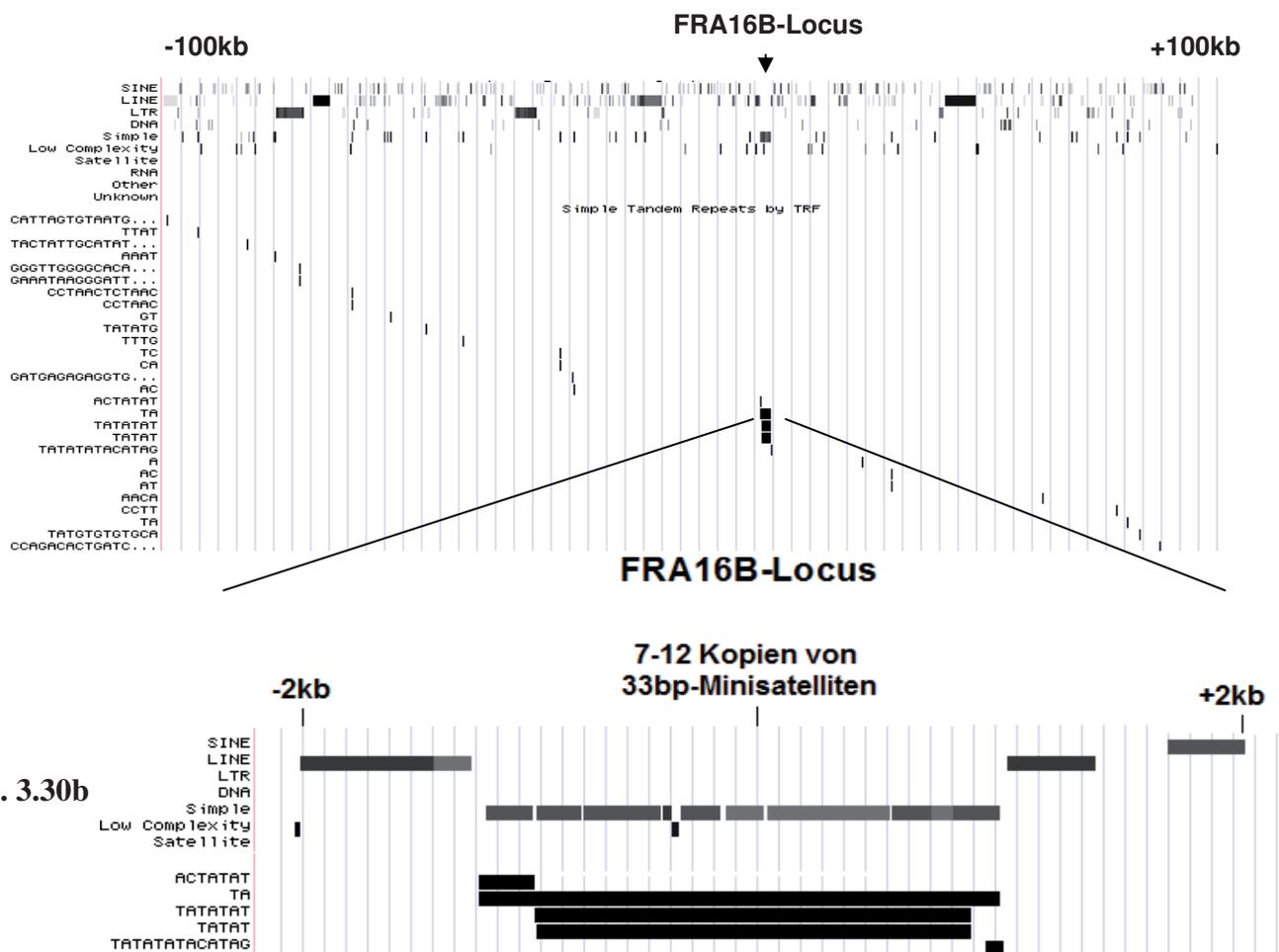


Abb. 3.30a: Schematische Darstellung des FRA16B-Locus

Drei Parameter, die FRA16B-Region charakterisieren: 1.) mind. 4,5kb und mind. 77% AT; 2.) mind. 2kb und mind. 90% AT; 3.) 7-12 Kopien von repetitiven Minisatelliten bei der europäischen Bevölkerung mit 96% AT-Gehalt. Auflösung: 1kb

Abb. 3.30b: Verschiedene repetitive Elemente in FRA16B-Locus

Die FRA16B-Region unterscheidet sich durch ihre besondere Sequenzzusammensetzung von ihrer Umgebung. LINE: long interspersed nuclear elements SINE: short interspersed nuclear elements LTR: long terminal repeat (modifiziert: [www.ucsc.edu](http://www.ucsc.edu)).

Als nächstes wurden mit Hilfe von Sequenzdaten der Firma Celera und dem *AT-Block-Finder* Programm im gesamten humanen Genom (~3200Mb) nach AT-reichen Regionen mit folgenden Randbedingungen gesucht:

- (1) Blockgröße: mind. 4,5kb AT-Gehalt: mind. 77%
- (2) Blockgröße: mind. 2Kb AT-Gehalt: mind. 90%
- (3) Blockgröße: mind. 1Kb AT-Gehalt: mind. 96%
- (4) Blockgröße: mind. 2Kb AT-Gehalt: mind. 96%
- (5) Blockgröße: mind. 3Kb AT-Gehalt: mind. 96% (Es wurde keine solche Region gefunden)

Für die Auswahl der Suchparameter, d.h. Mindestblockgröße und minimaler AT-Gehalt, waren folgende Kriterien ausschlaggebend:

(1-2): Die Blöcke sollten dem AT-Modell des FRA16B-Locus entsprechen, d.h. mindestens 4,5kb und 77% bzw. mindestens 2kb und 90% AT-Gehalt.

(3-5): Als dritte Kenngröße für FRA16B sollten sie ein ähnliches Expansionsmodell wie das von AT-reichen 33bp-Minisatelliten mit einem AT-Gehalt von mind. 96% repräsentieren: bei FRA16B-Trägern kann es zu einer Expansion an 33bp-Minisatelliten (AT-Gehalt=96%) bis zu 70kb kommen (Yu et al., 1997). Deshalb ist es relevant, wie häufig und in welcher Größe solche Regionen im humanen Genom vorkommen.

Tabelle 3.14 zeigt die Ergebnisse für die untersuchten Blockgrößen. Die Anzahl von AT-reichen (77-96%) Regionen von >1kb ist bei den einzelnen menschlichen Chromosomen im Verhältnis zu ihrer jeweiligen Gesamtlänge sehr variabel. Regionen mit einem AT-Gehalt von mind. 90% und einer Länge zwischen 2-3kb findet man weniger häufig: im gesamten Genom gibt es nur 10 Loci mit mind. 3kb Länge und einem AT-Gehalt von mind. 90%. Offensichtlich sind längere Regionen mit solchen AT-reichen Blöcken sehr selten.

| Chromosomen  | Länge des Chromosoms (Mb) | Mind. 4.5kb AT= mind. 77% | Mind. 2kb AT= mind. 90%   | Mind. 1kb AT= mind. 96% | Mind. 2kb AT= mind. 96% |
|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Chromosom 1  | 247,249                   | 1                         | 1                         | 2                       | 0                       |
| Chromosom 2  | 242,951                   | 14                        | 10                        | 11                      | 2                       |
| Chromosom 3  | 199,501                   | 3                         | 5                         | 9                       | 1                       |
| Chromosom 4  | 191,273                   | 8                         | 10                        | 12                      | 2                       |
| Chromosom 5  | 180,857                   | 8                         | 6                         | 8                       | 0                       |
| Chromosom 6  | 170,899                   | 2                         | 0                         | 5                       | 0                       |
| Chromosom 7  | 158,821                   | 8                         | 6                         | 8                       | 0                       |
| Chromosom 8  | 146,274                   | 2                         | 1                         | 4                       | 0                       |
| Chromosom 9  | 140,273                   | 1                         | 1                         | 2                       | 0                       |
| Chromosom 10 | 135,374                   | 1                         | 2                         | 4                       | 0                       |
| Chromosom 11 | 134,452                   | 2                         | 2                         | 4                       | 0                       |
| Chromosom 12 | 132,349                   | 4                         | 5                         | 3                       | 0                       |
| Chromosom 13 | 114,142                   | 4                         | 4                         | 4                       | 1                       |
| Chromosom 14 | 106,368                   | 1                         | 1                         | 2                       | 0                       |
| Chromosom 15 | 100,338                   | 2                         | 1                         | 1                       | 0                       |
| Chromosom 16 | 88,827                    | 1<br><b>(FRA16B)</b>      | 2<br>(davon:<br>1xFRA16B) | 4                       | 0                       |
| Chromosom 17 | 78,774                    | 0                         | 0                         | 0                       | 0                       |
| Chromosom 18 | 76,117                    | 2                         | 4                         | 8                       | 2                       |
| Chromosom 19 | 63,811                    | 0                         | 1                         | 6                       | 0                       |
| Chromosom 20 | 62,435                    | 0                         | 0                         | 1                       | 0                       |
| Chromosom 21 | 46,944                    | 1                         | 1                         | 1                       | 0                       |
| Chromosom 22 | 49,691                    | 5                         | 1                         | 2                       | 0                       |
| Chromosom X  | 154,913                   | 12                        | 9                         | 7                       | 0                       |
| Chromosom Y  | 57,772                    | 2                         | 3                         | 2                       | 0                       |
| gesamte Loci |                           | 84                        | 76                        | 110                     | 8                       |

**Tab. 3.14: Anzahl der AT-reichen Regionen in den untersuchten Sequenzblöcken**

Die menschlichen Chromosomen enthalten eine unterschiedliche Anzahl von bestimmten AT-reichen Blöcken, die nicht mit der Länge der Chromosomen korreliert. Chromosom 17 enthält zum Beispiel solche Blöcke nicht. Das Programm kann die FRA16B-Region als einzige Stelle im ganzen Chromosom 16 detektieren (rot markiert).

Bei einem Vergleich der gefundenen AT-reichen Loci miteinander und mit einer DNA-Datenbank zeigt sich, dass:

- 63% der Regionen (53 von 84 Loci) mit mind. 4,5kb und 77% AT gleichzeitig Regionen mit mind. 2kb und 90% AT enthalten, d.h. das gleiche AT-Organisationsmodell wie FRA16B haben (Abbildung 3.31a und 3.31b, siehe blaue und rote Markierungen)
- 52 von 53, die diesen Organisationsmodell entsprechen, enthalten keine Gene und sind variabel (wie bei FRA16B, festgestellt bei: <http://genome.ucsc.edu>, aktuelle Version HG18; nur in 3q24 ist ein Gen lokalisiert (SLC9A9: *solute carrier family 9*)

Die Korrelation solcher AT-reicher Blöcke mit Regionen, die ein ähnliches AT-Organisationsmodell wie FRA16B aufweisen oder in FRA16B-Gruppen (Induzierbarkeit durch Distamycin A; Tabelle 1.1), zusammengefasst sind, wird in Abbildungen 3.31a und 3.31b dargestellt. Dabei wurden alle bis jetzt bekannten FSs (Tabelle 8.1 und 8.2) mit entsprechenden Farben gekennzeichnet. Neben der Lokalisation der FSs wurden auch die vom *AT-Block-Finder* entdeckten AT-reichen Blöcke markiert.

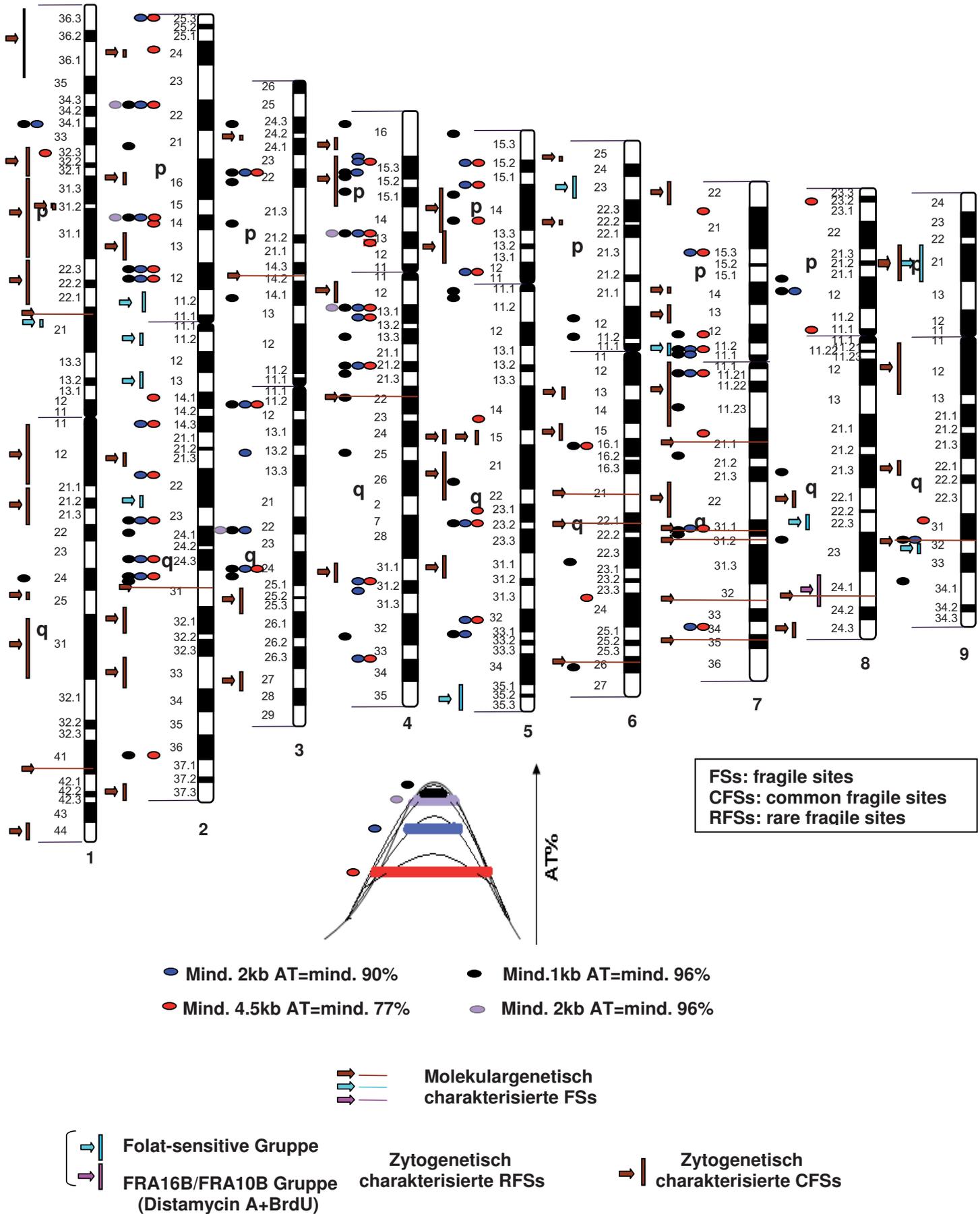
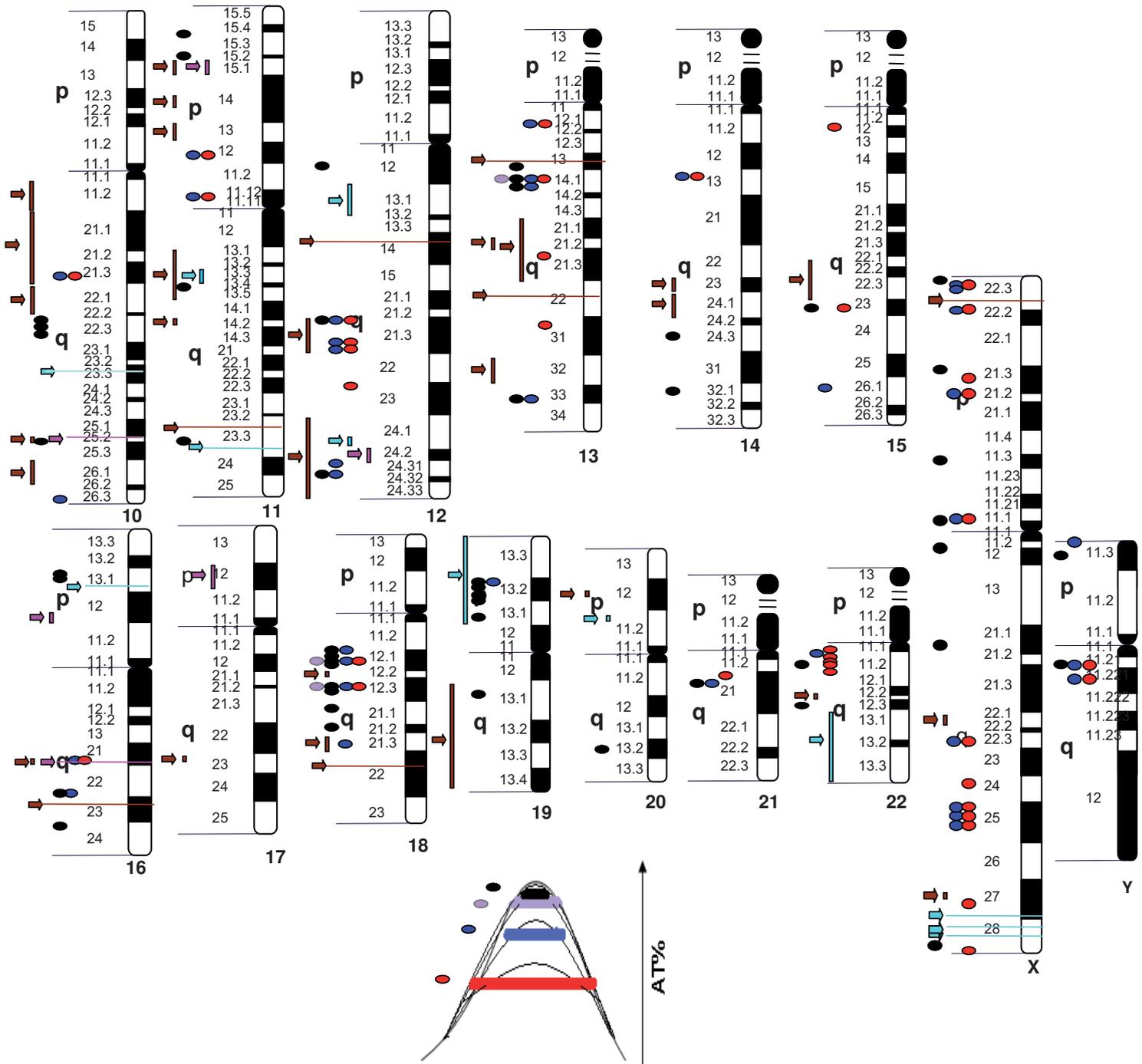


Abb. 3.31a



- Mind. 2kb AT=mind. 90%
- Mind. 1kb AT=mind. 96%
- Mind. 4.5kb AT=mind. 77%
- Mind. 2kb AT=mind. 96%

→ Molekulargenetisch charakterisierte FSs

→ Folat-sensitive Gruppe  
 → FRA16B/FRA10B Gruppe (Distamycin A+BrdU)

→ Zytogenetisch charakterisierte RFSS

→ Zytogenetisch charakterisierte CFSS

Abb. 3.31b

**Abb. 3.30a-b: Darstellung der menschlichen Chromosomen mit Verteilung der FSs und unterschiedlicher AT-reicher Blöcke**

Die Abbildungen zeigen die bekannten FSs und die durch das Programm *AT-Block-Finder* gefundenen AT-reichen Blöcke in den menschlichen Chromosomen. Die meisten AT-reichen Blöcke sind nicht mit FSs assoziiert. Pfeile mit Linien markieren die bereits molekulargenetisch charakterisierten FSs. In mehr als 60% der Loci fallen 4,5kb-Blöcke und 90% AT-haltige 2kb-Blöcke zusammen (53 von 84 Loci). Keine fragile Stelle in Gruppe FRA16B/10B (7 Stellen) außer FRA16B selbst und FRA10B ist mit solchen AT-reichen Blöcken assoziiert. Einige Regionen besitzen überlappende FSs. Die Abbildungen 3.31a und 3.31b wurden mit Hilfe der aktuellen Daten folgender Quellen und Programme erstellt: NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), UCSC ([www.genome.cse.ucsc.edu](http://www.genome.cse.ucsc.edu)), Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)), GeneCards ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)), *AT-Block-Finder* Programm, sowie ISCN: *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* 2005, Literatur über FSs (bis 1. April. 2009).

Viele FSs (ca. 75%) sind molekulargenetisch noch nicht charakterisiert, deshalb wurden sie aufgrund ihrer zytogenetischen Manifestation in Regionen und Subregionen zwischen 2-30Mb eingeordnet. Die charakterisierten FSs umspannen zwischen 0,16-10Mb.

Einige relevante Ergebnisse lassen sich aus der graphischen Darstellung (Abbildungen 3.31a und 3.31b) ableiten:

- Die Verteilung von AT-reichen Blöcken zwischen 1-4,5kb ist bei den menschlichen Chromosomen sehr unterschiedlich und korreliert nicht mit der Größe der Chromosomen (z.B. hat das Chromosom 1 4, Chromosom 4 32, Chromosom 22 8 und das Chromosom 17 0 Blöcke; Tabelle 3.14).
- Die meisten der CFSs (72 von 85 Stellen = 85%) liegen nicht in AT-reichen Blöcken (>1kb) und sind damit nicht mit solchen Loci assoziiert. Zwei Regionen (4p15 und 12q21.3) enthalten besonders viele AT-reiche Blöcke.
- Es gibt nur 7 Regionen, wo CFSs und RFSs gemeinsamen zusammen liegen: 8q24.1, 9p21, 10q25.2 (FRA10B), 11p15.1, 11q13, 12q24, 16q21 (FRA16B).
- Außer FRA16B liegen noch 6/53 Regionen (4p15.3, 7p11.2, 7q11.21, 7q31.1, 10q21.3, und 12q21.3) in FSs. Das bedeutet, dass ca. 90% der Stellen mit ähnlicher AT-Organisation wie FRA16B-Region nicht zu einer induzierbaren Fragilität führen.
- Mit dem Programm *AT-Block-Finder* kann die exakte Position des FRA16B-Locus auf Chromosom 16 eindeutig identifiziert werden, d.h. die Region mit mind. 4,5kb und mindestens 77% AT ist charakteristisch für FRA16B auf Chromosom 16 (siehe Tabelle 3.14; rot markiert)

- Es gibt nur 8 Loci mit mindestens 2kb und 96% AT (sehr selten). Maximale AT-reiche Region mit mind. 96% AT-Gehalt: 2p14: 68530181-68532833 (2653bp)

## 4. Diskussion

### 4.1 Molekulargenetik

Um die zytogenetischen und molekularzytogenetischen Ergebnisse der FRA16B-Träger zu interpretieren, werden hier zuerst die Ergebnisse der Southern-Blot- und PFGE-Analysen diskutiert.

Yu et al. charakterisierten 1997 FRA16B durch positionelle Klonierung. Diese Arbeit war ein großer Fortschritt zum besseren Verständnis des Aufbaus der FRA16B-Region; dennoch fehlen in dieser Arbeit einige wichtige Informationen:

- Keine genaue Information über die Sequenz und Position der verwendeten radioaktiven Proben und der PFGE-Bedingungen.
- Keine vergleichende PFGE-Analyse zwischen den Generationen bei FRA16B-Trägern.
- Nach dem heutigen Stand der Sequenzierung des menschlichen Genoms liegen die angegebenen Primer für die Untersuchung der proximalen benachbarten Stellen der FRA16B-Region teilweise auf anderen Chromosomen.

Die Amplifikation der FRA16B-Region lässt sich sehr schwer durchführen. Der Grund liegt vermutlich darin, dass die FRA16B-Sequenz in der Mitte einer ca. 4,5kb großen Region mit fast 80% AT-Gehalt liegt (Abbildung 3.30a): Aufgrund der repetitiven Sequenzen findet man keine geeigneten Primer innerhalb dieser Region, mit denen man ein kürzeres PCR-Produkt erhält, welches sequenziert werden könnte. Auch Yu et al. zeigten keine PCR-Bedingungen für eine Amplifikation über die 33-bp AT-reichen Minisatelliten.

VNTR-Minisatellitenpolymorphismen charakterisiert man meist durch eine Southern-Blot-Hybridisierung. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde deshalb die Analyse der Variabilität, Klassifikation (wie bei FRA10B, Hewett et al.; 1998) und Transmission dieser Region durch eine Southern-Blot Analyse durchgeführt. Es wurden zwei neue Einzelkopie Proben in dieser AT-reichen Region identifiziert und eingesetzt, die keine Kreuzreaktion und keinen Hintergrund verursachten. Der Unterschied zwischen der aus den Sequenzdaten abgeleiteten Fragmentgröße (siehe Abbildung 2.5) und dem experimentell durch Southern-Blot Analyse

(Abbildungen 3.22, 3.23A/B/C, 3.27 und 3.28) erhaltenen Werten kann verschiedene Gründe haben. Die etwas höher liegenden Fragmentgrößen der Wildtyp-Allele in diesen Abbildungen (~0,7kb bei *Bam*HI, ~1,2kb bei *B*l*p*I und ~1,7kb bei *E*coRI) sind wahrscheinlich durch das Laufverhalten der DNA-Fragmente bedingt, Sequenzfehler in Datenbanken oder durch die unterschiedliche Anzahl an Minisatelliten- und Mikrosatelliten-Einheiten der FRA16B-Region bei der untersuchten Population in dieser Arbeit. Relevant ist aber, wie bei der PFGE, der Unterschied der beiden Allele, um die Expansionslänge dieser Region auszuwerten.

Es wurde außerdem festgestellt, dass die für die PFGE etablierten Methoden verändert werden mussten. In meinen Analysen konnte ich zeigen, dass die Salzsäure-Behandlung der DNA vor dem Transfer zum Herstellen von kleineren DNA-Fragmenten, nicht geeignet ist und es wurde stattdessen eine 30sec UV-Bestrahlung eingesetzt. AT-reiche Regionen (wie bei FRA16B) reagieren vielleicht aufgrund der DNA-Zusammensetzung sehr empfindlich auf Salzsäure. Außerdem ist bekannt, dass AT-reiche Sequenzen schneller reassoziieren als andere Regionen. Die Neutralisierung vor dem Transfer könnte dazu führen, dass die DNA-Fragmente nicht in denaturierter Form auf die Membran übertragen werden können, daher wurde der Transfer mit alkalischem Denaturierungspuffer durchgeführt.

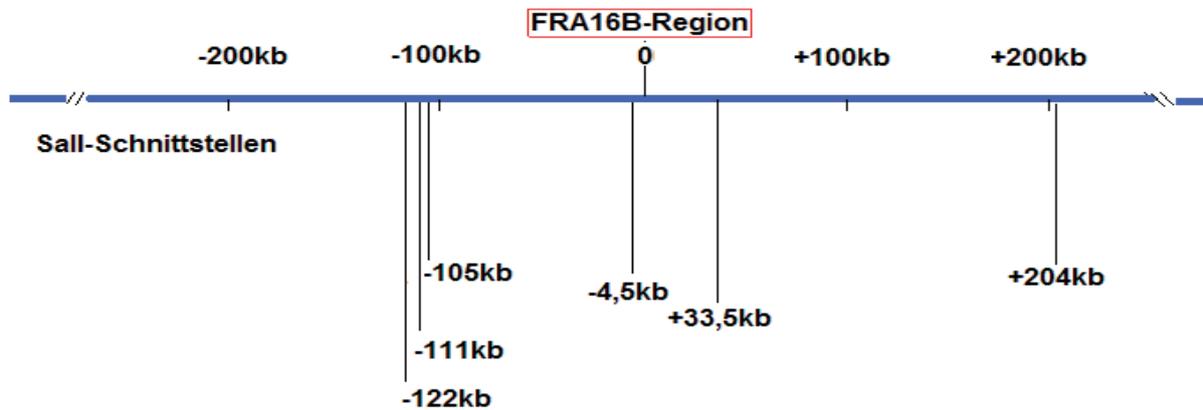
Die DNA aus immortalisierten Lymphozyten der negativen Kontrollpersonen (NK1-NK6), die zytogenetisch keine Hinweise für eine FRA16B-Manifestation gezeigt hatten, wurden auf eine Locus-Expansion untersucht. Die Southern-Blot und PFGE-Ergebnisse bestätigten die zytogenetischen Ergebnisse.

Yamauchi et al. (2000) diskutierten bei einem japanischen FRA16B-Träger mit einer Expansion der 35bp-AT-reichen Minisatelliten, dass die Länge der Allel-Expansion für die zytogenetische Expression von FRA16B relevant ist. Sie vermuteten, dass die kritische zytogenetische Expansion der induzierbaren FRA16B zwischen 1-1,1 kb (28-31 Kopien der 35bp-Minisatelliten-Elemente) liegt. Bei der Negativ-Kontrolle 4 wurde eine kleine Expansion der FRA16B-Region festgestellt (ca. 2kb), obwohl keine zytogenetische Manifestation an FRA16B nachgewiesen werden konnte. Das heißt, dass nicht jede Expansion der FRA16B-Region zu einer zytogenetischen FRA16B-Expression führt.

Die FRA16B-Allele von NK1-NK6 (auch bei 61 weiteren Kontrollen und 70 Patienten) sind stark variabel mit einer Länge von 9,5kb bis 27kb. Eine Allel-Variabilität von Loci mit VNTR-Elementen in verschiedenen Populationen wurde bereits beschrieben (Savas et al., 2003, Santovito et al., 2008). Diese Variabilität bei FRA16B kann durch

eine variable Anzahl an Mikrosatelliten, Minisatelliten oder anderen weniger komplexen Elementen, die innerhalb dieser Region liegen, zustande kommen (Abbildung 3.30b). Unterschiedliche Allel-Variabilitäten wurden bei der Untersuchung von 118 Minisatelliten der menschlichen Chromosomen 21 und 22 bereits publiziert (Denoeud et al., 2003). Außerdem wurde eine solche Allel-Variabilität bei der FRA10B-Region, die ebenfalls einen ähnlichen AT-reichen VNTR-Minisatelliten enthält, berichtet. Hier konnten 16 unterschiedliche Allele zwischen ca. 0,9-8,5kb identifiziert werden (Hewett et al., 1998).

Bei der Messung der Expansionslänge der FRA16B-Region der Probanden mit konventioneller Gelelektrophorese konnte, abgesehen von Proband 5, nur eine normale Bande identifiziert werden. Ein expandiertes Allel war wahrscheinlich aufgrund der DNA-Präparationsmethode, die größere DNA-Fragmente schert, nicht nachzuweisen. Zum Nachweis expandierter Allele wurde deshalb die PFGE-Methode angewendet. Hierzu mussten zunächst geeignete Restriktionsenzyme etabliert werden. Von verschiedenen eingesetzten Restriktionsenzymen (*EcoRI*, *EcoR91I*, *BstEII*, *SacI* und *SaII*), waren *BstEII* und besonders das selten schneidende CpG-methylierungssensitive Enzym *SaII* am besten geeignet. Auch hier kann der Unterschied zwischen der aus den Sequenzdaten abgeleiteten Fragmentgröße (bei Wildtyp Allel: 38kb) und den experimentell durch die PFGE erhaltenen Werten (ca. 70kb) verschiedene Gründe haben. Die PFGE ist sensitiv gegenüber der aufgetragenen DNA-Menge pro Spur (Royer-Pokora et. al., 1991). Eine erhöhte Konzentration resultiert in einem verzögerten Laufverhalten und damit relativ zum Marker in größeren Fragmenten. Hinweise dafür kann man bei der Abbildung 3.24 und 3.26 finden. Die DNA-Menge des Probanden 1 ist in diesen Abbildungen geringer als die anderen DNA-Proben und dadurch liegt das Wildtyp-Allel bei ca. 48,5kb. Der zweite Grund kann ein Fehler in der Sequenz sein, besonders in solchen Regionen mit hohen AT-Anteilen. Außerdem stammt die Sequenz des menschlichen Genoms von einem einzigen Individuum. Ein Methylierungs-Effekt für die entstehenden etwas zu großen Restriktionsfragmente beim Einsatz von *SaII* (ca. 70kb statt 38kb) kann ausgeschlossen werden. Bei einem Methylierungs-Effekt wären die entstehenden nicht expandierten DNA-Fragmente für die FRA16B-Region mindestens 138,5kb (105+33,5kb) bzw. 208,5kb (4,5+204kb) gewesen (Abbildung 4.1).



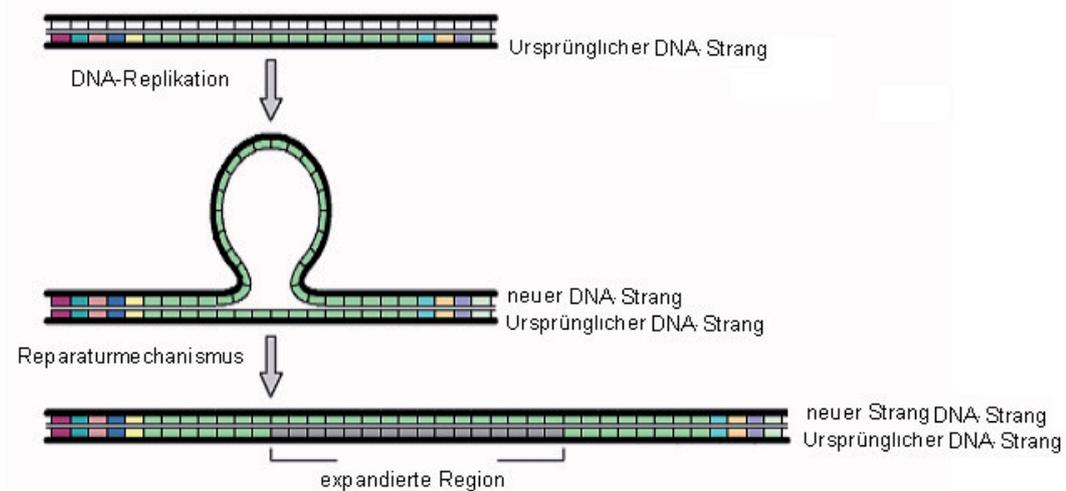
**Abb. 4.1: Die möglichen Schnittstellen von *SalI* in FRA16B-Region**

Die Sequenzdaten wurden der UCSC Datenbank (<http://genome.ucsc.edu>; HG18) entnommen und die Restriktionskarte mit dem Programm WebCutter 2 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) erstellt. Die FRA16B Sequenz wurde als 0 bezeichnet.

Außerdem wurden die expandierten Allele der Probanden durch nicht-methylierungssensitive Enzyme bestätigt. Die größte bekannte FRA16B-Expansion liegt bei ca. 70kb (Yu et al., 1997). In dieser Dissertationsarbeit wurde bei Proband 1 (in Lymphozyten und Fibroblasten) und Lymphozyten-DNA der Mutter von Proband 1, die beide zytogenetisch eine FRA16B-Manifestation zeigten, eine Expansion von ca. 110kb gefunden. Beide Fälle wiesen eine spontane Fragilität an FRA16B in ihren Lymphozyten auf. Für die Entstehung solcher großer Minisatelliten-Expansionsen gibt es verschiedene Möglichkeiten:

### 1) Slippage Model:

Die DNA-Polymerase bildet eine nicht replizierte einzelsträngige DNA-Schleife an repetitiven Regionen. Bei der Reparatur wird dann jedoch der Matrizenstrang erweitert, anstatt die Schlaufe herauszuschneiden. Dies geschieht vor allem bei Sequenzen, die aus kleinen Wiederholungseinheiten (Mikrosatelliten-DNA) bestehen, sodass eine proof-reading-Aktivität nicht mehr möglich ist. Dadurch kann die Anzahl der Wiederholungen verringert (Deletion), oft jedoch vergrößert (Amplifikation) werden. Man spricht von einer sog. Replikations- oder Polymeraseverschiebung. Nach diesem Schema können aus Mikrosatelliten Minisatelliten entstehen (Abbildung 4.2). Es handelt sich hier möglicherweise um einen wichtigen Mechanismus für die Evolution von DNA-Sequenzen (Dover 1995).



**Abb. 4.2: Darstellung des "Slippage Modells" bei der DNA-Replikation**

Eine Fehlpaarung gegeneinander verschobener DNA-Stränge (*slipped strand mispairing*). Repetitive Tandemsequenzen sind vermutlich besonders anfällig für eine Fehlpaarung aufgrund einer Verschiebung der DNA-Stränge. Bei der DNA-Replikation wird durch eine Polymeraseverschiebung und Entstehung einer Schleife der Reparaturmechanismus aktiviert (modifiziert nach: <http://www.stanford.edu/group/hopes/causes/mutation/q5.html>). Grüne und graue Farben repräsentieren die repetitiven Tandemsequenzen. Die anderen Farben zeigen normale, nicht repetitive Sequenzen.

## 2) Ungleicher Schwesterchromatidaustausch (UESCE) und ein Ungleiches Crossing-over (UEC):

Neben dem Slippage Modell können ein ungleicher Schwesterchromatidaustausch (UESCE) und ein ungleiches Crossing-over (UEC) zur Expansion beitragen. Die FRA16B-Region weist eine erhöhte SCE-Rate und damit eine erhöhte DNA-Instabilität an diesem Locus auf (Schmid et al., 1987). Johnson und Jasin (2000) konnten zeigen, dass SCEs auf Reparaturen von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) mittels homologer Rekombination beruhen. Bei dieser Reparatur dient der jeweilige intakte Schwesterchromatidabschnitt als Matrize für den DSB-aberranten DNA-Abschnitt.

VNTR-Minisatelliten stellen so genannte Hot-Spot-Regionen für homologe Rekombinationen im menschlichen Genom dar (Wahls et al., 1990). Für die meisten Expansionen von VNTR-Minisatelliten sind die UESCE oder Slippage-Replikation von Mikrosatelliten verantwortlich (Jeffreys et al., 1991). Ungleiches Crossing-over (UEC) oder Austausch von Schwesterchromatiden (UESCE) treten besonders in Genombereichen mittlerer oder großer Länge von tandemartig wiederholten Sequenzen auf. Sie können aber auch bei Fehlpaarungen zwischen sich

wiederholenden Sequenzen entstehen, die weit von einander entfernt sind. So kann es beispielsweise zwischen Alu-Repeats (30-280bp) oder anderen verstreuten repetitiven Sequenzen (LINEs oder LTR-Elemente) zu einer Verdopplung in Form von tandemartigen Wiederholungen kommen (Strachan & Read, 2004).

Die zytogenetisch unterschiedliche Manifestation von FRA16B innerhalb einer Familie ist bekannt (Sutherland & Hecht, 1985). Man vermutete, dass die unterschiedliche FRA16B-Expression auf verschiedenen Expansionslängen beruht (Felbor et al., 2003). 1997 hatte man durch eine PFGE-Analyse von Geschwistern keine Änderung in der Expansionslänge festgestellt (Yu et al., 1997). Es wurde aber keine Untersuchung in verschiedenen Generationen durchgeführt. Die hier vorgelegten PFGE-Ergebnisse bei zwei Familien (P1, P2(MP1), P3, P4(MP3)) zeigten keine Expansionsänderung bei Familienmitgliedern unterschiedlicher Generationen. Während bei Krankheiten wie zum Beispiel dem Fra(X)-Syndrom, das zur Gruppe der sog. Trinukleotiderkrankungen gehört, eine Expansion von CGG Repeats bei der maternalen Weitergabe eines prämutierten Allels (ab 59 Repeats bis zu 200 CGG-Wiederholungen) an einen Sohn/Tochter erfolgt (Nolin et al., 2003), bleibt die Weitergabe expandierter Fragmente bei FRA16B stabil zwischen Mutter/Tochter (110kb) bzw. Mutter/Sohn (50kb). Ein Grund hierfür könnte die unterschiedliche Sequenzzusammensetzung zwischen CGG-Repeats und den AT-reichen Minisatelliten-Repeats sein.

In dieser Arbeit wurde die bisher größte Allel-Expansion von 110kb nachgewiesen. Die Auflösungsgrenze bezüglich der Bestimmung der Fragmentgrößen lagen für die Southern-Blot Analyse bei ca.  $\pm 2$ kb und für die PFGE bei ca.  $\pm 15$ kb. Mit der Southern-Blot Methode und den neu etablierten Markern in der FRA16B-Region besteht jetzt eine Möglichkeit kleine Expansionsänderungen zwischen Generationen zu überprüfen. Die gleiche Expansionslänge in Lymphozyten und dermalen Fibroblasten von Proband 1 weist auf eine stabile Weitergabe während der postzygotischen Entwicklung hin. Dies gibt einen wichtigen Hinweis, dass große Expansionen mit bis zu 96% AT-Gehalt ohne Probleme an Tochterzellen weitergegeben werden können.

Um die Variabilität der FRA16B-Allele bei normalen Kontrollen zu bestimmen, wurden neben Probanden weitere 61 Kontrollpersonen analysiert. Die Existenz der verschiedenen Locus-Längen (0,1-110kb) zeigt, dass diese Region dynamisch ist. Aufgrund der unterschiedlichen Allel-Längen der FRA16B-Region wurden die

FRA16B-Träger in 3 Gruppen (A: keine Locus-Expansion, B: kurze Locus-Expansion, C: Intermediäre Locus-Expansion) unterteilt.

Es ist denkbar, dass ab einer bestimmten Expansionslänge die chromosomale Region 16q21 so instabil wird, dass es zu einer konstitutionellen terminalen Deletion 16q21→qter kommt. Es ist aber in der Literatur keine komplette terminale Deletion 16q21→qter bekannt, was für eine Letalität solcher Deletionen spricht. Mehrfach wurde in der Literatur über interstitielle Deletionen (16q12.1-16q24.3) berichtet, die mit folgenden klinischen Symptomen assoziiert sind (Cooke et al., 1987; McDonald et al., 1987; Callen et al., 1993; Fujiwara et al., 1992):

- Verzögertes Wachstum
- Psychomotorische Retardierung
- Hypotonie
- Kleiner Kiefer (*micrognathia*)

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die Literaturangabe unterstützen die Hypothese, dass entweder die Träger einer solchen Fragilität klinisch normal sind und ihr Repairsystem in der Lage ist solche Chromosomenmutationen zu reparieren oder die Expansion so groß ist, dass es zu einer konstitutionellen Deletion (16q21→qter) kommt. Es können solche Deletionen (16q21→qter) auch im Mosaik vorkommen. Ob solche Fälle mit einer klinischen Auffälligkeit assoziiert sind, kommt auf die betroffenen Gewebe an.

Um die Allel-Verteilung zwischen Kontrollpersonen und mental retardierten Patienten zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die DNA von 61 Kontrollpersonen und 70 Patienten mit ungeklärter Retardierung mit Hilfe der Southern-Blot Methode analysiert. Dabei wurden die 70 Patienten, so wie die Kontrollen, in 3 Gruppen (A: keine Locus-Expansion, B: kurze Locus-Expansion, C: Intermediäre Locus-Expansion) unterteilt. Beim Vergleich der Allelverteilung der FRA16B-Region von Kontroll-Personen und mental retardierten Patienten besteht kein Unterschied (p-Wert = 0,23). Damit konnte gezeigt werden, dass die Manifestation der FRA16B-Region bei mental retardierten Patienten nicht signifikant häufiger vorkommt als bei der Normalbevölkerung.

## 4.2 Zytogenetik

### I. Temperaturänderungen

Mit zunehmender Temperatur während der Zellkultivierung nimmt der mitotische Index bei Proband 1 und beiden negativen Kontrollen (NK5 und NK6) signifikant ab ( $p$ -Wert= 0,000049). Der mitotische Index beschreibt das Verhältnis von Mitosen und Interphasen; eine Abnahme der Mitosen und damit die Verringerung des mitotischen Index ist ein sensibler Indikator für zelltoxische Einflüsse. Erhöhte Temperaturen beeinflussen viele temperatur-sensitive Enzyme, die an der Zellteilung und den Reparatursystemen beteiligt sind. So kann die DNA-Polymerase alpha in HeLa-Zellen durch Hitze oder auch durch ionisierende Strahlung sowie den Einsatz von Aphidicolin teilweise inaktiviert werden (Kampinga und Konings, 1987, Reidy 1988). Diese Inaktivierung führt zu einem so genannten DNA-Replikation-Stress (Howlett et al., 2005), der die Entstehung von Chromosomenbrüchen fördern kann und die Zunahme von CFSs in den Lymphozytenkulturen erklären könnte.

Von den verschiedenen Änderungen der Kulturbedingungen hatte nur die Änderung der Kultivierungstemperatur (39°-41 °C) einen Einfluss auf die Manifestation von Chromosomenbrüchen. Bei 41 °C zeigten die Kulturen fast keine Metaphasen und auch keine Interphasen. Die Temperaturzunahme induziert eine erhöhte Chromosomenbrüchigkeit beim Probanden 1 und beiden negativen Kontrollen. Für die gepoolten Daten von Kontrollen und Proband 1 ergibt sich ein signifikanter ( $p$ -Wert= 0,0062) Anstieg der Expression von Chromosomenbrüchen von 4,3/°C. Um zu überprüfen, ob Brüche in FS durch eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur signifikant überrepräsentiert sind, wurde die Bruchhäufigkeit mit den Gesamtlängen der FS im Genom, verglichen. Dabei wurden Region- und Subregionlängen aller bekannten FSs (Tabelle 8.1 und 8.2) aufgrund der aktuellen Genomdaten (<http://genome.ucsc.edu>, HG18) sowie durch Literatur-Recherchen ermittelt. Die Wahrscheinlichkeit für Bruch-Ereignisse ( $k$ ) in einem Intervall ist Poisson-verteilt, mit  $P(X = k) = \lambda^k / k! * e^{-\lambda}$ , wobei  $\lambda$  der Erwartungswert ist (hier also die dem Anteil der FS im gesamten Genom entsprechende Anzahl von Brüchen); der einseitige  $p$ -Wert für die Null-Hypothese, dass die Brüchigkeit in FS nicht höher ist als im restlichen Genom, ergibt sich demnach durch Aufsummieren aller  $P(X \geq k)$ .

Bei insgesamt 41 beobachteten Brüchen und einer Gesamtlänge des menschlichen Genoms von 3200 Megabasen erhalten wir für:

**CFS (19/41):** p-Wert = 0,0011 **RFS (4/41):** p-Wert= 0,2703

Hiermit konnte ich beweisen, dass die Anzahl der entstehenden Chromosomenbrüche in CFSs, die durch eine Temperaturerhöhung während der Kultivierung von Lymphoblasten verursacht werden, signifikant höher ist. Ca. 41% (17/41) der Chromosomenbrüche liegen nicht in bekannten FSs. Sie sind entweder durch Temperaturerhöhung zufällig entstandene Brüche oder neue temperatursensitive FSs. Lymphozyten sind Teil des zellulären Abwehrsystems des Menschen. Sollte die *in vitro* gefundene erhöhte Chromosomenbrüchigkeit bei Temperaturerhöhung auch *in vivo* entstehen, könnte dies die Funktionsfähigkeit der Lymphozyten beeinträchtigen und damit einen negativen Einfluss auf das Immunsystem haben.

## II. DAPI-Einsatz

Es ist bekannt, dass DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) an AT-reiche Regionen, wie beim FRA16B-Locus, der DNA bindet, (Pineda De Castro et al., 2002). Die Wirkung von DAPI auf die Manifestation von FRA16B in Metaphasechromosomen ist bei allen Probanden ähnlich, mit einem signifikanten (p-Wert= 0,0000049) mittleren Anstieg von 3,5 % / $\mu\text{g}$  /ml DAPI.

DAPI inhibiert *in vitro* die Bindung der Histonproteine an AT-reiche Regionen und destabilisiert damit die Nukleosomen. Dies erhöht wahrscheinlich die Fragilität und induziert Brüche, wie z.B. im FRA16B-Locus (Fitzgerald and Anderson, 1999). Die geringere FRA16B-Expression von Proband 5 bei erhöhter DAPI-Konzentration kann durch die geringe Expansionslänge von 6,5kb bedingt sein.

Als Vergleich kann Distamycin herangezogen werden, welches eine ähnliche Wirkung wie DAPI hat. Eine Korrelation zwischen erhöhter Kopienanzahl der 33bp AT-reichen Minisatelliten der FRA16B-Region und Abbau der Nukleosomen in Anwesenheit von Distamycin ist bereits *in vitro* nachgewiesen (Hsu und Wang, 2002). Distamycin hat wie DAPI eine starke Präferenz für AT-reiche Sequenzen und bindet an die AT-reichen Regionen in der kleinen Furche der DNA.

Bei Erhöhung der DAPI-Konzentration können auf beiden Chromatiden des Chromosoms 16 in 16q21 Brüche auftreten und sich dadurch azentrische Fragmente in Metaphasen bilden. Bei steigender DAPI-Konzentration war neben der Zunahme der FRA16B-Expression bei Probanden eine signifikante Abnahme des mitotischen Index zu beobachten, was für einen zytotoxischen Effekt des DAPI-Farbstoffs auf

Lymphozyten spricht. Bezüglich des zytotoxischen Effekts reagierten Probanden und Negativ-Kontrollen nahezu gleich ( $p$ -Wert= 0,52). Die beobachtete Abnahme des mitotischen Index um 0,2 % / $\mu\text{g/ml}$  ist signifikant ( $p$ -Wert =  $2,4 \cdot 10^{-16}$ ).

Ein Vergleich der in dieser Arbeit verwendeten Analyseverfahren zeigt deutlich, dass es keine direkte Korrelation zwischen Expansionslänge und spontaner FRA16B-Expression gibt. Proband 3 und dessen Mutter (Proband 4) besitzen gleiche Expansionslängen von ca. 50 kb der FRA16B-Region. Während die Mutter keine spontane Brüchigkeit an der FRA16B-Region (bei Standard Kulturbedingungen) zeigte, zeigte der Proband 3 16% (durch FISH-Analyse bestätigte) spontane Brüchigkeit an 16q21. Die spontane FRA16B-Expression im Gegensatz zur induzierbaren FRA16B (ca. 4,5%) ist sehr selten und man findet sie bei nur 0,6% der deutschen Population (Schmid et al., 1986). Möglicherweise ist mit der Vergrößerung der Expansion die Wahrscheinlichkeit einer spontanen FRA16B-Expression erhöht; Proband 5 mit 6,5 kb Expansionslänge (mit induzierbarer FRA16B-Expression) und Proband 3 mit 50 kb Expansionslänge (mit spontaner FRA16B-Expression) markieren die Grenze der Expansionslänge (6,5-50 kb), in der eine spontane FRA16B-Expression stattfinden kann. Proband 1 und die Mutter (Proband 2) mit ca. 110kb, Proband 3 mit ca. 50kb und Proband 6 mit ca. 90kb zeigten eine deutliche spontane FRA16B-Expression unter Standardkulturbedingungen.

In Bezug auf die Fragilität der Chromosomen bleibt die Frage noch offen: welche Sequenzen und welche Expansionslängen sind für eine Fragilität relevant? Bei DM2 (Myotonische Dystrophie Typ 2)-Trägern zum Beispiel findet sich keine Fragilität am Chromosom 3q21.3, obwohl die Anzahl der repetitiven Tetranukleotide (CCTG) bis auf 11000 Kopien (ca. 44kb) steigen kann (Strachan & Read 2004). Diese repetitiven Tetranukleotide verhalten sich entsprechend anders als die AT-reichen Sequenzen in 16q21.

### III. 2-Aminopurin-Einsatz

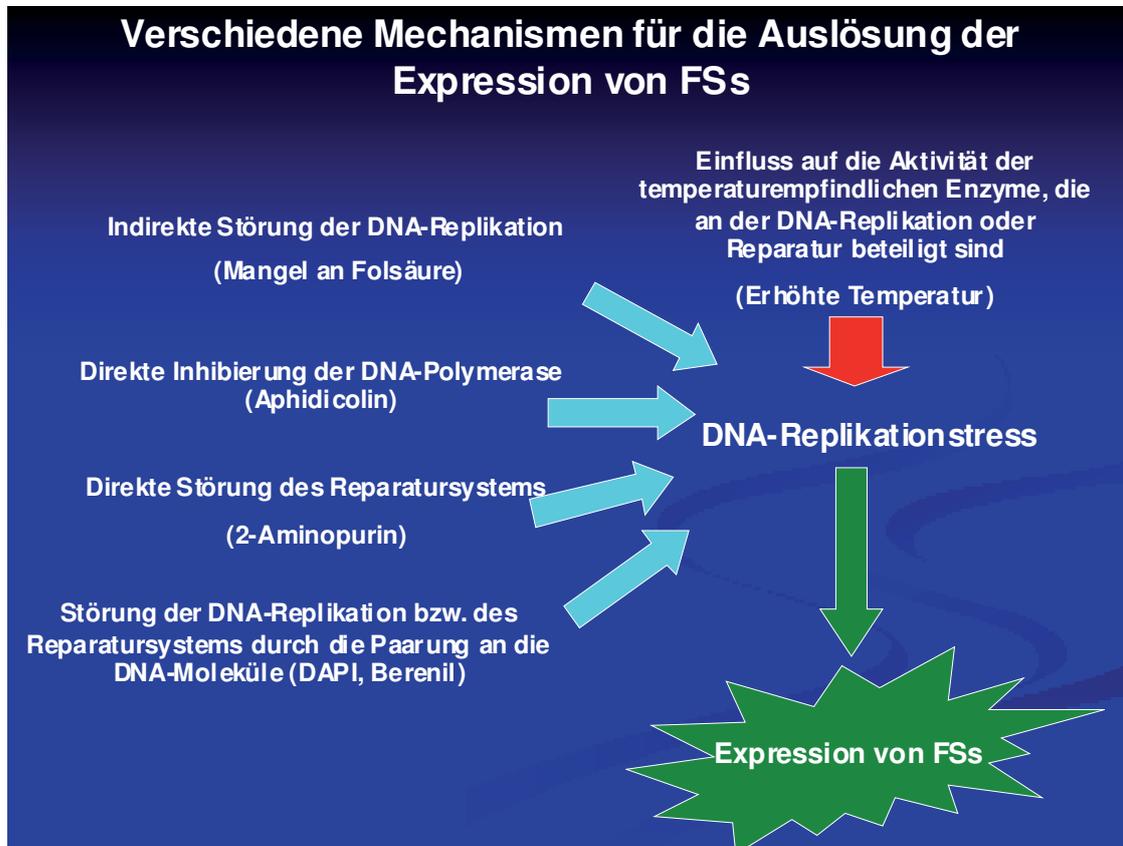
Der Protein Kinase Inhibitor 2-Aminopurin kann die beiden verwandten Proteinkinasen ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related) und ATM (Ataxia telangiectasia mutated) (Dimitrova und Gilbert, 2000; Huang et al., 2003) inhibieren. Sie spielen eine entscheidende Rolle im Reparatursystem. ATM und ATR reagieren früh auf bestimmte DNA-Läsionen, die z.B. durch DNA-Replikationstress oder ionisierte Strahlung entstehen. Sie können direkt oder indirekt durch ihre Interaktionspartner wie z.B. p53 eine DNA-Reparatur Apoptose oder einen

kontrollierten Zellzyklusstop veranlassen (Abraham et al., 2001). ATR aber nicht ATM spielt eine Hauptrolle bei der Kontrolle der FS-Expression. Durch den zusätzlichen Einsatz von 2-Aminopurin kann die Brüchigkeit an CFSs induziert werden (Casper et al., 2002). Im Rahmen dieser Dissertation wurde nur die Expression von FRA16B bei Probanden unter Einsatz von 2-Aminopurin untersucht. Es konnte eine Abnahme der Proliferationsraten (mitotischer Index) bei den negativen Kontrollen und Probanden beobachtet werden, die wahrscheinlich durch einen erhöhten DNA-Replikationstress bedingt ist. Dies spricht für einen zytotoxischen Effekt von 2-Aminopurin auf die Lymphozytenproliferation. Im Mittel nimmt der mitotische Index signifikant ( $p$ -Wert= 0,00000051) um 0,4 %/mM ab. Kontrollen und Probanden reagieren gleich ( $p$ -Wert= 0,84). Zunehmende 2-Aminopurin-Konzentrationen führten bei fast allen Probanden zu einer erhöhten FRA16B-Expression. Die Wirkung der 2-Aminopurin-Konzentration auf die FRA16B-Expression ist bei den Probanden unterschiedlich und bei Proband 5 nicht nachweisbar. Im Mittel lässt sich jedoch ein signifikanter Anstieg ( $p$ -Wert= 0,011) von 1,8 %/mM beobachten. Die geringe Expansionslänge bei Proband 5 (ca. 6,5kb) im Vergleich zu den anderen Probanden (50-110kb) könnte eine Erklärung für diesen Unterschied sein. Dies könnte bedeuten, dass die Reparatursysteme trotz der Anwesenheit des Reparaturinhibitors 2-Aminopurin bei kleinen Expansionen in der Lage sind, die Manifestation von FRA16B zu verhindern. Eine erhöhte FRA16B-Expression bei bestimmten FRA16B-Trägern und die reduzierten Proliferationsraten der Lymphozyten durch den Einsatz von 2-Aminopurin konnte erstmalig in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

AT-reiche Minisatelliten können bei Regionen wie FRA16B oder FRA10B eine sekundäre Struktur, einen „Hairpin“, bilden (Handt et al., 2000; Schwartz et al., 2006). Solche sekundäre Strukturen können bei der DNA-Replikation oder DNA-Reparatur ein Problem darstellen, weshalb sie in der späten S-Phase repliziert werden (Handt et al., 2000). Inhibiert man das Reparatursystem zusätzlich durch Chemikalien wie 2-Aminopurin, können viele solcher Regionen sich als fragile Stellen oder Brüche manifestieren. Die FRA16B-Expression der Probanden fällt bei Verwendung von 2-Aminopurin allgemein niedriger aus, als bei DAPI-Einsatz aus (Abbildung 3.5 und 3.7); ein Hinweis dafür, dass die Destabilisierung der Nukleosomen durch DAPI stärker wirkt, als die Störung des Reparatursystems durch 2-Aminopurin.

DNA-Replikation und Reparaturprozesse sind zwangsläufig miteinander verbunden. Jede Störung der DNA-Replikation und -Reparatur durch Chemikalien oder

Temperaturänderung kann durch DNA-Replikationstress die Manifestation bestimmter FSs auslösen. In Abbildung 4.3 wurden alle wichtigen Elemente für die Manifestation von FSs zusammengefasst.



**Abb. 4.3: Graphische Darstellung verschiedener Mechanismen für die Auslösung der Expression von FSs**

Die Expression von FSs lässt sich durch verschiedene Mechanismen auslösen. Die induzierbare Expression von FSs zeigt, dass solche instabilen Stellen normalerweise durch das Reparatursystem aufgehoben werden. Stört man diese komplexe Zusammenarbeit von DNA-Replikation oder DNA-Reparatursystem kann es zu einer direkten Brüchigkeit solcher instabiler Stellen in Metaphasechromosomen kommen. Erhöhte Temperatur ist im Vergleich zu anderen Chemikalien sehr unspezifisch, weil viele Enzyme, die im Stoffwechsel beteiligt sind, temperaturempfindlich sind.

## 4.3 FISH

### I. FISH an Lymphozyten

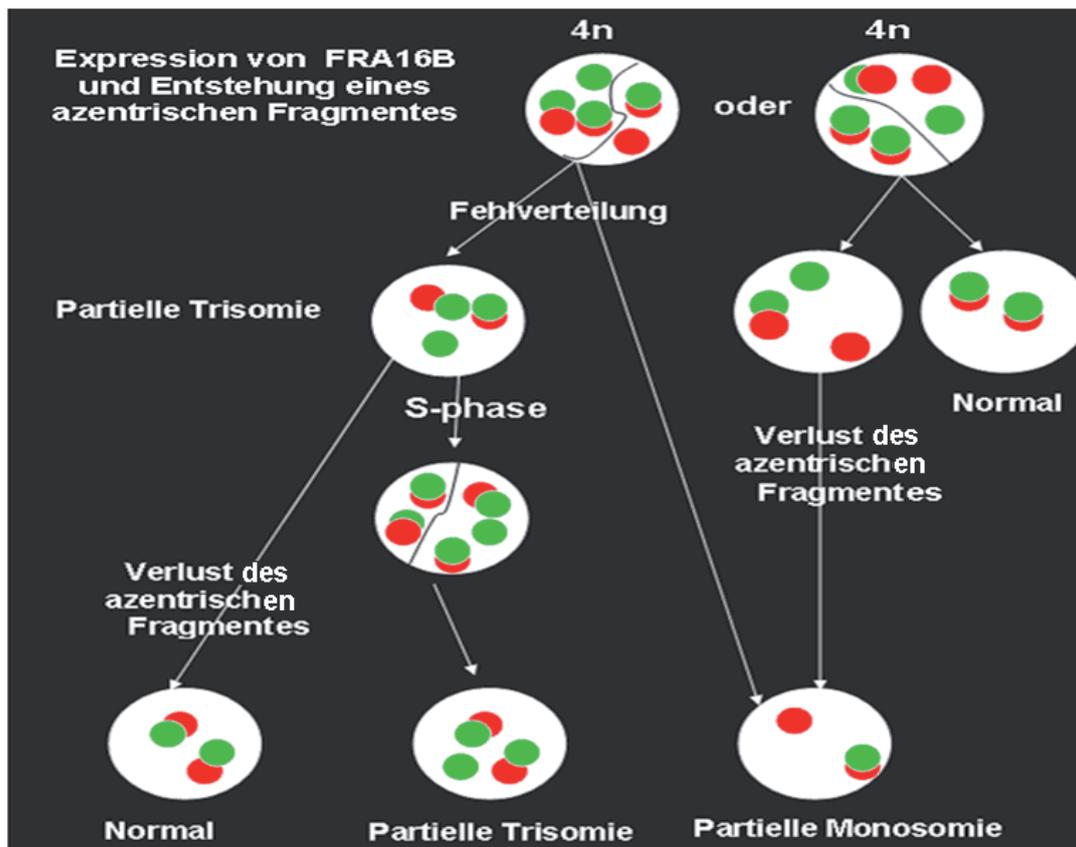
Durch die besondere Sequenzorganisation lässt sich die Expression von FRA16B auch in Interphasen mit molekularzytogenetischen Methoden untersuchen, was für die meisten FSs nicht möglich ist. Der Grund liegt darin, dass die FSs-Regionen

zumeist sehr lang sind und dadurch zwei unterschiedlich markierte farbige DNA-Sonden, die solche fragilen Stellen flankieren, keinen Brüchigkeitsnachweis zulassen. Mit FISH-Analysen lassen sich CFS-Regionen nur in Metaphasen durch fluoreszierende DNA-Sonden gut eingrenzen (Mishmar et al., 1998; Denison et al., 2003; Debacker et al., 2007; Curatolo et al., 2007). Im Rahmen dieser Dissertation wurden zum ersten Mal zwei Sonden zur FISH-Analyse entwickelt, die die FRA16B-Region exakt flankieren, sodass man die FRA16B-Expression sowohl in Interphasekernen als auch in Metaphasen bei verschiedenen Situationen analysieren kann (Abbildungen: 3.11-3.18). Die Lage der rot und grün markierten DNA-Sonden auf dem Chromosom 16 wurde mit einer Distanz von ca. 10kb so gewählt, dass ohne FRA16B-Expression, dass die roten und grünen Signale direkt nebeneinander liegen. Bei einem Bruchereignis in der FRA16B-Region ist eine getrennte Darstellung des roten und grünen Fluoreszenzsignals möglich (Split-Signal). Die Qualität der Sonde wurde bei Kontrollen und Probanden in Interphasekernen und an Metaphasechromosomen verglichen und überprüft. Dieser methodische Ansatz hat sich für eine direkte Identifizierung der Fragilität in Interphasekernen und damit z.B. den Fragilitätsnachweis in G<sub>0</sub>-Lymphozyten bewährt. Im Gegensatz zu konventionellen zytogenetischen Methoden ermöglicht die FISH-Analyse einen exakten Nachweis der Brüchigkeit in FRA16B ohne Verwechslung mit anderen in der Nähe liegende FRA-Stellen (FRA16C und FRA16D) am Chromosom 16q (Abbildung 1.5).

Die FISH-Analyse zur FRA16B-Manifestation in Lymphozyten-Metaphasen bestätigen die zytogenetischen Ergebnisse, die bereits diskutiert wurden. Die unterschiedlichen FRA16B-Expressionen in der G<sub>0</sub>-Phase der Lymphozyten zeigen in erster Linie, dass es keine Korrelation zwischen der Expansionslänge und der FRA16B-Expression gibt.

In 0,02-0,06% der Lymphozyten des peripheren Bluts von gesunden Menschen ist eine DNA-Replikation nach Einsatz von <sup>3</sup>H-Thymidin nachweisbar (Bond et al., 1958). Trotz dieser physiologischen Ruhephase lassen sich FRA16B Fragilitäten in der G<sub>0</sub>-Phase nachweisen; dies zeigt unter anderem, dass die FRA16B-Manifestationen tatsächlich *in vivo* existieren und keine Kulturartefakte sind. Außerdem zeigt es, dass solche Bruchereignisse in jedem Zellstadium vorkommen und das Reparatursystem nicht in der Lage ist, sie komplett aufzuheben. Sie entgehen teilweise dem Reparatursystem (Casper et al., 2002). Mit der FISH-Analyse aller Probanden-Lymphozyten war ein sehr großer FRA16B-Expressionsunterschied zwischen den

Interphasen und Metaphasen bei erhöhter DAPI-Konzentration auffällig (Tabelle 3.8). Die erhöhte FRA16B-Expression in den Metaphasechromosomen könnte durch mechanische Einflüsse bei der Chromosomenkondensations (G2→M) bedingt sein. Ein zusätzlicher mechanischer Effekt wäre bei der Einlagerung der DAPI-Moleküle in die AT-reichen DNA-Regionen und Verhinderung der Nukleosomen-Bildung zu denken. Die Entstehung der seltenen Formen beim Einsatz von DAPI in den Interphasen beruht möglicherweise auf der Fehlverteilung während der 72h Kultivierung. Abbildung 4.4 zeigt eine einfache Darstellung für die Entstehung von partiellen Monosomien und Trisomien.



**Abb. 4.4: Einfache Darstellung der Entstehung seltener Fehlverteilungen von Chromosomen beim Einsatz von DAPI**

Die Entstehung eines azentrischen Fragmentes kann theoretisch durch eine Fehlverteilung während der Anaphase zur partiellen Monosomie oder Trisomie führen. Das azentrische Fragment ist in der Regel instabil und wird mit steigender Anzahl von Zellteilungen verschwinden, wobei die partielle Monosomie erhalten bleibt, die partielle Trisomie jedoch persistiert. Rot-grüne Kreise sollen die markierten BAC-DNAs, die die 16q21-Subregion flankieren, repräsentieren (siehe Abbildung 3.10).

Die Analyse der FRA16B-Manifestation der seltenen Formen in Interphasekernen ist nur mit der FISH-Technik möglich gewesen, während mit der konventionellen Zytogenetik nur die Metaphasen untersucht werden können.

## II. FISH an Fibroblasten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine gewebsspezifisch unterschiedliche FRA16B-Expression nach DAPI-Einwirkung sowohl zytogenetisch als auch mit der FISH-Methode nachgewiesen werden. Die auffällig geringe Fragilität der FRA16B-Region an Hautfibroblasten von Proband 1 (im Vergleich zu seinen Lymphozyten) könnte auf eine effektivere Reparatur in Hautfibroblasten hinweisen und für eine gewebsspezifische Reparaturkontrolle sprechen. Hinweise für eine unterschiedliche FRA16B-Expression in Lymphozyten und Fibroblasten fanden schon Shabati et al., (1980) mit konventionellen zytogenetischen Methoden bei einem FRA16B-Träger. Dabei konnte nicht nachgewiesen werden, ob dieser FRA16B-Expressionsunterschied durch eine unterschiedlich effektive DNA-Reparatur bedingt ist, oder ob in Lymphozyten und Fibroblasten verschieden lange FRA16B-Regionen die Ursache dieser Diskrepanz sind.

Während der postzygotischen Entwicklung könnten sich unterschiedliche Expansionslängen der FRA16B-Region in unterschiedlichen Geweben entwickeln und möglicherweise für eine unterschiedliche FRA16B-Expression verantwortlich sein. Durch Messung der Expansionslänge in Lymphozyten und Fibroblasten desselben Probanden (Proband 1) konnte jedoch nachgewiesen werden, dass keine unterschiedlichen FRA16B-Expansionslängen der FRA16B-Region zwischen Lymphozyten und Hautfibroblasten vorliegen. Somit ist eher anzunehmen, dass unterschiedlich aktive Reparatursysteme Ursache der gewebsspezifischen FRA16B-Expression sind. Hinweise für solche unterschiedlichen Reparatursysteme zwischen humanen epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten wurden nach Behandlung mit Gammastrahlen oder Adriamycin (DNA wirksames Mutagen) gefunden (Flatt et al., 1998); die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die vom Zellzyklus abhängigen Checkpoint-Proteinkinasen gewebespezifisch auf die Strahlung von toxischen Chemikalien reagieren. Außerdem wurde die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen (SSB; *single-strand break*) nach der Behandlung mit Methyl-Methansulfonat (MMS) bei peripherem Blut und dermalen Fibroblasten derselben Person verglichen. Die Reparatur der SSBs war nach MMS-Induktion in peripheren Blutzellen geringer als in Fibroblasten. Dies bestätigt eine

unterschiedliche Aktivität der Reparatursysteme in verschiedenen Geweben (Boerrigter et al., 1991). Außerdem ist der Einfluss von DNA-Replikationsstress induzierenden Chemikalien, wie DAPI, bei Fibroblasten erheblich geringer als bei Lymphozyten. Bei Behandlung mit DAPI-III (20µg/ml) fanden sich bei Hautfibroblasten erhöhte FRA16B-Expressionen bis zu 16% in den Interphasen, aber hier konnten keine Metaphasechromosomen erhalten werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sie entweder vorzeitig in die Metaphase übergegangen sind oder noch in der G1 oder S-Phase geblieben sind. Es zeigt sich, dass das Zellzyklus-Kontrollsystem der Fibroblasten sensibler gegen toxische DAPI-Einflüsse reagiert im Vergleich zu Lymphozyten.

#### 4.4 Klinisch auffällige FRA16B-Träger

Das kontroverse Thema, ob durch die FRA16B-Expression klinische Konsequenzen entstehen, wurde bereits in der Literatur diskutiert (Sorensen et al., 1979). Shabati et al. (1980) berichteten von vier Familien mit Infertilität und Fehlbildungen, die zytogenetisch eine Manifestation von FRA16B zeigten. McKenzie et al. (2002) beschrieben überlappende klinische Auffälligkeiten von einem Vater mit seinen 3 Kindern, die FRA16B-Träger waren und die unterschiedliche FRA16B-Expression in ihren kultivierten Lymphozyten zeigten. McKenzie et al. vermuteten eine Korrelation zwischen den klinischen Auffälligkeiten und der FRA16B-Expression.

Andererseits fanden Schmid et al. (1986) bei 18 FRA16B-Trägern (Berenil-induzierbare FRA16B) in einer deutschen Population keine klinischen Auffälligkeiten. Auch bei einem FRA16B-Träger mit homozygoter FRA16B-Expression (Nachweis mit konventionell zytogenetischen Methoden) wurden keine Auffälligkeiten beschrieben (Hocking et al., 1999). Außer Proband 3 sind auch in dieser Arbeit alle untersuchten Probanden klinisch unauffällig.

Die FRA16B-Region enthält kein kodierendes Gen. 2005 wurde bei [www.ucsc.edu.org](http://www.ucsc.edu.org) für die FRA16B-Region ein putatives Gen, LOC283867 beschrieben, dessen Expression und Funktion in Geweben bisher unbekannt ist. Im Gegensatz zur FRA16B-Region gibt es aber einige Krankheiten, wie z.B. IDDM2 (*insulin-dependent diabetes mellitus 2*) oder EPM1 (*progressive myoclonus epilepsy type 1*), bei denen die Expansion von repetitiven Minisatelliten in der Nähe von kodierenden Regionen liegt und vermutlich mit der Auslösung der Krankheit assoziiert ist (Pugliese et al., 1997; Vafiadis et al., 1997 und Lalioti et al., 1997). Von

8 molekulargenetisch charakterisierten RFSs enthalten nur 4 Gene (FRAXA: FMR1-Gen, FRAXE: FMR2/FMR3-Gen, FRAXF: FAM11A-Gen und FRA11B: CBL2-Gen). Alle außer FRAXF sind mit klinischen Auffälligkeiten verbunden. FRA16A und FRA16B enthalten keine Gene (Sutherland, 2003). Klinische Auffälligkeiten könnten bei FRA16B-Trägern jedoch auftreten, wenn die Expansion in 16q21 zu einer terminalen Deletion 16q21→qter führt. Der Verlust eines so großen Chromosomenstückes (16q21→qter ist 24,82Mb groß), das ca. 250 proteinkodierende Gene enthält, kann einen Abbruch der embryonalen Entwicklung und damit zu einem Abort führen. Die FRA16B-Region ist auf beiden Seiten mehrere Megabasen von genhaltigen Regionen entfernt; damit ist die regulatorische Funktion auf andere kodierende Gene eher unwahrscheinlich.

Die AT-reichen Regionen (AT-Inseln) werden häufig durch bestimmte Proteine an die Kernlamina angeheftet. Die Chromatin-Bindungsstellen werden als Matrix-Anheftungsregionen (MARs) bezeichnet. MARs sind wichtige Elemente in Nukleusorganisation, die an DNA-Amplifikation, gewebespezifische Transkription und Mitoseablauf beteiligt sind (Benham et al., 1997; Bode et al., 2000; Chernov et al., 2002). Es ist bekannt, dass diese AT-Inseln sehr spezifisch an die *in vitro* isolierte Kernmatrix binden. Dies wurde auch für die FRA16B-Region gezeigt (Jackson et al., 2003). Ob eine extrem große FRA16B-Expansion zu einer Änderung dieser MARs und damit zu einer pathologischen Regulationsänderung an weit entfernten Genen führt, bleibt unklar.

Bei einer extrem AT-reichen Locus-Expansion in der FRA16B-Region (bei Proband 3 ca. 50kb) und aufgrund der fehlenden Homologieregion an diesem Locus während der Meiose ist denkbar, dass die Paarung der homologen Chromosomen während der Oogenese gestört ist. Dabei könnte durch Chromosomen-Fehlverteilung eine Uniparentale Disomie 16, upd(16), entstehen. Upd(16) ist eine häufige Form von UPDs, die meist mit mentaler- und Wachstumsretardierung assoziiert ist. Dies würde auf „Imprinted Genes“ auf Chromosom 16 hinweisen (Young et al., 2002), obwohl bisher kein entsprechendes Gen gefunden wurde. Die Untersuchung an vier polymorphen Mikrosatelliten von Proband 3 erbrachte keinen Hinweis auf eine uniparentale Disomie 16, upd(16). Die Ergebnisse zeigten, dass das expandierte maternale Chromosom 16 nicht eine Chromosomenfehlverteilung des Chromosoms 16 während der Oogenese verursacht hat.

Die klinischen Befunde bei Proband 3 sind mentale Retardierung und verzögerte Sprachentwicklung, begleitet von Infekten (vor allem Erkältungen). Sie stimmen nicht

mit den klinischen Phänotypen der in der Literatur beschriebenen Patienten mit FRA16B (McKenzie et al., 2002, Shabati et al., 1980) oder Patienten mit partiellen interstitiellen Deletionen in 16q21→qter (Cooke et al., 1987; McDonald et al., 1987 Callen et al., 1993; Fujiwara et al., 1992) überein.

Glasser et al. (2006) berichtete über eine Mutter und ihrer Tochter mit Neutropenie (Verminderung der neutrophilen Granulozyten), deren Symptome von Fieber, Hautinfektionen und häufigen bakteriellen Infektionen begleitet waren. Die beiden zeigten eine spontane FRA16B-Expression im peripheren Blut. Die Knochenmarksuntersuchung zeigte ebenfalls eine erhöhte FRA16B-Expression bei beiden. Bei der Analyse des Knochenmarkes des Kindes wurde im Mosaik eine Deletion in 16q21→qter mit einer Häufigkeit von 50% festgestellt. Bei Proband 3 wurde jedoch kein Deletionsmosaik bei der Auswertung von 150 Interphasekernen und 50 Metaphasechromosomen an 16q festgestellt.

Die bis jetzt veröffentlichten Literaturhinweise und die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit weisen auf keine direkte Korrelation zwischen der FRA16B-Expression und klinischen Auffälligkeiten hin. Die mit ca. 1,5%iger Häufigkeit auftretende Deletion an Chromosom 16q-terminal bei Proband 3 ist genauso bei der unauffälligen Mutter zu sehen, was wahrscheinlich auf einer sekundären FRA16B-Expression beruht, indem das entstehende azentrische Fragment verloren geht.

## 4.5 Bioinformatik

Um eine exakte Übersicht über die gesamten FSs und ihre Korrelation mit AT-reichen Regionen zu erhalten, wurden die unterschiedlichen Ergebnisse des *AT-Block-Finder* zusammen mit den menschlichen Chromosomen und bisher bekannten FSs (Tabelle 8.1 und 8.2) im Ergebnisteil dargestellt (Abbildungen 3.31a/b). Es ist bekannt, dass die CFSs oft AT-reich sind und eine hohe DNA-Flexibilität und geringe Stabilität besitzen (Arlt et al., 2002; Curatolo et al., 2007; Mishmar et al., 1998; Ried et al., 2000; Zlotorynski et al., 2003). Die Sequenzanalyse von 8 molekulargenetisch charakterisierten CFSs (FRA3B, FRA6F, FRA7E, FRA7G, FRA7H, FRA7I, FRA16D und FRAXB) zeigten kurze AT-reichen Regionen (<1kb mit ca. 78% AT-Gehalt), die eine hohe DNA-Flexibilität besitzen (Zlotorynski et al., 2003). Die Analyse des *AT-Block-Finder* Programms hat jedoch gezeigt, dass nur wenige CFSs (ca. 15%) mit bestimmten Längen von AT-reichen (77%-96%) Blöcken über 1kb Größe assoziiert

sind. Keine der obengenannten 8 CFSs enthalten AT-reiche Blöcke über 1kb. Ein Hinweis dafür, dass die hohen AT-reichen Blöcke über 1kb weniger mit der Expression von CFSs involviert sind.

Als zweites wurden AT-Block-Regionen und Regionen mit gleicher Struktur wie FRA16B in verschiedenen menschlichen Chromosomen lokalisiert. Mit Hilfe des *AT-Block-Finders* kann die Länge und der prozentuale AT-Gehalt im gesamten Genom festgestellt werden. Wenn die AT-Organisation der FRA16B-Region das einzige Kriterium für die FRA16B-Manifestation gewesen wäre, dann hätte man an allen 53 Stellen mit gleicher Struktur wie FRA16B-Region eine Fragilität erwartet, was nicht der Fall war. Außer FRA16B (RFS) liegen nur 6/53 Regionen (4p15.3 (CFS), 7p11.2 (RFS), 7q11.21 (CFS), 7q31.1(CFS), 10q21.3(CFS), und 12q21.3(CFS)) in FSs. Das bedeutet, dass die meisten (ca. 90%) AT-Blöcke mit ähnlicher AT-Organisation wie FRA16B nicht zu einer Fragilität führen.

Um die Frage zu beantworten, ob bei den 53 Stellen ähnliche Elemente wie die 33bp-Minisatelliten existieren, wurden alle Stellen durch ein Repeatmasker-Programm (Version 3.2.7 bei: <http://genome.ucsc.edu>, Update: 1.05.09) auf repetitive Sequenzen untersucht. Dabei wurden in den meisten Regionen SINEs (Alu-Familie, 30-280bp), LINEs (LINE-1-(Kpn)-Familie: ca. 1,4kb) und zahlreiche einfache (simple) repetitive-Elemente (ähnlich wie FRA16B-Region) gefunden. Es ist zurzeit nicht klar aus welchen Gründen es im FRA16B-Locus zu einer Expansion der 33bp-Minisatelliten kommt. Außerdem liegen fast alle in dieser Arbeit gefundenen AT-reichen Blöcke außerhalb von Genen. Ein Grund könnte die instabile Natur dieser AT-reichen VNTR-Minisatelliten sein.

Mit der Erhöhung des AT-Gehaltes findet man wenige AT-Blöcke (z. B. nur 8 Stellen mit mind. 2kb, mind. 96%). Diese 8 Regionen sind im Aufbau vergleichbar mit einer expandierten 33bp AT-reichen FRA16B Region, ohne dass es hier zu einer Brüchigkeit kommt. Solche Stellen mit sehr hohem AT-Gehalt sind sehr kurz und selten. Die Ursache könnte darin liegen, dass solche Regionen, thermodynamisch instabil sind, da A und T nur durch zwei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Möglicherweise sind sehr AT-reiche Regionen ein evolutionärer Nachteil, da dies zu einem Chromatidbruch und damit zur Destabilisierung des gesamten Genoms führen kann.

Die Existenz dieser 8 Stellen mit 2kb großer AT-reicher Sequenz (mind. 96% AT-Gehalt) im menschlichen Genom, die nicht in FS-Regionen liegen, zeigt

wahrscheinlich, dass die Sequenzzusammensetzung eine entscheidende Rolle bei der Manifestation von FRA16B spielen.

Die Anreicherung von AT-reichen Sequenzen (wie beim FRA16B-Locus) in vielen Regionen des gesamten Genoms lässt vermuten, dass sich die VNTR-Elemente durch ständige dynamische Duplikationen oder Deletionen, durch ungleiches Crossing-over, ungleichen Schwesterchromatid-Austausch oder Slippage Model, ändern.

## 5. Zusammenfassung

FRA16B ist mit 5% Populationshäufigkeit die am häufigsten vorkommende RFSs in der europäischen Bevölkerung. Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit der Etablierung von neuen molekulargenetischen, molekularzytogenetischen und bioinformatischen Methoden die Manifestation FRA16B-Region in menschlichen Zellen untersucht. Bei der Charakterisierung der Kultivierungsbedingungen wurde festgestellt, dass nicht nur Chemikalien, sondern auch eine erhöhte Temperatur von bis zu 40°C während der 72h-Kultivierung zu Chromosomenbrüchen führt. 59% dieser Brüche liegen signifikant in bekannten CFSs. Bei den FISH-Analysen zeigte sich, dass die FRA16B-Manifestation sogar in der G<sub>0</sub>-Phase vorkommt. Die Existenz der FRA16B-Expression in der G<sub>0</sub>-Phase beweist, dass die FRA16B-Expression kein Kulturartefakt ist. Hiermit muss die alte FSs-Definition, die sich bis jetzt auf die Metaphasechromosomen begrenzte, auf Interphasen erweitert werden. Im Vergleich zu der zytogenetischen Untersuchung zeigte die FISH-Analyse viele Vorteile. Ein wichtiger Vorteil der in meiner Arbeit entwickelten FISH-Sonden liegt darin, dass sie zu einer direkten und schnellen Diagnose der Fragilität an der FRA16B-Region verwendet werden können. Die Southern-Blot und PFGE-Ergebnisse von 143 untersuchten Personen (70 mental retardierte Patienten, 61 Kontrollpersonen, 6 Probanden und 6 negative Kontrollen) zeigten, dass die Expansionslänge der FRA16B-Region von 0,1kb-110kb variieren kann. Es konnte kein signifikanter Unterschied bei der Allel-Verteilung zwischen 70 mental retardierten Patienten und 61 Kontrollen nachgewiesen werden. Die PFGE-Analyse der DNA von zwei Probanden-Familien zeigte, dass die Länge der FRA16B-Expansion zwischen den Generationen stabil weitergegeben wird. Es wurde bis jetzt nur die Expansionslänge von Geschwistern untersucht. Außerdem konnte die stabile somatische Weitergabe der FRA16B-Expansionslänge in dermalen Fibroblasten und Lymphozyten bei einem FRA16B-Träger nachgewiesen werden. Proband 1 (FRA16B-Träger 1) mit einer Expansion von ca. 110kb zeigte die größte FRA16B-Expansion, die in der Literatur bisher beschrieben wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass zwischen der Expansionslänge und spontaner FRA16B-Manifestation keine direkte Korrelation besteht. Die unterschiedliche FRA16B-Expression zwischen den Lymphozyten und dermalen Fibroblasten des Probanden 1, die in der FISH-Analyse gefunden wurde, unterstützt die Hypothese, dass es ein gewebspezifisches Kontrollsystem für die Manifestation von FSs gibt. Die PFGE-Ergebnisse und die zusätzlichen

molekulargenetischen und FISH-Analysen bei Proband 3, der klinisch auffällig war, gaben keine Hinweise auf eine Korrelation zwischen seinen Symptomen und der Expression von FRA16B.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine neue Software (*AT-Block-Finder*) für die Identifizierung der AT-reichen Regionen entwickelt. Die bioinformatischen Ergebnisse zeigten, dass viele dem FRA16B-Locus ähnliche Regionen im menschlichen Genom existieren (53 Loci), die meisten (90%) aber nicht in bekannten „Fragile Sites“ liegen. Damit ist klar, dass die AT-Organisation kein ausreichendes Kriterium für die FRA16B-Expression ist.

---

## Abstract

The rare fragile site (RFS) FRA16B occurs in 5% (cytogenetic recognizable) of the European population and is the most frequent RFSs. In this thesis the FRA16B region has been analyzed by establishing new molecular genetic, molecular cytogenetic and bioinformatic methods. By characterization of the culture conditions I could show that not only chemicals but also increasing the temperature to 40°C within the 72h cultivation time lead to chromosome breaks. 59% of these breaks were located in known FSs. FISH-analysis showed that the manifestation of FRA16B occurs even in G<sub>0</sub>-phase. The existence of FRA16B expression in the G<sub>0</sub>-phase demonstrated that this expression is not a culture artefact but an event that can even be identified in every phase of the cell cycle. This result should lead to a new FSs definition including interphases, which is currently confined to metaphase chromosomes. Differential FRA16B expression between the lymphocytes and dermal fibroblasts from the same proband, using FISH analysis, have confirmed the distinctly tissue specific control of expression of fragile sites. In comparison to cytogenetics this work showed that FISH-analysis with the newly developed probes has many advantages, for example they can be utilized as a direct and rapid diagnosis of FRA16B fragility. Using Southern-blot and PFGE-methods I studied 143 persons (70 mentally retarded patients, 61 controls, 6 probands and 6 negative controls) to analyse the variability of this region. These results showed that the expansion length varies between 0.1-kb to 110kb. The allele distribution of FRA16B-region between 61 controls and 70 patients was not significantly different. In my thesis work I showed a stable somatic transfer of FRA16B expansion length between generations in 2 families. Furthermore, a stable somatic transfer of FRA16B expansion length (110kb) could be demonstrated in dermal fibroblasts and lymphocytes in a FRA16B carrier. An expansion of approx. 110kb in one proband showed the largest FRA16B expansion known in the literature to date. Furthermore, FISH and PFGE analyses in lymphocytes of probands have shown that there is no direct correlation between expansion length and spontaneous manifestation of FRA16B. The FISH and molecular genetic analysis of proband 3 with clinical features did not indicate a correlation between the FRA16B expression and his clinical features.

For the identification of AT-rich regions, a new bio-software was developed (*AT block-finder*). Bioinformatic results showed that several sequences similar to the FRA16B-region exist in the human genome (53 loci). The majority (90%) of them

were not located in well-known "fragile sites". So it is clear that the AT organisation alone is not a sufficient criterion for expression of a fragile site.

## 7. Literaturverzeichnis

**Abraham RT.:** Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases (2001). *Genes & Development* 15, No. 17: 2177-2196.

**Arlt MF.,** Miller DE., Beer DG., and Glover TW.: Molecular characterization of FRAXB and comparative common fragile site instability in cancer cells (2002). *Genes Chromosomes Cancer* 33:82-92.

**Becker NA.,** Thorland EC, Denison SR, Phillips LA and Smith DI.: Evidence that instability within the FRA3B region extends four megabases (2002). *Oncogene* 21: 8713-8722.

**Bednarek AK.,** Laflin KJ., Daniel RL., Liao Q., Hawkins KA. and Aldaz CM.: WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3–24.1, a region frequently affected in breast cancer (2000). *Cancer Res.* 60: 2140–2145.

**Benham C.,** Kohwi-Shigematsu T., Bode J.: Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions (1997). *J Mol Biol.* Nov 28;274(2):181-96.

**Bettex M.,** Graf B., Winkler B., Gerber-Huber S.: Oro-palatal dysplasia Bettex-Graf: a new syndrome (1998). *Eur J Pediatr Surg* 8: 4-8.

**Bode J.,** Benham C., Ernst E., Knopp A., Marschalek R., Strick R., Strissel P: Fatal connections: when DNA ends meet on the nuclear matrix (2000). *J Cell Biochem Suppl.*; 35:3-22.

**Bond VP.,** Cronkite EP., Fliedner TM., Schork P.: Deoxyribonucleic and synthesizing cells in peripheral blood of normal human beings (1958). *Sience* 128:202-203.

**Boerrigter ME.,** Mullaart E., Vijg J.: Induction and disappearance of DNA strand breaks in human peripheral blood lymphocytes and fibroblasts treated with methyl methanesulfonate (1991). *Exp Cell Res.* Jan 192(1):61-6.

**Callahan G.**, Denison SR., Phillips LA., Shridhar V. and Smith DI.: Characterization of the common fragile site FRA9E and its potential role in ovarian cancer (2003). *Oncogene* 22: 590–601.

**Callen DF.**, Eyre H., Lane S., Shen Y., Hansmann I., Spinner N., Zackai E., McDonald- McGinn D., Schuffenhauer S. and Wauters J.: High resolution mapping of interstitial long arm deletions of chromosome 16: relationship to phenotype (1993). *Journal of Medical Genetics* 30: 828-832.

**Casper AM.**, Nghiem P., Arlt MF., and Glover TW.: ATR regulates fragile site stability (2002). *Cell* 111:779-789.

**Chernov IP.**, Akopov SB., Nikolaev LG., Sverdlov ED.: Identification and mapping of nuclear matrix-attachment regions in a one megabase locus of human chromosome 19q13.12: long-range correlation of S/MARs and gene positions (2002). *J Cell Biochem.*;84(3):590-60.

**Chu G.**, Voolrath D., and Davis R. W.: Separation of large DNA molecules by countour-. clamped homogeneous electric fields (1986). *Science* 234: 1582-1584.

**Ciullo M.**, Debily M.A., Rozier L., Autiero M., Billault A., Mayau V.: Initiation of the breakage-fusion-bridge mechanism through common fragile site activation in human breast cancer cells: the model of PIP gene duplication from a break at FRA7I (2002). *Hum Mol Genet* 11 (23): 2887-2894.

**Cooke A.**, Tolmie J., Darlington W., Boy E., Thomson R., Ferguson-Smith MA.: Confirmation of a suspected 16q deletion in a dysmorphic child by flow karyotypes analysis (1987). *J Med Gent* 24:88-92.

**Curatolo A.**, Limongi Z. M., Pelliccia F., and Rocchi A.: Molecular Characterization of the Human Common fragile Site FRA1H (2007). *Genes, Chromosomes and Cancer* 46 (5):487–493.

**Dagmar M.**, Beer DG., Wilke CW., Miller DE. and Glover TW.: Frequent deletions of *FHIT* and *FRA3B* in Barrett's metaplasia and esophageal adenocarcinomas (1997). *Oncogene* 15: 1653–1659.

**Debacker K.**, Winnepeninckx B., Ben-Porat N., FitzPatrick D., Luijk RV., Scheers S. Kerem B., Kooy RF.: *FRA18C*: a new aphidicolin-inducible fragile site on chromosome 18q22, possibly associated with in vivo chromosome breakage (2007). *Journal of Medical Genetics* 44:347-352.

**Debacker K.**, Winnepeninckx B., Longman C., Colgan J., Tolmie J., Murray R., van Luijk R., Scheers S., FitzPatrick D., Kooy F.: The molecular basis of the folate-sensitive fragile site *FRA11A* at 11q13 (2007). *Cytogenet Genome* 119:9-14

**Denison SR.**, Callahan G., Becker NA., Phillips LA. and Smith DI.: Characterization of *FRA6E* and its potential role in autosomal recessive juvenile parkinsonism and ovarian cancer (2003). *Genes Chromosomes Cancer* 38: 40–52.

**Denoeud F.**, Vergnaud G., Benson G.: Predicting Human Minisatellite Polymorphism (2003). *Genome Res.* 2003 13: 856-867.

**Dimitrova DS., Gilbert DM.:** Temporally coordinated assembly and disassembly of replication factories in the absence of DNA synthesis (2000). *Nature Cell Biology* 2: 686-694.

**Drouin R.**, Boutouil M., Fetni R., Holmquist G.P., Scott P., Richer C.L.: DNA replication asynchrony between the paternal and maternal alleles of imprinted genes does not straddle the R/G transition (1997). *Chromosoma* 106 (6): 405-411.

**Druck T.**, Hadaczek P., Fu TB., Ohta M., Siprashvili Z., Baffa R., Negrini M., Kastury K., Veronese M.L., Rosen D.: Structure and expression of the human *FHIT* gene in normal and tumor cells (1997). *Cancer Res.* 57: 504–512.

**Dover GA.:** Slippery DNA runs on and on and on (1995). *Natur Genet* 10:254-256.

**Fechter A.**, Buettel I., Kuehnel E., Savelyeva L, Schwab M.: Common fragile site FRA11G and rare fragile site FRA11B at 11q23.3 encompass distinct genomic regions (2007). *Genes Chromosomes Cancer*. 46(1):98-106.

**Fechter A.**, Buettel I., Kuehnel E., Schwab M., Savelyeva L.: Cloning of genetically tagged chromosome break sequences reveals new fragile sites at 6p21 and 13q22 (2006). *Int J Cancer*.1;120(11):2359-67.

**Felbor U.**, Feichtinger W., Schmid M.: The rare human fragile site 16B (2003). *Cytogenetic and Genome Research*100:85-88.

**Ferber MJ.**, Thorland EC., Brink AA., Rapp AK., Phillips LA., McGovern R.: Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma (2003). *Oncogene* 22 (46): 7233-7242.

**Fischer U.**, Radermacher J., Mayer J., Mehraein Y., Meese E.: Tumor hypoxia: Impact on gene amplification in glioblastoma (2008). *International Journal of Oncology* 33: 509-515.

**Flatt PM.**, Price JO., Shaw A. and Pietenpol JA.: Differential cell cycle checkpoint response in normal human keratinocytes and fibroblasts (1998). *Cell Growth & Differentiation* 9(7):535-543.

**Fitzgerald DJ., Anderson JN.**: Selective Nucleosome Disruption by Drugs That Bind in the Minor Groove of DNA (1999). *The Journal of Biological Chemistry*. 274 (38): 27128–27138, 1999.

**Fujiwara M.**, Yoshimoto T, Morita Y, Kamada M.: Interstitial deletion of chromosome 16q: 16q22 is critical for 16q- syndrome (1992). *Am J Med Genet* 43:561-564.

**Gecz J.**, Gdeon AK., Sutherland RS., Mulley JC.:Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation (1996). *Nat Genet* 13:105-108.

**Glover TW. and Stein CK.**: Induction of sister chromatid exchanges at common fragile sites (1987). *Am. J. Hum. Genet.* 41:882–890.

**Glasser L.**, Meloni-Ehrig A., Joseph P. , Mendiola J : Benign chronic neutropenia with abnormalities involving 16q22, affecting mother and daughter (**2006**). *American Journal of Hematology* 81(4): Pages262–270.

**Handt O.**, Sutherland GR.,Richards RI.: Fragile Sites and Minisatellite Repeat Instability (**2000**). *Mol Genet Metab* 70 (2): 99-105

**Harper ME. und Saunders GF.:** Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridization (**1981**). *Chromosoma* 83:431-439.

**Hauge XY. and Litt M.:** A study of the origin of 'shadow bands' seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR (**1993**). *Hum. Mol. Genet.* 2: 411-415.

**Hellman A.**, Rahat AS., Scherer W., Darvasi AL., Tsui C., and Kerem B.: Replication delay along FRA7H, a common fragile site on human chromosome 7, leads to chromosomal instability (**2000**). *Mol. Cell. Biol.* 20:4420-4427.

**Hellman A.**, Zlotorynski E., Scherer SW., Cheung J., Vincent JB., Smith DI., Trakhtenbrot L., and Kerem B.: A role for common fragile site induction in amplification of human oncogenes (**2002**). *Cancer Cell* 1:89-97.

**Helmrich A.**, Stout-Weider K., Hermann K., Schrock E. and Heiden T.: Common fragile sites are conserved features of human and mouse chromosomes and relate to large active genes (**2006**). *Genome Res.* 16:1222-1230.

**Hewett DR.**, Handt O., Hobson L., Mangelsdorf M., Eyre HJ., Baker E., Sutherland GR., Schuffenhauer S., Mao J. and Richards RI.: FRA10B structure reveals common elements in repeat expansion and chromosomal fragile site genesis (**1998**). *Molecular Cell* 1: 773-781.

**Hsu YY. and Wang YH.:** Human fragile site FRA16B DNA excludes nucleosomes in the presence of distamycin (**2002**). *J. Biol. Chem.* 277 (19): 17315-17319.

**Hocking T.**, Feichtinger W., Schmid M., Haan EA., Baker E., Sutherland GR.: Homozygotes for FRA16B are normal (**1999**). *Chrom Res* 7:553-556.

**Hormozian F.**, Schmitt JG., Sagulenko E., Schwab M., Savelyeva L.: FRA1E common fragile site breaks map within a 370kilobase pair region and disrupt the dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) (2007). *Cancer Letters* 246 (1 – 2): 82 – 91.

**Howlett NG.**, Taniguchi T., Durkin SG., D'Andrea AD., W. Glover T.: The Fanconi anemia pathway is required for the DNA replication stress response and for the regulation of common fragile site stability (2005). *Hum Mol Genet.* 14(5):693-701.

**Huang S.**, Qu Le, Cuddihy AR., Ragheb R., Taya y., Koromilas AE.: Protein kinase inhibitor 2-aminopurine overrides multiple genotoxic stress-induced cellular pathways to promote cell survival (2003). *Oncogene* 24:3721-33

**International Human Genome Project Sequencing Consortium:** Initial sequencing and analysis of the human genome (2001). *Nature* 409: 860-921

**Jackson JA.**, Trevino AV., Herzig MC., Herman TS. and Jan Woynarowski M.: Matrix attachment region (MAR) properties and abnormal expansion of AT island minisatellites in FRA16B fragile sites in leukemic CEM cells (2003). *Nucleic Acids Research* 31 (21): 6354-6364.

**Jeffreys A.J.** : Highly variable minisatellites and DNA fingerprints (1987). *Biochem. Soc. Trans.* 15(3): 309-317

**Jeffreys AJ.**, Royle NJ., Patel I., Armour JA., MacLeod A., Collick A., Gray IC., Neumann R., Gibbs M., Crosier M., et al: Principles and recent advances in human DNA fingerprinting (1991). *EXS.* 58:1-19.

**João F.**, Giovanni P, Carlos R., and Angus IL.: Spatial Organization of Large-Scale Chromatin Domains in the Nucleus: A Magnified View of Single Chromosome Territories (1997). *J. Cell Biol.* Volume 139, Number 7:1597-1610

**Johnson RD. und Jasin M.**: Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells (2000). *The EMBO journal* 19 (13): 3398–3407

**Jones C**, Müllenbach R., Grossfeld P., Auer R., Favier R., Chien K., James M., Tunnacliffe A., Cotter F.: Co-localisation of CCG repeats and chromosome deletion breakpoints in Jacobsen syndrome: evidence for a common mechanism of chromosome breakage (**2000**). *Hum Mol Genet.* 9(8):1201-8.

**Kampinga HH.**, Konings AW.: Inhibition of repair of X-ray-induced DNA damage by heat: the role of hyperthermic inhibition of DNA polymerase alpha activity (**1987**). *Radiation research* 112(1):86-98.

**Knight SJ.**, Flannery AV., Hirst MC., Campbell L., Christodoulou Z., Phelps SR.: Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation (**1993**). *Cell* 74 (1): 127-134.

**Kremer EJ.**, Pritchard M., Lynch M., Yu S., Holman K., Baker E.: Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)<sub>n</sub> (**1991**). *Science* 252 (5013): 1711-1714.

**Lalioti MD.**, Scott HS., Buresi C., Rossier C., Bottani A., Morris MA., Malafosse A., Antonarakis SE.: Dodecamer repeat expansion in cystatin B gene in progressive myoclonus epilepsy (**1997**). *Nature.* 386(6627):847-51.

**Le Beau MM.**, Rassool FV., Neilly ME., Espinosa III R., Glover TW., Smith DI., and McKeithan TW.: Replication of a common fragile site, FRA3B, occurs late in S phase and is delayed further upon induction: implications for the mechanism of fragile site induction (**1998**). *Hum. Mol. Genet.* 7:755-761.

**Limongi MZ.**, Pelliccia F., Rocchi A. : Characterization of the human common fragile site FRA2G (**2003**). *Genomics* 81 (2): 93-97.

**Ludes-Meyers JH.**, Bednarek AK., Popescu NC., Bedford M., Aldaz CM.: WWOX, the common chromosomal fragile site, FRA16D, cancer gene (**2003**). *Cytogenet Genome Res* 100: 101–110.

**McDonald DM.**, Spinner NB., King MC., Emanuell BS., Zackai EH.: Interstitial deletion 16q in two patients: confirmation of cytogenetics by analysis of haptoglobin levels (1987). *Am J Hum Genet* 41:A132.

**McKenzie F.**, Turner A., Withers S., Dalzell P., McGlynn M., Kirk EPE.: Dominant inheritance of cleft palate, microstomia and micrognathia - possible linkage to the fragile site at 16q22 (FRA16B) (2002). *Clin Dysmorphol* 11:237-241.

**Magenis RE.**, Hecht F., Lovrien EW.: Heritable fragile site on chromosome 16: probable localization of haptoglobin locus in man (1970). *Science* 170:85-87

**Martin J.**, Han C, Gordon LA, Terry A, Prabhakar S, She X, Xie G, Hellsten U, Chan YM, Altherr M, Couronne O, Aerts A, Bajorek E, Black S, Blumer H, Branscomb E, Brown NC, Bruno WJ, Buckingham JM, Callen DF, Campbell CS, Campbell ML, Campbell EW, Caoile C, Challacombe JF, Chasteen LA, Chertkov O, Chi HC, Christensen M, Clark LM, Cohn JD, Denys M, Detter JC, Dickson M, Dimitrijevic-Bussod M, Escobar J, Fawcett JJ, Flowers D, Fotopulos D, Glavina T, Gomez M, Gonzales E, Goodstein D, Goodwin LA, Grady DL, Grigoriev I, Groza M, Hammon N, Hawkins T, Haydu L, Hildebrand CE, Huang W, Israni S, Jett J, Jewett PB, Kadner K, Kimball H, Kobayashi A, Krawczyk MC, Leyba T, Longmire JL, Lopez F, Lou Y, Lowry S, Ludeman T, Manohar CF, Mark GA, McMurray KL, Meincke LJ, Morgan J, Moyzis RK, Mundt MO, Munk AC, Nandkeshwar RD, Pitluck S, Pollard M, Predki P, Parson-Quintana B, Ramirez L, Rash S, Retterer J, Ricke DO, Robinson DL, Rodriguez A, Salamov A, Saunders EH, Scott D, Shough T, Stallings RL, Stalvey M, Sutherland RD, Tapia R, Tesmer JG, Thayer N, Thompson LS, Tice H, Torney DC, Tran-Gyamfi M, Tsai M, Ulanovsky LE, Ustaszewska A, Vo N, White PS, Williams AL, Wills PL, Wu JR, Wu K, Yang J, Dejong P, Bruce D, Doggett NA, Deaven L, Schmutz J, Grimwood J, Richardson P, Rokhsar DS, Eichler EE, Gilna P, Lucas SM, Myers RM, Rubin EM, Pennacchio LA. The sequence and analysis of duplication-rich human chromosome 16 (2004). *Nature* 432 (7020): 988–94.

**Mimori K.**, Druck T., Inoue H., Alder H., Berk L., Mori M., Huebner K. and Croce CM.: Cancer-specific chromosome alterations in the constitutive fragile region *FRA3B* (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci.* (96):7456–7461.

**Mishmar D.**, Rahat A., Scherer SW., Nyakatura G., Hinzmann B., Kohwi Y., Mandel-Gutfroind Y., Lee JR., Drescher B., Sas DE., Margalit H., Platzer M., Weiss A., Tsui LC., Rosenthal A., and Kerem B.: Molecular characterization of a common fragile site (FRA7H) on human chromosome 7 by the cloning of an SV40 integration site (**1998**). Proc. Natl. Acad. Sci. 95:8141-8146.

**Morelli C.**, Karayianni E., Magnanini C., Mungall AJ., Thorland E., Negrini M., Smith DI. and Barbanti-Brodano G. : Cloning and characterization of the common fragile site *FRA6F* harboring a replicative senescence gene and frequently deleted in human tumors (**2002**). Oncogene 21: 7266–7276.

**Nancarrow JK.**, Kremer E., Holman K., Eyre H., Doggett N., Le Paslier D.: Implications of FRA16A structure for the mechanism of chromosomal fragile site genesis (**1994**). Science 264: 1938–1941.

**Nolin SL.**, Brown WT., Glicksman A., Houck GE Jr., Gargano AD., Sullivan A., Biancalana V., Brondum-Nielsen K., Hjalgrim H., Holinski-Feder E., Kooy F., Longshore J., Macpherson J., Mandel JL., Matthijs G., Rousseau F., Steinbach P., Vaisanen ML., von-Koskull H., Sherman SL.: Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles (**2003**). Am. J. Hum. Genet. 72(2): 454-464.

**Paige AJW.**, Taylor KJ., Stewart A., Sgouros JG., Gabra H., Sellar GC., Smyth JF., Porteous DJ. and Watson JEV.: A 700-kb physical map of a region of 16q23.2 homozygously deleted in multiple cancers and spanning the common fragile site FRA16D (**2000**). Cancer Res. 60: 1690–1697.

**Palakodeti A.**, Han Y., Jiang Y., Le Beau MM. : The role of late/slow replication of the FRA16D in common fragile site induction (**2004**). Genes Chromosomes Cancer. 39(1):71-6.

**Parrish JE.**, Oostra BA., Verkerk AJ., Richards CS., Reynolds J., Spikes AS.: Isolation of a GCC repeat showing expansion in FRAXF, a fragile site distal to FRAXA and FRAXE (**1994**). Nat Genet 8 (3): 229-235.

**Perucca-Lostanlen D.**, Hecht BK., Courseaux A., Grosgeorge J., Hecht F., Gaudray P.: Mapping FRA11A, a folate-sensitive fragile site in human chromosome band 11q13.3 (1997). *Cytogenet Cell Genet* 79:88-91

**Pineda De Castro LF., Zacharias. M.:** DAPI binding to the DNA minor groove: a continuum solvent analysis (2002). *Journal of Molecular Recognition* 15(4): 209–220.

**Pugliese A.**, Zeller M., Fernandez A Jr., Zalcborg LJ., Bartlett RJ, Ricordi C., Pietropaolo M., Eisenbarth GS., Bennett ST Patel DD.: The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlate with allelic variation at the *INS VNTR-IDDM2* susceptibility locus for type 1 diabetes (1997). *Nature Genetics* 15, 293 – 297.

**Reidy JA.:** Aphidicolin, DNA repair and fragile sites (1988). *Human Genet* 78:198-206.

**Ried K.**, Finnis M., Hobson L., Mangelsdorf M., Sayan S., Nancarrow JK., Woollatt E., Kremmidiotis G., Gardner A., Venter D. : Common chromosomal fragile site *FRA16D* sequence: identification of the *FOR* gene spanning *FRA16D* and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells (2000). *Hum. Mol. Genet.* (9): 1651–1663.

**Rigby PW.**, Dieckmann M., Rhodes C., Berg P.: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase (1977). *J Mol Biol.* Jun 15,113(1):237-51.

**Ritchie RJ.**, Knight SJL., Hirst MC., Grewal PK., Bobrow M., Cross GS.: The Cloning of FRAXF: Trinucleotid Repeat Expansion and Methylation at a Third Fragile Site in Distal Xqter (1994). *Hum Mol Genet* 3 (12): 2115-2121.

**Rooney DE.:** *Human Cytogenetics* (2001). Oxford Press.

**Royer-Pokora B.**, Ragg S., Heckl-Ostreicher B., Held M, Loos U., Call K., Glaser T., Housman D., Saunders G., Zabel B., et al.: Direct pulsed field gel electrophoresis of

Wilms' tumors shows that DNA deletions in 11p13 are rare (1991). *Genes Chromosomes Cancer* 2:89-100.

**Rozier L.**, El-Achkar E., Apiou F. and Debatisse M.: Characterization of a conserved aphidicolin-sensitive common fragile site at human 4q22 and mouse 6C1: possible association with an inherited disease and cancer (2004). *Oncogene* 23: 6872–6880.

**Sadoni N.**, Langer S., Fauth C., Bernardi G., Cremer T., Turner BM., and Zink D.: Nuclear organization of mammalian genomes: polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments (1999). *J. Cell Biol.* 146:1211-1226.

**Sanfilippo S.**, Neri G., Tedeschi B., Carlo-Stella N., Triolo O., Serra A.: Chromosomal fragile sites: preliminary data of a population survey (1983). *Clin Genet* 24:295.

**Santovito A.**, Cervella P., Selvaggi A., Caviglia GP., Burgarello C., Sella G., Salvarani B., Delpero M. : DAT1 VNTR Polymorphisms in a European and an African Population: Identification of a New Allele (2008). *Human Biology* 80 (2): 191-198.

**Sarafidou T.**, Kahl C., Martinez-Garay I., Mangelsdorf M., Gesk S., Baker E.: Folate-sensitive fragile site FRA10A is due to an expansion of a CGG repeat in a novel gene, FRA10 AC1, encoding a nuclear protein (2004). *Genomics* 84 (1): 69-81.

**Savas S.**, Frischhertz B., Batzer MA., Deininger PL., Keats BJB. : Structure, diversity, and evolution of the 45-bp VNTR in intron 5 of the *USH1C* gene (2003). *Genomics* 83 (3): 439-444.

**Savelyeva L.**, Sagulenko E., Schmitt JG. and Schwab M.: The neurobeachin gene spans the common fragile site FRA13A (2006). *Hum. Genet.* : 118,551 -558.

**Shabtai F.**, Bichacho S., Halbrecht I.: The fragile site on chromosome 16(q21–q22). Data on four new families (1980). *Hum Genet* 55:19–22.

**Shabtai F.**, Klar D., Bichacho S., Hart J., Halbrecht I.: Familial fragility on chromosome 16 (Fra 16q22) enhanced by both interferon and distamycin A (**1983**). Hum Genet 63:341–344.

**Shaffer LG. and Tommerup N.:** ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (**2005**). Karger Verlag.

**Shizuya H.**, Birren B., Kim UJ., Mancino V., Slepak T., Tachiiri Y., Simon M.: Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector (**1992**). Proc Natl Acad Sci. 15;89(18):8794-7.

**Schmid M.**, Feichtinger W., Haaf T.: The fragile site (16)(q22). II. Sister chromatid exchanges (**1987**). Hum Genet 76:365-368.

**Schmid M.**, Klett C., Niederhofer A.: Demonstration of a heritable fragile site in human chromosome 16 with distamycin A (**1980**). Cytogenet Cell Genet 28:87–94.

**Schmid M.**, Feichtinger W., Jeßberger A., Kohler J. and Lange R.: The fragile site 16(q22). I. Induction by AT-specific DNA-ligands and population frequency (**1986**). Human Genet 74: 67–73.

**Schwartz DC., Cantor CR.:** Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis (**1984**). Cell 37: 67-75.

**Schwartz M.**, Zlotorynski E., Kerem B.: The molecular basis of common and rare fragile sites (**2006**). Cancer Lett. 232(1):13-26.

**Sorensen K.**, Nielsen J., Holm V., and Haahr J.: Fragile Site Long Arm Chromosome 16 (**1979**). Human Genetics 48:131-143.

**Strachan T., Red AP.:** Molekulare Humangenetik (**2004**). Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag.

**Sutherland GR.:** Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium (1977). *Science* 197 (4300): 265-266.

**Sutherland GR.:** Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture (1979). *Am J Hum Genet.* 2:125–135.

**Sutherland GR.:** Heritable fragile sites on human chromosomes II. Distribution, phenotypic effects, and zytogenetisch (1979). *Am J Hum Genet.* 2:136–148.

**Sutherland GR.:** Baker E. and Seshadri R.S., Heritable fragile sites on human chromosomes. V. A new class of fragile site requiring BrdU for expression (1980). *Am. J. Hum. Genet* 32:542–548.

**Sutherland GR.:** Heritable fragile sites on human chromosomes. IX. Population cytogenetics and segregation analysis of BrdU requiring fragile site at 10q25 (1982). *Am. J. Hum. Genet* 34:753–756.

**Sutherland GR.,** Jacky PB. and Baker EG.: Heritable fragile sites on human chromosomes. XI. Factors affecting expression of fragile sites at 10q25, 16q22 and 17p12 (1984). *Am. J. Hum. Genet* 36:110–112.

**Sutherland GR.:** Heritable fragile sites on human chromosomes. XII. Population cytogenetics (1985). *Ann hum Genet* 49:153-161

**Sutherland GR. and Hecht F.:** *Fragile Sites on Human Chromosomes* (1985). Oxford Press.

**Sutherland GR. and Elizabeth Baker :** Characterisation of a new rare fragile site easily confused with the fragile X (1992). *H. M. Genet.* (2):111-113.

**Sutherland GR. and Richards R. I.:** The molecular basis of fragile sites in human chromosomes (1995). *Genetics and Development*, 5:323-327.

**Sutherland GR.:** Rare fragile site (2003). *Cytogenet Genome Res.* 100:44-84.

**Thestrup-Pedersen K.**, Esmann V., Jensen JR., Hastrup J., Thorling K., Saemundsen AK., Bisballe S., Pallesen G., Madsen M., Masucci MG., Ernberg I.: Epstein-Barr-virus induced lymphoproliferative disorder converting to fatal Burkitt-like lymphoma in a boy with interferon inducible chromosomal defect (**1980**). *Lancet* 2(8202):997–1002.

**Vafiadis P.**, Bennett ST., Todd JA., Nadeau J., Grabs R., Goodyer CG, Wickramasinghe S., Colle E., Polychronakos C.: Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus (**1997**). *Nature Genetics* 15, 289 - 292 (1997).

**Verkerk AJ.**, Pieretti M., Sutcliffe JS., Fu YH., Kuhl DP., Pizzuti A. : Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome (**1991**). *Cell* 65 (5): 905-914.

**Voet D., Voet JG.:** Biochemie (**2002**) . VCH Verlag.

**Voullaire LE.**, Webb GC., Levers MA.: Chromosome deletion at 11q23 in an abnormal child from a family with inherited fragility at 11q23 (**1987**). *Hum. Genet.* 76: 202-204.

**Wang L.**, Darling J., Zhang JS., Huang H., Liu W., and Smith DI.: Allele-specific late replication and fragility of the most active common fragile site, FRA3B. *Hum. Mol (1999)*. *Genet.* 8:431-437.

**Wahls WP.**, Wallace LJ., Moore PD.: Hypervariable minisatellite DNA is a hotspot for homologous recombination in human cells (**1990**). *Cell.* 60(1):95-103.

**Yamauchi M.**, Satsuki T., Kazuei M., Toshiyuki S. and Mitsuoki M.: A novel minisatellite repeat expansion identified at *FRA16B* in a Japanese carrier (**2000**). *Genes & Genetic Systems* 75 (3):(20.149-15400).

**Yong PJ.**, Marison SA., Barrett IJ., Kalousek DK., and Robinson WP.: Evidence for imprinting on chromosome 16: the effect of uniparental disomy on the outcome of mosaic trisomy 16 pregnancies (**2002**). *Am. J.med. gent.* 112: 123-132.

**Yu S.**, Pritchard M., Kremer E., Lynch M., Nancarrow J., Baker E.: Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA (**1991**). Science 252 (5010):1179-1181.

**Yu S.**, Mangelsdorf M., Hewett D., Hobson L., Baker E., Eyre HJ., Lapsys N., Paslier DLe., Doggett NA., Sutherland GR., and Richards RI.: Human chromosomal fragile site FRA16B is an amplified AT-rich minisatellite repeat (**1997**). Cell 88:367-374.

**Zlotorynski E.**, Rahat A., Skaug J., Ben-Porat N., Ozeri E., Hershberg R., Levi A., Scherer SW., Margalit H., and Kerem B.: Molecular Basis for Expression of Common and Rare Fragile Sites (**2003**). Molecular and Cellular Biology 23 (20):7143-7151.

### **Internet-Referezen**

<http://www.rna.lundberg.gu.se/cutter2>

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/index.html](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/index.html)

<http://www.ensembl.org/index.html>

[http://www.genecards.org/cgi-bin/cardlist.pl?set=full&letter=F&suffix=txt,](http://www.genecards.org/cgi-bin/cardlist.pl?set=full&letter=F&suffix=txt)

<http://www.genome.cse.ucsc.edu>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/getmap.cgi>

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9606&qrng=1&query=fragile%20site](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606&qrng=1&query=fragile%20site)

<https://www.pharmgkb.org>

<http://www.stanford.edu/group/hopes/causes/mutation/q5.html>

| Common Fragile Sites (CFSs) | Zytogenetische Lokalisation | ~Länge der fragilen Region | Molekulargenetisch oder molekularzytogenetisch charakterisiert | Induzierbarkeit mit Chemikalien | Referenz         |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|--|---------------------------------|------------------|
| 1. FRA1A                    | 1p36                        | 27.8Mb                     | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 2. FRA1B                    | 1p32                        | 9.6Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 3. FRA1C                    | 1p31.2                      | 800kb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 4. FRA1D                    | 1p22                        | 9.8Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 5. FRA1E                    | 1p21.3                      | 370kb                      | +  | Aphidicolin                     | Hormozian 2006   |
| 6. FRA1F                    | 1q21                        | 10.9Mb                     | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 7. FRA1G                    | 1q25.1                      | 3.1Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 8. FRA1H                    | 1q41-1q42.1                 | 10Mb                       | +  | 5-Azacytidine                   | Curatolo 2007    |
| 9. FRA1I                    | 1q44                        | 5.5Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 10. FRA1J                   | 1q12                        | 14.4Mb                     | -  | 5-Azacytidine                   | NCBI             |
| 11. FRA1K                   | 1q31                        | 13.5Mb                     | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 12. FRA1L                   | 1p31                        | 23.8Mb                     | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 13. FRA2C                   | 2p24.2                      | 2.5Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 14. FRA2D                   | 2p16.2                      | 2.1Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 15. FRA2E                   | 2p13                        | 4.9Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 16. FRA2F                   | 2q21.3                      | 1.8Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 17. FRA2G                   | 2q31                        | 450kb-1Mb                  | +  | Aphidicolin                     | Limongi 2003     |
| 18. FRA2H                   | 2q32.1                      | 6.4Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 19. FRA2I                   | 2q33                        | 12Mb                       | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 20. FRA2J                   | 2q37.3                      | 5.9Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 21. FRA3A                   | 3p24.2                      | 2.6Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 22. FRA3B                   | 3p14.2                      | 5.2Mb                      | +  | Aphidicolin                     | Becker 2002      |
| 23. FRA3C                   | 3q27                        | 5.2Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 24. FRA3D                   | 3q25                        | 10.8Mb                     | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 25. FRA4A                   | 4p16.1                      | 5.7Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 26. FRA4B                   | 4q12                        | 6.8Mb                      | -  | BrdU                            | NCBI             |
| 27. FRA4C                   | 4q31.1                      | 2.2Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 28. FRA4D                   | 4p15                        | 24.6Mb                     | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 29. FRA4E                   | 4q27                        | 3.4Mb                      | -  | Unklassifiziert                 | pharmGKB         |
| 30. FRA4F                   | 4q22                        | 7Mb                        | +  | Aphidicolin                     | Rozier 2004      |
| 31. FRA5A                   | 5p13                        | 13.1Mb                     | -  | BrdU                            | NCBI             |
| 32. FRA5B                   | 5q15                        | 5.4Mb                      | -  | BrdU                            | NCBI             |
| 33. FRA5C                   | 5q31.1                      | 5Mb                        | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 34. FRA5D                   | 5q15                        | 5.4Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 35. FRA5E                   | 5p14                        | 10.8Mb                     | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 36. FRA5F                   | 5q21                        | 12.3Mb                     | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 37. FRA6B                   | 6p25.1                      | 2.9Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 38. FRA6C                   | 6p22.2                      | 2.6Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 39. FRA6D                   | 6q13                        | 5.9Mb                      | -  | BrdU                            | NCBI             |
| 40. FRA6E                   | 6q26                        | 3.5Mb                      | +  | Aphidicolin                     | Dension 2003     |
| 41. FRA6F                   | 6q21                        | 990kb                      | +  | Aphidicolin                     | Morelli 2002     |
| 42. FRA6H                   | 6p22.1                      | 9.3Mb                      | +  | Aphidicolin                     | Fechter 2007     |
| 43. FRA6G                   | 6q15                        | 4.6Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 44. FRA7B                   | 7p22                        | 7.2Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 45. FRA7C                   | 7p14.2                      | 1.9Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 46. FRA7D                   | 7p13                        | 3.3Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 47. FRA7E                   | 7q21.11                     | 4.5Mb                      | +  | Aphidicolin                     | Zlotorynski 2003 |
| 48. FRA7F                   | 7q22                        | 9.3Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 49. FRA7G                   | 7q31.2                      | 4.3Mb                      | +  | Aphidicolin                     | Hellman 2002     |
| 50. FRA7H                   | 7q32.3                      | 161kb                      | +  | Aphidicolin                     | Mishmar 1998     |
| 51. FRA7I                   | 7q35                        | 1.5Mb                      | +  | Aphidicolin                     | Ciullo 2002      |
| 52. FRA7J                   | 7q11                        | 16.3Mb                     | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |
| 53. FRA7K                   | 7q31.1                      | 900kb                      | +  | Aphidicolin                     | Helmrich 2006    |
| 54. FRA8B                   | 8q22.1                      | 5.6Mb                      | -  | Aphidicolin                     | NCBI             |

|                    |             |          |   |                      |                |
|--------------------|-------------|----------|---|----------------------|----------------|
| <b>55. FRA8C</b>   | 8q24.1      | 1.5Mb    | + | Aphidicolin          | Ferber 2003    |
| 56. FRA8D          | 8q24.3      | 6.3Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 57. FRA9C          | 9p21        | 12.9Mb   | - | <b>BrdU</b>          | NCBI           |
| 58. FRA9D          | 9q22.1      | 1.4Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| <b>59. FRA9E</b>   | 9q32-9q33.1 | 9Mb      | + | Aphidicolin          | Callahan 2003  |
| 60. FRA9F          | 9q12        | 9.7Mb    | - | <b>5-Azacytidine</b> | NCBI           |
| 61. FRA10C         | 10q21       | 18Mb     | - | <b>BrdU</b>          | NCBI           |
| 62. FRA10D         | 10q22.1     | 3.3Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 63. FRA10E         | 10q25.2     | 3.1Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 64. FRA10F         | 10q26.1     | 8.3Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 65. FRA10G         | 10q11.2     | 11.2Mb   | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 66. FRA11C         | 11p15.1     | 5.5Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 67. FRA11D         | 11p14.2     | 1.2Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 68. FRA11E         | 11p13       | 5.4Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 69. FRA11F         | 11q14.2     | 2.6Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| <b>70. FRA11G</b>  | 11q23.3     | 4.5Mb    | + | Aphidicolin          | Fechter 2006   |
| 71. FRA11H         | 11q13       | 13.6Mb   | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 72. FRA12B         | 12q21.3     | 12.7Mb   | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 73. FRA12E         | 12q24       | 25Mb     | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| <b>74. FRA12F</b>  | 12q14.1     | 162kb    | + | Aphidicolin          | Fischer 2008   |
| <b>75. FRA13A</b>  | 13q13.2     | 650kb    | - | Aphidicolin          | Savelyeva 2006 |
| 76. FRA13B         | 13q21       | 19.9Mb   | - | <b>BrdU</b>          | NCBI           |
| 77. FRA13C         | 13q21.2     | 2.9Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 78. FRA13D         | 13q32       | 6.7Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| <b>79. FRA13E</b>  | 13q22.2     | 3.1Mb    | + | Aphidicolin          | Fechter 2007   |
| 81. FRA14B         | 14q23       | 11.2Mb   | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 82. FRA14C         | 14q24.1     | 2.3Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 82. FRA15A         | 15q22       | 9.1Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 83. FRA16C         | 16q21       | 13.1Mb   | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| <b>84. FRA16D</b>  | 16q23.1     | 360kb    | + | Aphidicolin          | Ried 2000      |
| 85. FRA17B         | 17q23.1     | 700kb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 86. FRA18A         | 18q12.2     | 4.5Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 87. FRA18B         | 18q21.3     | 7.8Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| <b>88. FRA18C*</b> | 18q22.2     | 2Mb      | + | Aphidicolin          | Debacker 2008  |
| 89. FRA19A         | 19q13       | 26.7Mb   | - | <b>5-Azacytidine</b> | NCBI           |
| 90. FRA20B         | 20p12.2     | 2.9Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 91. FRA22B         | 22q12.2     | 2.6Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| <b>92. FRAXB</b>   | Xp22.31     | 500kb    | + | Aphidicolin          | Arlt 2002      |
| 93. FRAXC          | Xq22.1      | 4.3Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| 94. FRAXD          | Xq27.2      | 1.8Mb    | - | Aphidicolin          | NCBI           |
| Total:             | -           | 654.89Mb |   |                      |                |

**Tab. 8.1: Bis jetzt bekannte Common Fragile Sites (CFSs) im menschlichen Genom**

NCBI: National Center for Biotechnology Information

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9606&qrng=1&query=fragile%20site](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606&qrng=1&query=fragile%20site)

pharmGKB: Pharmacogenomic Knowledge Base

<https://www.pharmgkb.org>

| Rare Fragile Sites (RFSs) | Zytogenetische Lokalisation | ~Länge der fragilen Region/ bzw. exp. Sequenz | Molekulargenetisch charakterisiert | Induzierbarkeit mit Chemikalien | Referenz  |
|---------------------------|-----------------------------|---|------------------------------------|---------------------------------|---|
| 1. FRA1M                  | 1p21.3                      | 4.9Mb   | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 2. FRA2A                  | 2q11.2                      | 6.4Mb   | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 3. FRA2B                  | 2q13                        | 5.2Mb   | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 4. FRA2K                  | 2q22.3                      | 3.7Mb   | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 5. FRA2L                  | 2p11.2                      | 7.3Mb   | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 6. FRA5G                  | 5q35                        | 13.4Mb  | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 7. FRA6A                  | 6p23                        | 2Mb   | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 8. FRA7A                  | 7p11.2                      | 3.5Mb   | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 9. FRA8A                  | 8q22.3                      | 4.5Mb   | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 10. FRA8E                 | 8q24.1                      | 9.6Mb   | -                                  | <b>Distamycin A</b>             | NCBI  |
| 11. FRA8F                 | 8q13                        | 7.9Mb   | -                                  | Unklassifiziert                 | pharmGKB  |
| 12. FRA9A                 | 9p21                        | 12.9Mb  | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 13. FRA9B                 | 9q32                        | 2.8Mb   | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 14. FRA10A                | 10q23.3                     | 8.4Mb (CGG) <sub>n</sub>                      | +                                  | Folat-sensitiv                  | Sutherland 1979; Sarafidou 2004                     |
| 15. FRA10B                | 10q25.2                     | 3.1Mb<br>~42bp<br>AT-reiche<br>Minisatelliten | +                                  | <b>BrdU</b>                     | Sutherland 1980 und 1982; Hewett 1998               |
| 16. FRA11A                | 11q13.3                     | 1.5Mb (CGG) <sub>n</sub>                      | +                                  | Folat-sensitiv                  | Perucca-Lostanlen 1997                              |
| 17. FRA11B                | 11q23.3                     | 5.3Mb (CCG) <sub>n</sub>                      | +                                  | Folat-sensitiv                  | Voullaire 1987; Jones 1994                          |
| 18. FRA11I                | 11p15.1                     | 5.5Mb   | -                                  | <b>Distamycin A</b>             | NCBI  |
| 19. FRA12A                | 12q13.1                     | 8.5Mb   | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 20. FRA12C                | 12q24.2                     | 6.3Mb   | -                                  | <b>BrdU</b>                     | NCBI  |
| 21. FRA12D                | 12q24.13                    | 2Mb   | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 22. FRA16A                | 16p13.11                    | 2Mb (CCG) <sub>n</sub>                        | +                                  | Folat-sensitiv                  | Nancarrow 1994/1998                                 |
| 23. FRA16B                | 16q21                       | 8.5Mb<br>~33bp<br>AT-reiche<br>Minisatelliten | +                                  | <b>Distamycin A</b>             | Magenis 1970; Schmid 1980; Callen 1993; Yu 1997     |
| 24. FRA16E                | 16p12.1                     | 5.9Mb   | -                                  | <b>Distamycin A</b>             | NCBI  |
| 25. FRA17A                | 17p12                       | 4.7Mb   | -                                  | <b>Distamycin A</b>             | NCBI  |
| 26. FRA19B                | 19p13                       | 21.2Mb  | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 27. FRA20A                | 20p11.23                    | 3.4Mb   | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 28. FRA22A                | 22q13                       | 13.8Mb  | -                                  | Folat-sensitiv                  | NCBI  |
| 29. FRAXA                 | Xq27.3                      | 5Mb (CGG/CCG) <sub>n</sub>                    | +                                  | Folat-sensitiv                  | Sutherland 1977; Kremer 1991; Verkerk 1991; Yu 1991 |
| 30. FRAXE                 | Xq28                        | 8Mb (CGG/CCG) <sub>n</sub>                    | +                                  | Folat-sensitiv                  | Sutherland und Baker 1992; Knight 1993; Gez 1996    |
| 31. FRAXF                 | Xq28                        | 8Mb (CGG) <sub>n</sub>                        | +                                  | Folat-sensitiv                  | Parrish 1994; Ritchie 1994                          |
| <b>Total:</b>             | -                           | 205,2Mb                                       |                                    |                                 |   |

Tab. 8.2: Bis jetzt bekannte Rare Fragile Sites (RFSs) im menschlichen Genom

NCBI: National Center for Biotechnology Information

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9606&qrng=1&query=fragile%20site](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9606&qrng=1&query=fragile%20site)

pharmGKB: Pharmacogenomic Knowledge Base

<https://www.pharmgkb.org>

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Brigitte Royer-Pokora für die Bereitstellung des interessanten Themas, sowie die uneingeschränkte Unterstützung, Geduld und die wertvollen Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Rütter danke ich für seine ausgezeichnete Unterstützung während meiner gesamten Promotion und für die anspruchsvollen und fruchtbaren Diskussionen in den wöchentlichen Seminaren seiner Arbeitsgruppe.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Matthias Drechsler für die uneingeschränkte Unterstützung und hervorragende Betreuung im Verlauf dieser Arbeit bei praktischen und bei theoretischen Fragen und für ständige Diskussionsbereitschaft und kritische Anmerkungen.

Bei Herrn Dr. Hans-Jürgen Gebauer bedanke ich mich für seine Betreuung und seine wertvolle Hilfe bei zytogenetischen Fragen.

Herrn Dipl.-Ing. Manfred Beier danke ich für seine großartige Hilfe bei mathematischen Problemlösungen und der Entwicklung des neuen bioinformatischen Programms „*AT-Block-Finder*“.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Barbara Leube für ihre Interesse an meine Arbeit, wertvolle Ratschläge und kritische Anmerkungen im Laufe dieser Arbeit bedanken

Bei Herrn Prof. Dr. Michael Schmid aus der Universität Würzburg, Institut für Humangenetik, bedanke ich mich für die Zusendung der Blutproben von zwei Probanden.

Herrn Prof. Dr. Mariano Rocchi danke ich für die kostenlose Zusendung der BACs aus der Universität Bari in Italien.

Ich danke herzlich Herrn Prof. Dr. Jörg T. Eppelen für seine Zusage für die Immortalisierung der Blutproben in seinem Institut an der Universität Bochum.

Frau Prof. C. Marian, Herrn Prof. Wagner (ganz besonders☺), Herrn Prof. G. Groth, Herrn Prof. H. Hegemann bedanke ich mich für die Abnahme der Prüfung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiter/innen im Institut für Humangenetik und Anthropologie für angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfestellungen.

Abschließend möchte ich mich auch ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, für ihre liebevolle Unterstützung und Geduld.

## Erklärung

„Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Brigitte Royer-Pokora betreut worden.“

Javad Karim Zad Hagh

Düsseldorf 20.01.10

# Curriculum Vitae

## Persönliche Informationen

---

|  |  |  |
|--|--|--|
| <b>Name, Vorname</b><br>Karim Zad Hag, Javad | <b>Geburtsdatum</b>                          | <b>Geburtsort</b><br>Urmia/Iran  |
| <b>Adresse</b><br><br>Düsseldorf             | <b>Telefon</b>                               | <b>Email</b><br>javadkarimzad@yahoo.de<br><b>Homepage</b><br><a href="http://www.MedHumGen.com">http://www.MedHumGen.com</a> |
| <b>Familienstand</b><br>Verheiratet          | <b>Staatsangehörigkeit</b><br>Deutsch/Iraner |  |

## Schulbildung

---

|            |                            |
|------------|----------------------------|
| 19974-1979 | Grundschule in Urmia/Iran  |
| 1979-1982  | Mittelschule in Urmia/Iran |
| 1982-1986  | Oberschule in Urmia/Iran   |

## Hochschulbildung/Militärdienst

---

|           |   |
|-----------|---|
| 1986-1989 | Medizinische Laborwissenschaft (Tabriz Universität/Iran)  |
| 1989-1991 | Militärdienst   |
| 1992-1995 | Sprachkurs und Studienkolleg in Deutschland   |
| 1996-2003 | Biochemie-Studium mit Abschluss Diplom<br><i>Thema der Diplomarbeit:</i><br>Molekularzytogenetische Analyse einer ungeklärten intra-chromosomalen Duplikation im Bereich 3q24-3q26.31 |

## Promotion an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

---

|           |  |
|-----------|--|
| 2004-2010 | Promotion am Institut für Humangenetik und Anthropologie |
|-----------|--|

## Akademische Tätigkeiten

---

### A: Publikationen:

2008

**Omrani Mir Davood, Karimzad Hagh Javad\***; Klein Wolfrom; Gebauer Jurgen:  
Cytogenetic and molecular genetic analysis of dicentricY chromosome and its relation to male azoospermia. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2008 Vol: 6

Issue: 2: 57-64

**\*These authors have contributed equally to this work**

## **2004**

Meins Moritz, **Karimzad Hagh Javad**, Gerresheim Fritz, Einhoff Elisabeth, Olschewski Heidi, Strehl Henning, Epplen Jörg T: Novel case of dup(3q) syndrome due to a de novo interstitial duplication 3q24-q26.31 with minimal overlap to the dup(3q) critical region. *American Journal of Medical Genetics*.2004 Volume 132A Issue 1, Pages 84-89.

## **B: Akzeptierte mündlichen Vorträge:**

Seminar of NRW Human-Genetics 2006 (Essen)

Seminar of NRW Human-Genetics 2007 (Düsseldorf)

The First Biology Conference for Iranian Scholars in Europe 2008 (Hamburg)

## **C: Poster Präsentation:**

European Human Genetics Conference (ESHG) 2004 (München)

17th Congress German/Swiss/Austria Society of Human Genetics 2006 (Heidelberg)

18th Congress German/Swiss/Austria Society of Human Genetics 2007 (Bonn)

## **D: Betreuungen von zwei Projekten: (2005-2007)**

1: "Balanced Translocation t(2;11)(q33.2;q23.2) in a patient with clinical features"

2: "Frequency of FRA16B in the German Population"

## **Berufstätigkeiten**

---

### **1991-1992**

- Leiter der Abteilung für klinische Chemie bei: Gaaem-Klinik Urmia/Iran

### **Seit Mai 2008**

- Mitarbeiter der gemeinsamen Praxis für medizinischen Genetik bei:  
Dr. Behrend/ Dr. Bartz, Düsseldorf

### **Seit Mai 2008**

- Mitarbeiter von „Zentrum für Polkörper-Analytik“(Polaris, Düsseldorf)

**Seit Okt. 2008**

- Mitglied des Begründer-Teams von: „*IranHumGen.com*“ (IranHumanGenetics)
- Begründer von **JMHG Online** (Journal of Medical Human Genetics Online)