

4. Ergebnisse

4.1. Physikalische Kartierung eines STS-Markers aus dem KPNA2-Gen

4.1.1. Kartierung unter Verwendung somatischer Zellhybride

Aufgrund der vollständigen Konkordanz der 18 somatischen Zellhybride erfolgte die Zuordnung des verwendeten STS-Markers zum Chromosom 17 (Tab. 4.1., S. 52). Alle 15 Hybride, die das Chromosom 17 enthalten, erwiesen sich als positiv. Alle 3 Hybride, die das Chromosom 17 nicht enthalten, waren negativ (Abb. 4.1.). Für alle anderen Chromosomen ergab sich eine Diskordanz der Hybride.

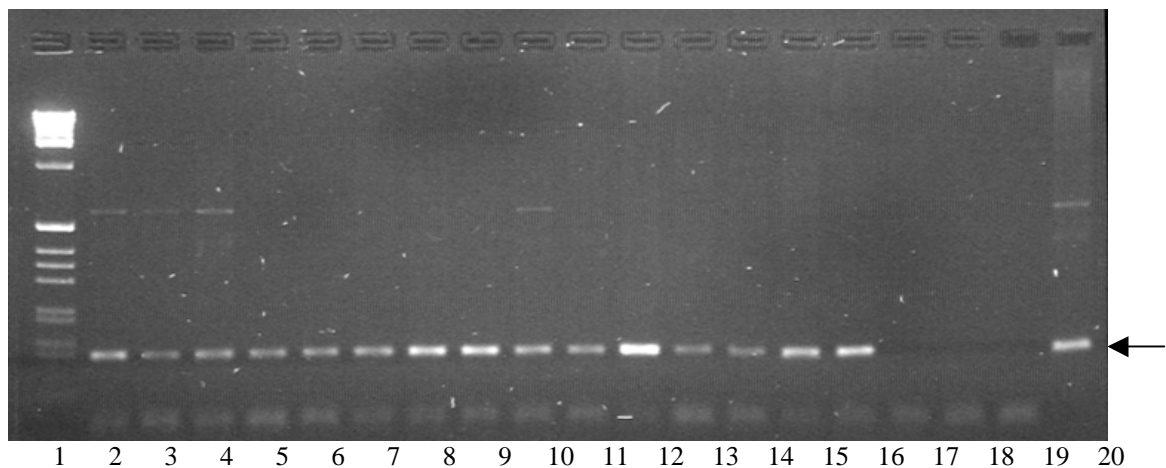


Abb. 4.1: Kartierung eines STS-Markers aus dem 3'-Ende des KPNA2-Gens unter Verwendung einer Reihe von 18 somatischen Zellhybriden; Nachweis der PCR-Amplifikate nach Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung; Bahn 1: 1 Kb DNA Leiter (Gibco BRL), Bahn 2 - 19: somatische Zellhybride (vgl. Kap. 3.1.1., S. 27), Bahn 20: Positivkontrolle (genomische DNA)

Außerdem wurden die Zellhybride mit einer intronüberspannenden Primerkombination (6-25 und 189-169) untersucht, die sowohl ein Produkt in der Größenordnung der cDNA-Sequenz (ca. 180 bp) zeigte als auch ein intronüberspannendes Produkt (ca. 1400 bp). Das Hybridmuster der 180 bp großen Bande ergab eine vollständige Konkordanz mit dem Muster für das Chromosom 4. Das Ergebnis für die 1400 bp große Bande stimmt mit dem des 3'-STS-Markers überein und unterstützt somit die Aussage, daß sich das KPNA2-Gen auf dem Chromosom 17 befindet.

Tab. 4.1: Kartierung des Karyopherin-Alpha 2-Gens auf dem Chromosom 17 mit Hilfe einer Reihe von 18 somatischen Zellhybriden; +/+ bedeutet übereinstimmend positiv, -/- übereinstimmend negativ, +/- zusätzlich positiv, -/+ fehlende positive; Prinzip: ist / soll

Chromosom	Anzahl der Hybride					
	konkordant		diskonkordant		diskonkordant	diskonkordant
	+/+	-/-	+/-	-/+	(gesamt)	(in Prozent)
17	15	3	0	0	0	0
8	13	3	0	2	2	11
14	13	3	0	2	2	11
6	12	3	0	3	3	17
7	12	3	0	3	3	17
15	12	3	0	3	3	17
4	11	3	0	4	4	22
12	11	3	0	4	4	22
20	11	3	0	4	4	22
3	10	3	0	5	5	28
5	10	3	0	5	5	28
10	9	3	0	6	6	33
19	9	3	0	6	6	33
21	9	3	0	6	6	33
22	9	3	0	6	6	33
13	8	3	0	7	7	39
18	8	3	0	7	7	39
11	7	3	0	8	8	44
2	6	3	0	9	9	50
Y	5	3	0	10	10	56
1	4	3	0	11	11	61
X	3	2	1	12	13	72
16	2	2	1	13	14	78
9	0	2	1	15	16	89

4.1.2. Kartierung mit Hilfe von YACs

Die Untersuchung der *CEPH Human mega-YAC-Library* ergab 5 positive Klone für den verwendeten STS-Marker (Tab. 4.2.). Bei einer nachfolgenden Internetrecherche stellte sich heraus, daß die Klone in dem YAC-Contig *WC 17.9* des *Center for Genome Research* des *Whitehead Institute for Biomedical Research* enthalten sind (Internetadresse: <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/lookup-contig?contig=wc17.9&database=release&type=singly-linked>).

Tab. 4.2: Untersuchung der *CEPH Human mega-YAC-Library* mit Hilfe der PCR auf das Vorhandensein des STS-Markers mit der Primerkombination: 1718-1738 und 1855-1834

positive Hauptgruppen	Koordinaten der positiven Klonengruppen			komplette Klonadresse
	Platte	Reihe	Spalte	
30	845	3=C	6	845_C_6
33	871	3=C	4	871_C_4
37	902	3=C	10	902_C_10
40	931	2=B	10	931_B_10
43	955	8=H	4	955_H_4

Weitere PCR-Untersuchungen mit in dem Contig enthaltenen STS- und Mikrosatellitenmarkern (vgl. Tab. 3.4., S. 43 und Tab. 3.6., S. 45) ließ die Einordnung des Gens zwischen dem STS-Marker D17S2020 und den Mikrosatellitenmarkern D17S1813 und D17S1870 zu (vgl. Abb. 4.2., S. 54).

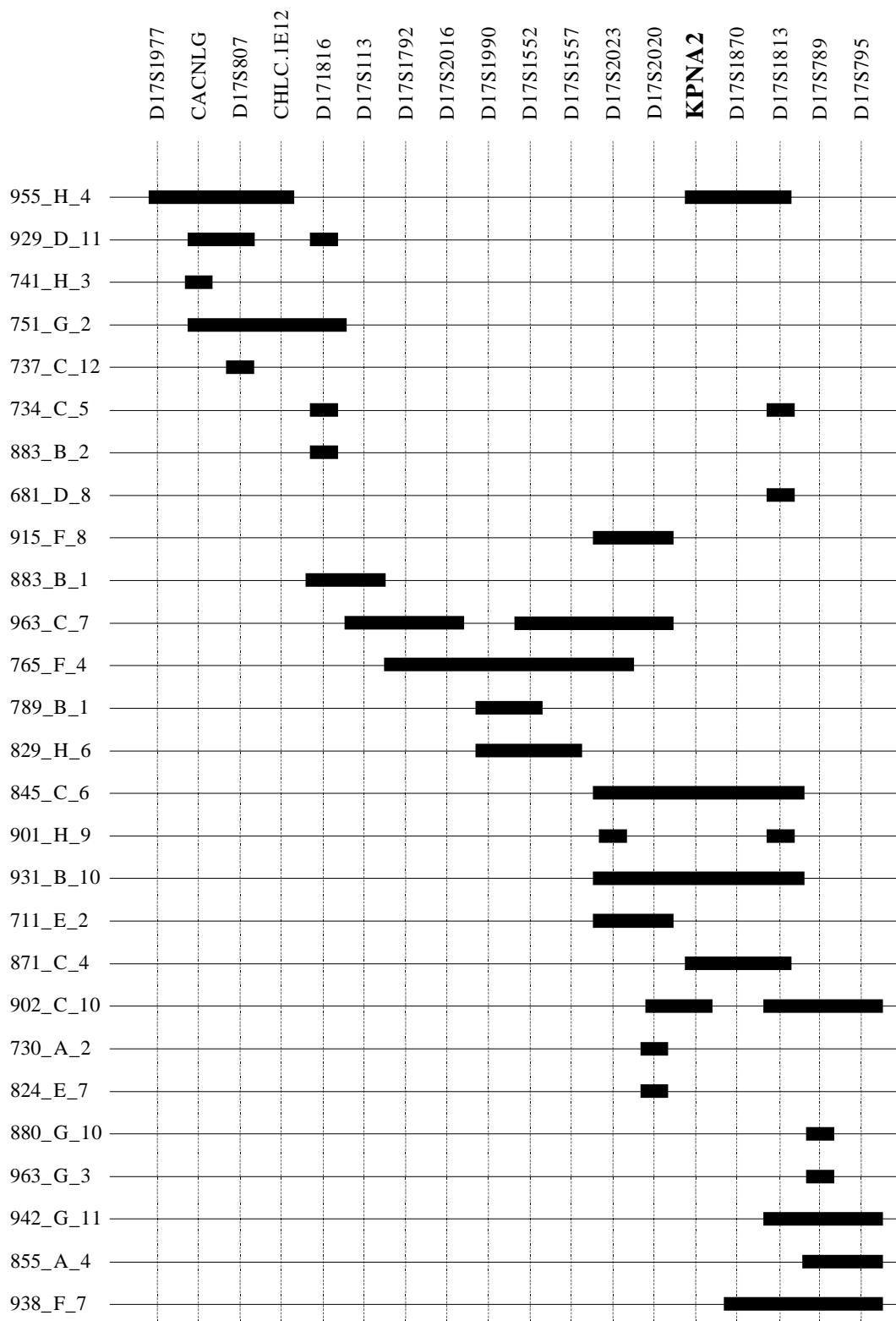


Abb. 4.2.: PCR-Untersuchung von Klonen aus dem YAC-Contig WC 17.9 des *Center for Genome Research* des *Whitehead Institute for Biomedical Research* [YAC-Adressen (Plattenummer_Reihe_Spalte) auf Y-Achse links] mit Markern aus der Region 17q23 (Locusbezeichnung auf X-Achse oben). Die schwarzen Balken kennzeichnen die Lage der einzelnen YACs und die senkrechten, unterbrochenen Linien markieren die Positionen der Marker.

4.1.3. Zellhybride mit chromosomalen Fragmenten aus der Region 17q

Die Untersuchung der 5 somatischen Zellhybride (vgl. Kap. 3.1.2., S. 28) mit Hilfe der PCR auf das Vorhandensein der in Abbildung 4.3. enthaltenen Marker ergab eine Lokalisation des KPNA2-Gens zwischen dem STS-Marker D17S2020 und dem Mikrosatellitenmarker D17S795.

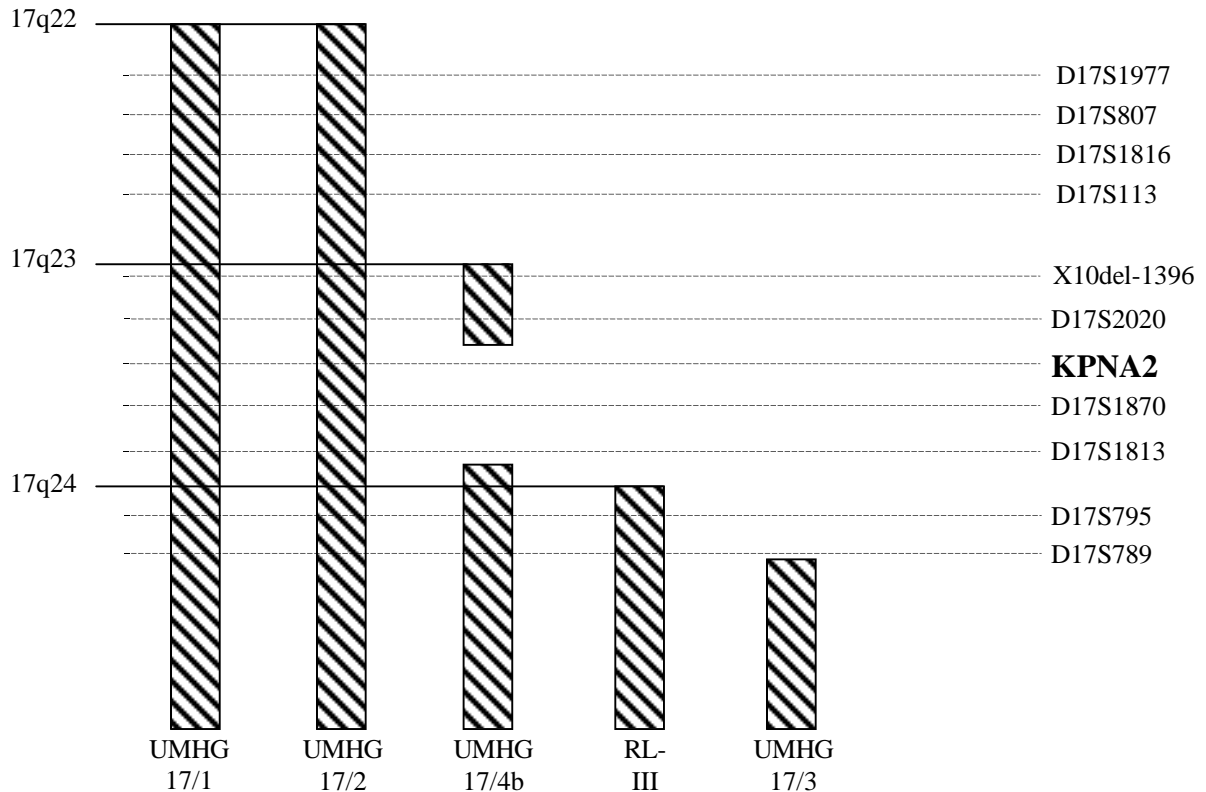


Abb. 4.3: Physikalische Kartierung eines STS-Markers aus der 3'-Region des KPNA2-Gens und einiger benachbarter STS-Marker mit Hilfe von 5 somatischen Zellhybriden mit Fragmenten aus der distalen Region des langen Armes von Chromosom 17 - Die senkrechten, schräg schraffierten Balken stellen die Hybridfragmente dar und die waagerechten gestrichelten Linien beschreiben die Positionen der untersuchten Marker.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem Kapitel 4.1.2. auf der Seite 53 ergab sich im Hybrid UMHG 17/4b ein Loch zwischen D17S2020 und D17S795. In diesem, durch diese beiden Marker definierten, Loch befinden sich sowohl das KPNA2-Gen als auch die Mikrosatellitenmarker D17S1813 und D17S1870.

4.2. Konstruktion eines PAC-/BAC-Contigs

4.2.1. Screening einer PAC-/BAC-Bibliothek mit Markern aus der Region 17q23

Die Ergebnisse der Untersuchung der PAC-Bibliothek mit bereits bekannten Markern der Region 17q23 sind in der Tabelle 4.3. zusammengefaßt.

Tab. 4.3: Untersuchung der *RPCI 1 Human PAC*-Bibliothek (vgl. Kap. 3.3.1., S. 31) mit bekannten Mikrosatellitenmarkern und STS-Markern aus der Region 17q23 - Aufgelistet sind die Namen der Marker, die positiven Hauptgruppen (die fettgedruckten Hauptgruppen wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet), die positiven Klongruppen und die Klonadressen.

Marker	Hauptgruppen	Klongruppen			Adresse
		Zeile	Spalte	Platte	
D17S1990	23	12	21	187	L21_187
D17S1552	2, 31	1	13	245	A13_245
D17S1557	4 , 10,18	6	12	30	F12_30
D17S2020	1, 2, 4, 7, 9, 19	7	10	150	G10_150
D17S2016	11	4	4	83	D4_83
D17S2023	9, 11 , 17, 30	4	4	83	D4_83
D17S1870	24 , 26, 37	4	1	188	D1_188
D17S1813	4 , 14	11	16	28	K16_28

Nach der Sequenzanalyse der PAC-Enden und der Konstruktion eigener STS-Marker wurden diese wiederum für ein erneutes Screening verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 4.4. auf der Seite 57 zusammengefaßt.

Diejenigen Marker, die bei der Untersuchung der PAC-Bibliothek zu keinem positiven Ergebnis führten, ergaben bei der Verwendung der *CEPH Human BAC*-Bibliothek die in Tabelle 4.5. auf der Seite 57 aufgelisteten Klone.

4.2.2. Untersuchung der PAC-/BAC-Klone mittels PCR

Die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen sind in der Abbildung 4.4. auf der Seite 58 graphisch dargestellt.

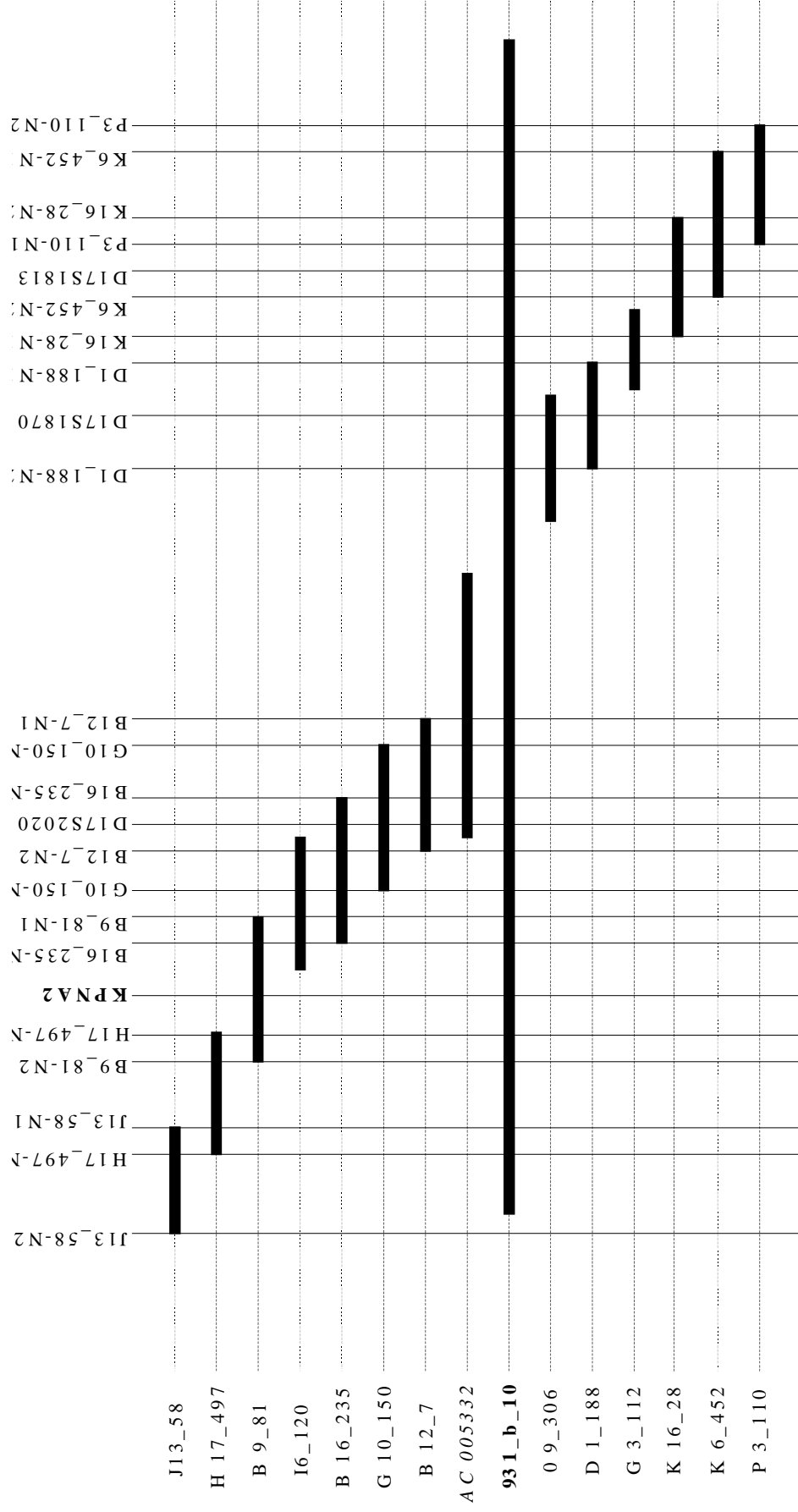


Abb. 4.4.: Graphische Darstellung des PAC-/BAC-Contigs; auf der Y-Achse (links) befinden sich die PAC-/BAC-Adressen (vgl. Tab.4.3.-4.5. auf den Seiten 54 und 55), bei der fettgedruckten Adresse (931_b_10) handelt es sich um einen YAC-Klon, die kursiv dargestellte Adresse repräsentiert einen vollständig sequenzierten Klon, der im Internet abrufbar ist; die für die Konstruktion des Contigs verwendeten Marker (vgl. Tab. 3.4.-3.7. auf den Seiten 40-43) sind auf der X-Achse (oben) dargestellt

Tab. 4.4: Untersuchung der *RPCI 1 Human PAC*-Bibliothek (vgl. Kap. 3.3.1., S. 31) mit selbst konstruierten STS-Markern aus der Region 17q23 - Aufgelistet sind die Namen der Marker, die positiven Hauptgruppen (die fettgedruckten Hauptgruppen wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet), die positiven Klongruppen und die Klonadressen.

Marker	Hauptgruppen	Klongruppen			Adresse
		Zeile	Spalte	Platte	
1718-1855	2, 11 , 23	2	9	81	B9_81
	31	1	13	245	A13_245
K16_28-N1	4, 14	7	19	112	G3_112
G10_150-N1	2 , 19, 31	8, 14	6, 15	12, 15	H6_12, N15_15
G10_150-N2	1 , 2, 19	2	12	7	B12_7
H17_497-N1	5, 8 , 15	10	13	58	J13_58
D4_83-N2	38, 39	9	18	313	I18_313
D1_188-N1	14 , 24, 26	7	19	112	G3_112
D1_188-N2	24, 26, 38	15	9	306	O9_306

Tab. 4.5: Untersuchung der *CEPH Human BAC*-Bibliothek (vgl. Kap. 3.4.1., S. 36) mit selbst konstruierten STS-Markern (vgl. Tab. 3.7., S. 46) aus der Region 17q23 - Aufgelistet sind die Namen der Marker, die positiven Hauptgruppen (die fettgedruckten Hauptgruppen wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet), die positiven Klongruppen und die Klonadressen.

Marker	Hauptgruppen	Klongruppen			Adresse
		Zeile	Spalte	Platte	
B9_81-N1	15	9	6	120	I6_120
	30 , 49	2	16	235	B16_235
B9_81-N2	63 , 66	8	17	497	H17_497
K16_28-N2	7, 10, 14 , 58,	16	3	110	P3_110
	57 , 61, 63, 64, 68	11	6	452	K6_452

4.3. Untersuchung von Heterozygotieverlusten in der Region 17q23 und allgemeiner Mikrosatellitenstatus

4.3.1. Mikrodisezierte Kolonkarzinome

Um die Aussagekraft der Untersuchung zu optimieren und somit die Reproduzierbarkeit der Resultate zu erhöhen wurden folgende Differenzierungskriterien zugrunde gelegt, die auf eigenen Überlegungen und einen großen Erfahrungswert basieren. Bei einer Reduktion der Allelfläche (peak area) größer/gleich 50 % der untersuchten Tumor-DNA im Vergleich zum Normalgewebe besitzt der Tumor an dieser, durch den Marker definierten Stelle, einen sicheren Heterozygotieverlust (LOH). Bei einer Reduktion zwischen 30 % und 50 % lautet das Ergebnis fraglicher LOH und unter 30 % wird von einer unveränderten heterozygoten Situation (Retention) ausgegangen. Beim Auftreten mindestens eines zusätzlichen Allels beim Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe wird die Probe für den entsprechenden Marker als mikrosatelliteninstabil (MIN+) bezeichnet. Beispiele für die einzelnen Kategorien (außer fraglicher LOH) sind in den Abbildungen 4.5.-4.9. auf der Seite 61 dargestellt. Die Ergebnisse der LOH-Untersuchungen sind in den Abbildungen 4.10. (S. 62) und 4.11. (S. 63) dargestellt und in der Tabelle 4.6. auf der Seite 60 zusammengefaßt aufgelistet. Die Abbildungen 4.12. und 4.13. auf der Seite 64 beinhalten eine graphische Darstellung der Untersuchungsergebnisse.

Tab. 4.6: Ergebnisse der LOH-Untersuchungen an 40 mikrodisezierten kolorektalen Karzinomen mit 12 Mikrosatellitenmarkern

Marker	Anzahl der untersuchten Proben					Heterozygotieverluste in %		
	insgesamt	homozygot	heterozygot	LOH/ fragl.LOH	MIN +	insgesamt	sicher	fraglich
D17S1792	39	22	14	3 / 2	3	35,7	21,4	14,3
D17S1809	34	14	18	2 / 1	2	16,6	11,1	5,5
D17S1813	40	7	29	8 / 6	4	48,3	27,6	20,7
D17S1870	39	18	18	7 / 1	3	44,4	38,9	5,5
D17S789	39	6	27	4 / 3	6	25,9	14,8	11,1
D17S795	39	20	16	4 / 2	3	37,5	25	12,5
D1S243	29	6	22	5 / 1	1	27,3	22,7	4,6
D5S82	38	11	24	9 / 0	3	37,5	37,5	0
D8S264	36	4	31	14 / 2	1	51,6	45,2	6,4
D15S127	37	5	30	12 / 2	2	46,6	40	6,6
D17S796	38	12	24	15 / 3	2	75	62,5	12,5
D18S70	31	3	26	19 / 0	2	73	73	0

Homozygotie und Heterozygotie

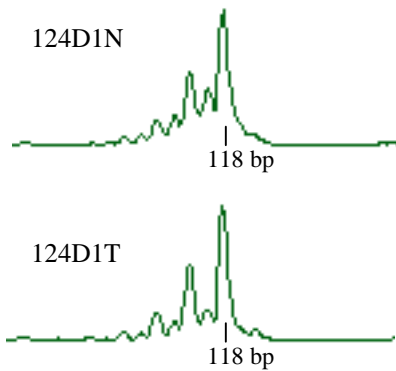


Abb. 4.5: Beispiel für einen homozygoten Locus; 124D1N und T mit D15S127

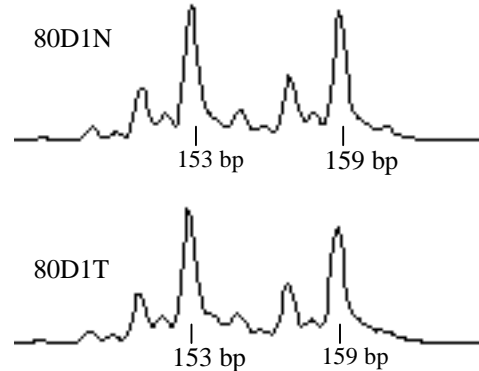


Abb. 4.6: Beispiel für einen heterozygoten Locus; 80D1N und T mit D17S789

Heterozygotieverlust; (loss of heterozygosity, LOH)

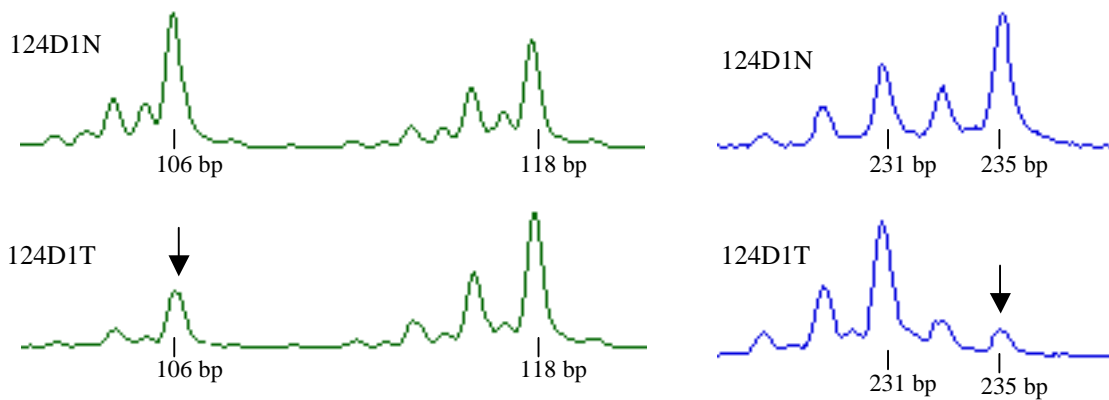


Abb. 4.7. und 4.8: Beispiele für Heterozygotieverluste (Pfeile kennzeichnen verlorene Allele); Proben 124D1N und T mit den Markern D17S795 (links) und D17S1870 (rechts)

Mikrosatelliteninstabilität

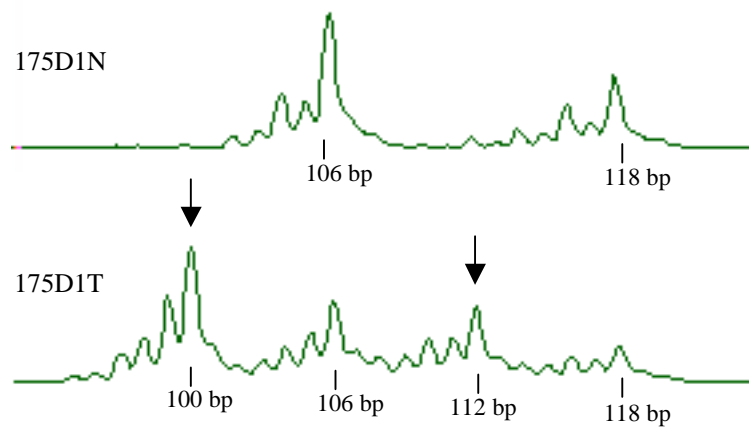


Abb. 4.9: Beispiel für Mikrosatelliteninstabilität (Pfeile kennzeichnen zusätzliche Allele); Proben 175D1N und T mit dem Marker D17S795

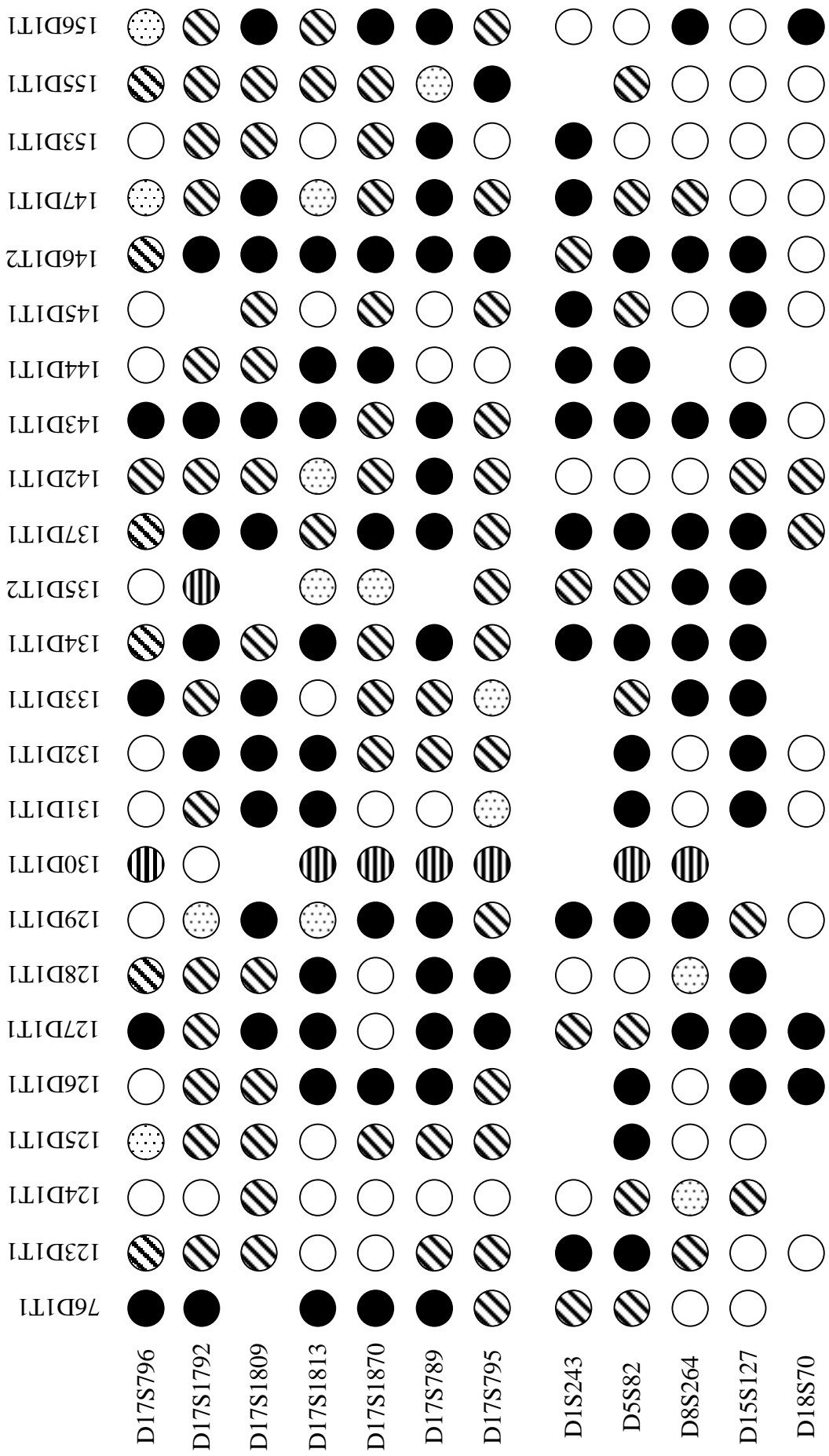


Abb. 4.10: Ergebnisse der LOH-Untersuchungen an mikrodisssezierten kolorektalen Karzinomen mit Mikrosatellitenmarkern aus der Region 17q23 sowie von den Chromosomen 1, 5, 8, 15, 17 und 18 (Die Erklärung der Zeichen ist in der Abb. 4.11. auf der S. 63 enthalten.)

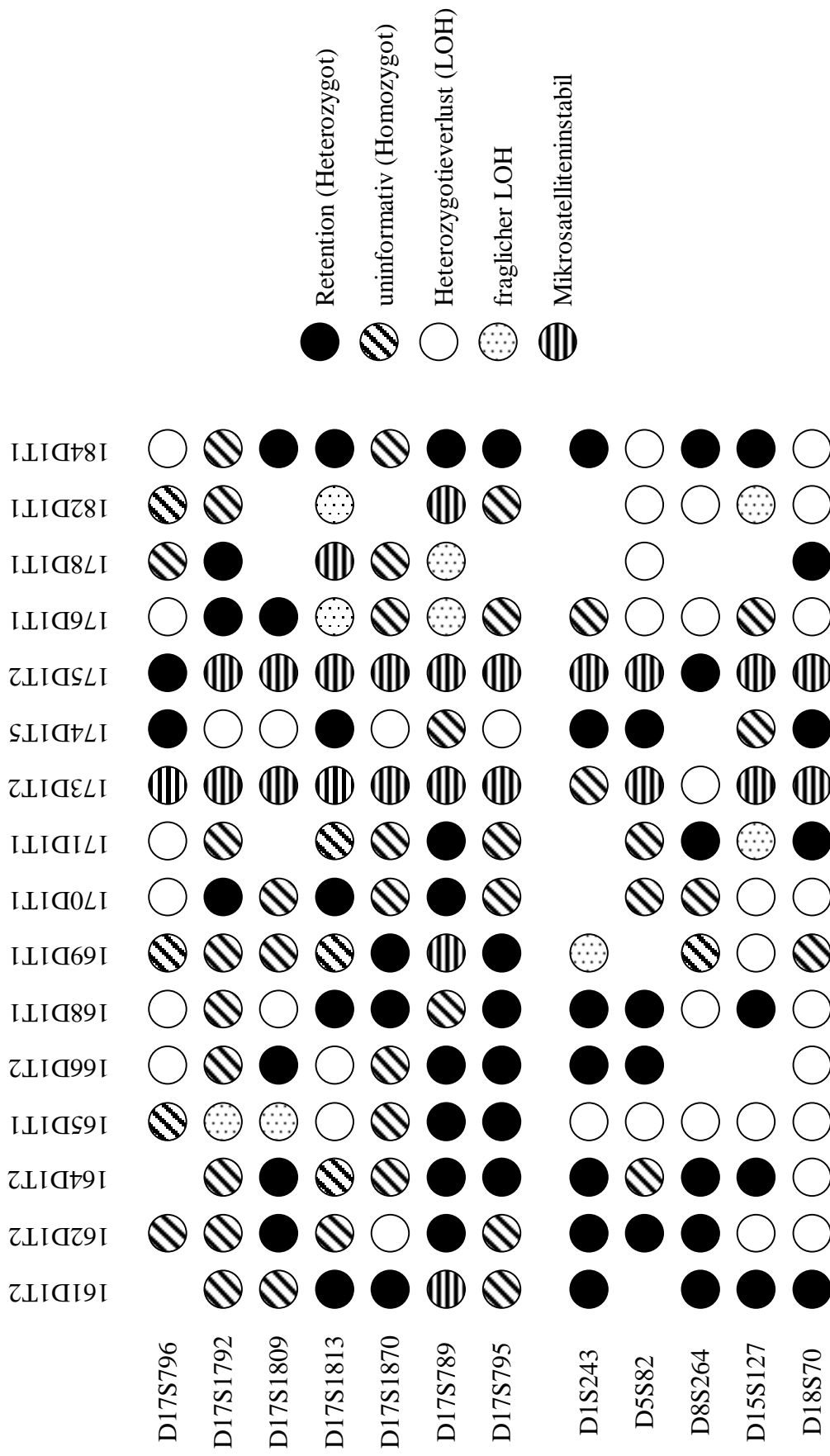


Abb. 4.11: Ergebnisse der LOH-Untersuchungen an mikrodissenzierten kolorektalen Karzinomen mit Mikrosatellitenmarkern aus der Region 17q23, sowie von den Chromosomen 1, 5, 8, 15, 17 und 18; Für die freien Felder liegen keine Ergebnisse vor.

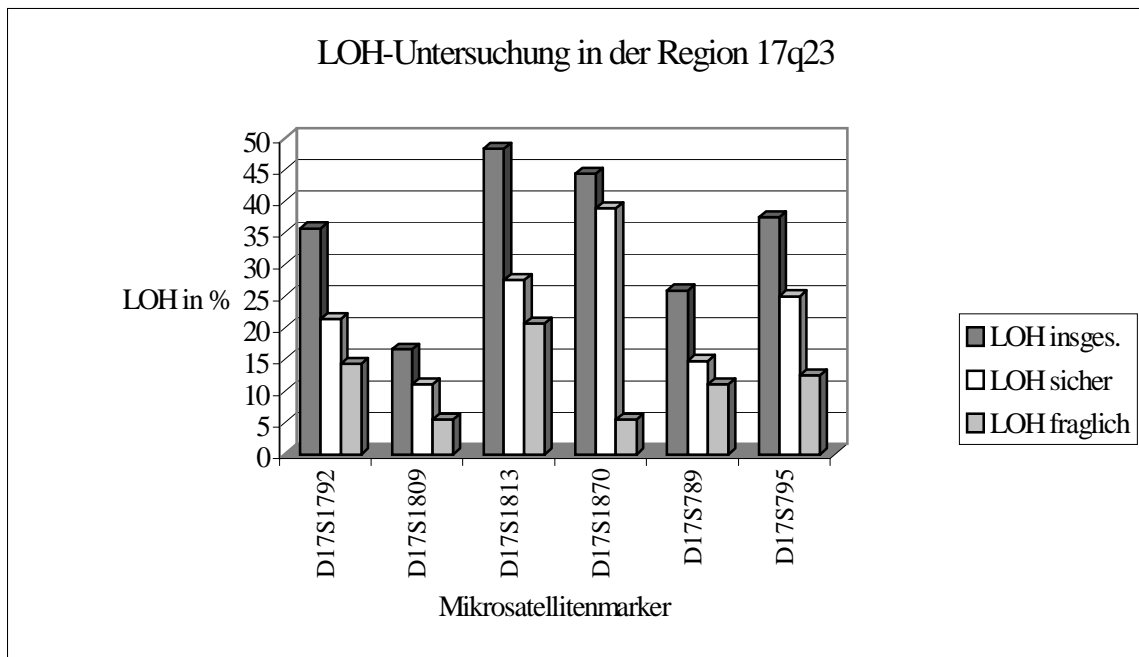


Abb. 4.12: Graphische Darstellung der Ergebnisse der LOH-Untersuchungen an kolorektalen Karzinomen mit Mikrosatellitenmarker aus der Region 17q23

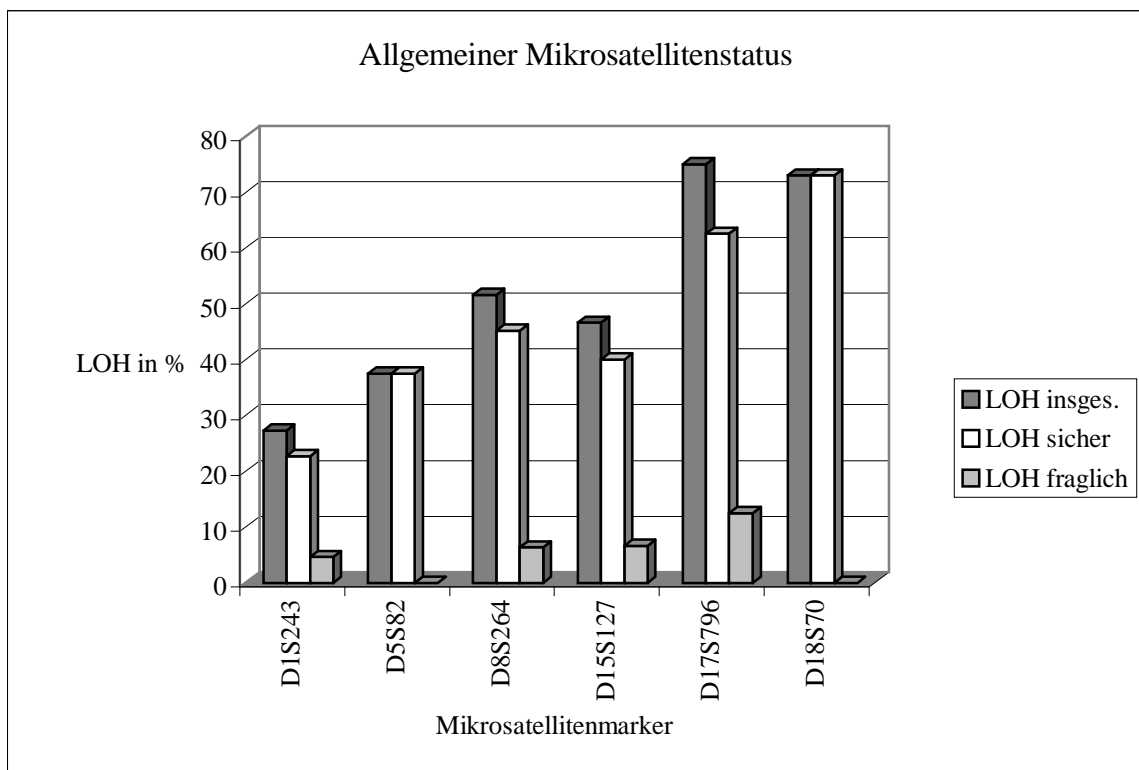


Abb.4.13: Graphische Darstellung der Ergebnisse der LOH-Untersuchungen an kolorektalen Karzinomen mit Mikrosatellitenmarkern auf unterschiedlichen Chromosomen

4.3.2. Mikrodissezierte Mammakarzinome

Die Einordnung der Proben in die Kategorien Homozygot, Heterozygot (Retention), fraglicher LOH, sicherer LOH und Mikrosatelliteninstabil (MIN+) erfolgte nach den selben Kriterien wie im Kapitel 4.3.1. auf der Seite 59. Die Abbildung 4.14. auf der Seite 66 beinhaltet eine graphische Darstellung der Ergebnisse der LOH-Untersuchungen. In der Tabelle 4.7. sind die Ergebnisse und deren Auswertung tabellarisch erfasst und in der Abbildung 4.15. auf der Seite 67 ist die Auswertung wiederum graphisch dargestellt.

Tab. 4.7: Ergebnisse der LOH-Untersuchungen an 30 mikrodissezierten Mammakarzinomen mit 7 Mikrosatellitenmarkern

Marker	Anzahl der untersuchten Proben					Heterozygotieverluste in %		
	insgesamt	homozygot	heterozygot	LOH/fragl.LOH	MIN+	insgesamt	sicher	fraglich
D17S807	26	4	22	5 / 2	0	33,8	22,7	11,1
D17S1792	26	18	7	0 / 1	1	14,3	0	14,3
D17S1809	20	4	16	4 / 1	0	31,2	25	6,2
D17S1813	30	4	25	8 / 3	1	44	32	12
D17S1870	28	12	15	4 / 2	1	40	26,7	13,3
D17S789	29	5	23	5 / 6	1	47,8	21,7	26,1
D17S795	30	15	14	3 / 2	1	35,7	30	5,7

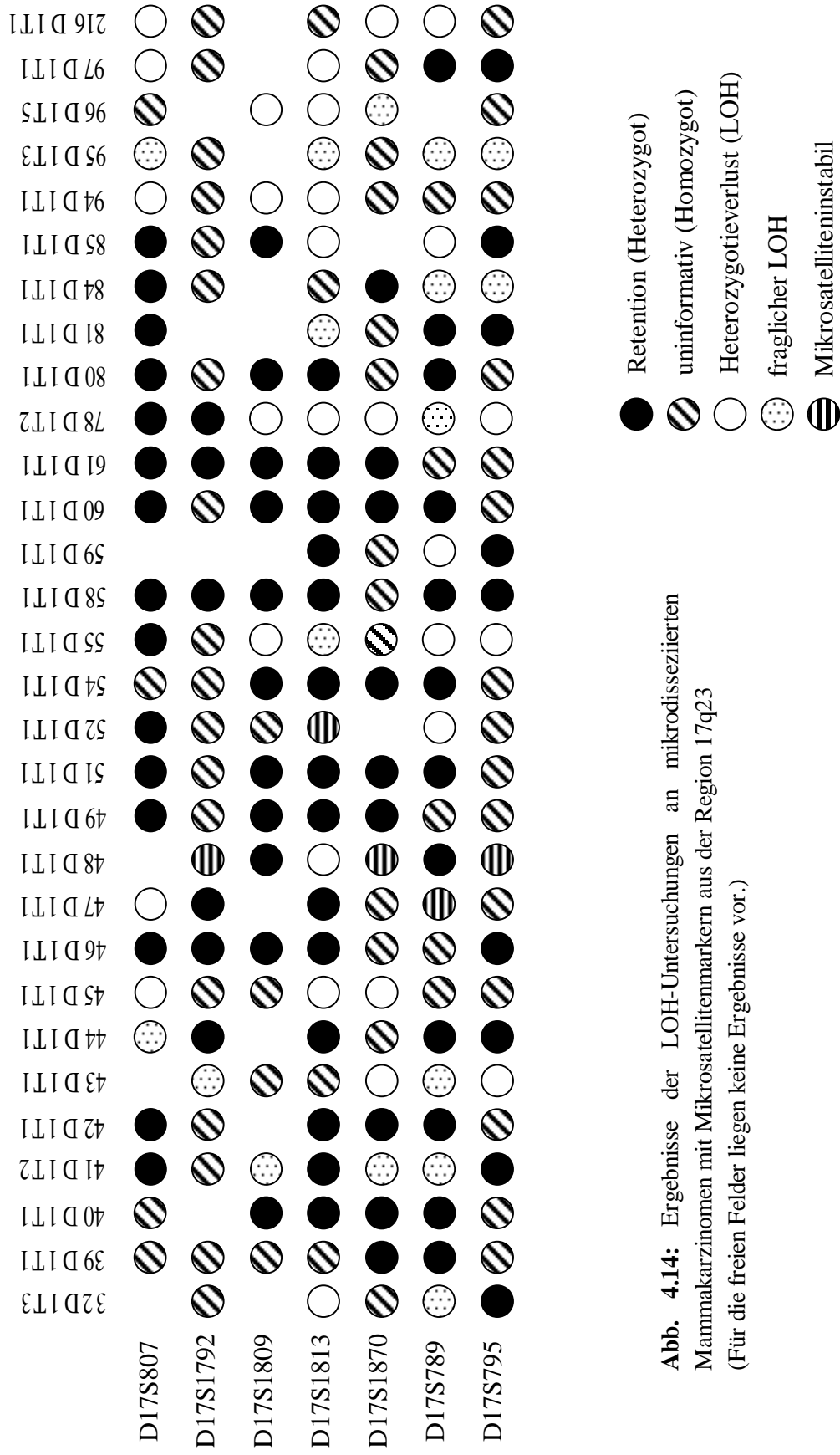


Abb. 4.14: Ergebnisse der LOH-Untersuchungen an mikrodissezierten Mammakarzinomen mit Mikrosatellitenmarkern aus der Region 17q23 (Für die freien Felder liegen keine Ergebnisse vor.)

- Retention (Heterozygot)
- /○ uninformativ (Homozygot)
- Heterozygotieverlust (LOH)
- /○ fraglicher LOH
- /○ Mikrosatelliteninstabil

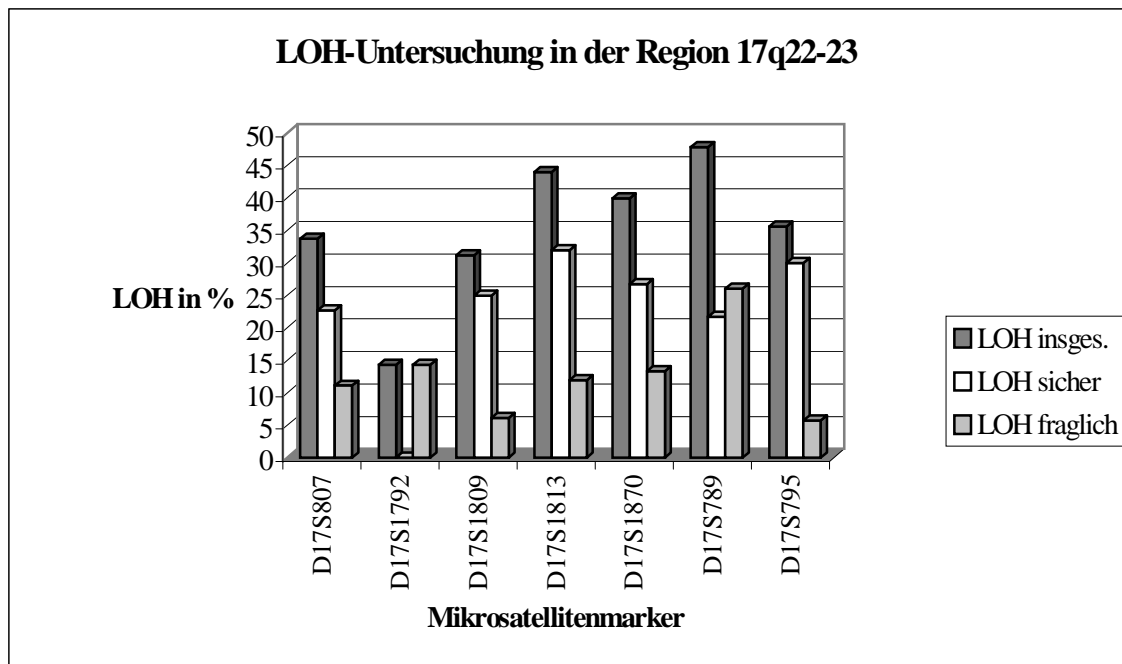


Abb. 4.15: Graphische Darstellung der Ergebnisse der LOH-Untersuchungen an Mammakarzinomen mit Mikrosatellitenmarkern aus der Region 17q22-23

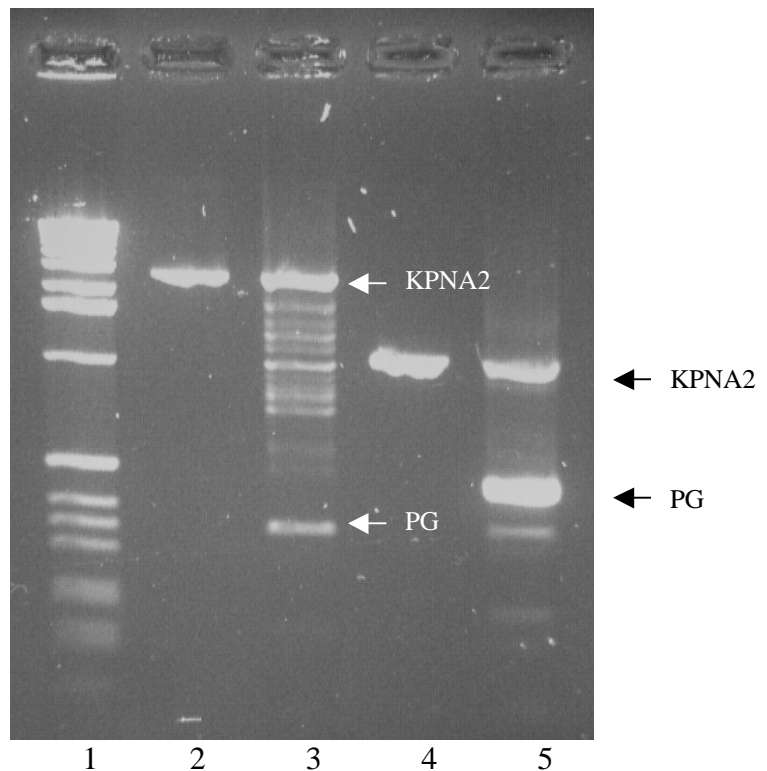
4.4. Sequenz und Genomische Struktur des Karyopherin Alpha 2-Gens

4.4.1. Sequenzierung genomischer DNA zur Identifizierung der Exon-Intron-Übergänge

4.4.1.1. Verwendung genomischer DNA aus Leukozyten

Die Identifizierung der Exon-Intron Übergänge unter Verwendung genomischer DNA aus Leukozyten erwies sich durch das Vorhandensein mehrerer Targets als sehr schwierig (Abb. 4.16.). Nach der Isolierung des YAC-Klones *931_B_10* und des PAC-Klones *B9_81*, die nach eigenen Untersuchungen das KPNA2-Gen enthalten, wurden die weiteren Sequenzanalysen an der DNA dieser Klone durchgeführt.

Abb. 4.16: Untersuchung der Intron-Exon-Übergänge unter Verwendung intronüberspannender exonischer Primer; Bahn 1: 1kb-Leiter; Bahn 2 und 4: YAC *931_B_10*; Bahn 3 und 5: DNA aus Leukozyten; Bahn 2 und 3: PCR mit den Exonprimern 384-403 und 885-866 (es werden die Introns 4, 5 und 6 überspannt, vgl. Tab. 3.5., S. 44); Bahn 4 und 5: PCR mit den Exonprimern 772-791 und 1249-1230 (es werden die Introns 6 und 7 überspannt, vgl. Tab. 3.5., S. 44); **PG:** Pseudogen auf Chromosom 4 (vgl. Kap 4.1.1., S. 51); **KPNA2:** Karyopherin Alpha 2-Gen auf 17q23



4.4.1.2. Verwendung von DNA aus dem YAC 931_b_10 und dem PAC B9_81

Wegen der im Kapitel 4.4.1.1. geschilderten Probleme erfolgte die Untersuchung der Exon-Intron-Übergänge ausschließlich unter Verwendung von DNA aus Hefezellen mit dem YAC 931_b_10 und dem *E. coli*-Klon mit dem PAC B9_81 (Angabe in Klammern jeweils am Ende der entsprechenden Exons). Die Sequenz des Exon 1 ist in der Abbildung 4.17. auf der Seite 74 graphisch dargestellt.

Die Sequenzierung der oben aufgeführten Klone ergab folgende Sequenz (-klein geschriebene Nukleotide werden weder transkribiert noch translatiert;

- groß geschriebene Nukleotide werden transkribiert, wobei nur die Fettgedruckten letztendlich in ein Protein umgewandelt werden;
- die unterstrichenen Sequenzen sind eigene Vorschläge für intron-basierende exonüberspannende Primer):

Exon 1

```

.....cggccca  gggaaccgcc  ccttcgcgct  gcttgacggg  atctggagtc  ctcccgtcc  gcaccgccag
gcgctcaggg  accgcccggc  cgctccctca  ccgcccggcc  gctccctcat  ctccgatgc  catctcttt  tttttttt
ttttcccc  ctcccactcg  cccccaagcc  tgtgactccc  tcccctcca  acgtgtttt  caaatccacc  aatgggcaca
cagcttaggc  tcgaaccagc  caatcggaat  gcggagtcac  cgggaaattt  aaatcgccc  ggccggctgc  acga
GCCACACGGT  CTTTGAGCTG  AGTCGAGGTG  GACCCTTTGA  ACGCAGTCGC
CCTACAGCCG  CTGATTCCCC  CCGCATCGCC  TCCCGTGGAA  GCCCAGGCC
GCTTC  GCAG  gtacaaactc  aggcggcggc  ccggcccag  cgctaacggc  ttgcccgtgg  gcggcgttcg
ccttttgggt  tgggggaggg  aggccccggg  tccacgcaa  acctg-Exon1+106  gctct  gcctcccgcg
ttaactagge  ctcgggggcg  acattcattg  accaNgcggc  taatttcgc (B9_81).....

```

Exon 2 und 3; Codon 1-25 und 26-71

.....atatgg ctactaggaa gtttcaattt atatagctgg cattctattt ctgatggaga gccctctcca ggaagtctca gccctttaga gggaaggggg acacttcccc ttgggtaaa gctatttcat agtgccgaaa acatgatgat cccccctca gtaatacaggt gtggattcag tagatgcttg ataattcagt tcttattgg tactattatt gacaaaggaa aatgataaag gagatatttt tetcttcccc catcttttag C TTTCTCCCTT TGTCTCATAA CC **ATG TCC ACC AAC GAG AAT GCT AAT ACA CCA GCT GCC CGT CTT CAC AGA TTC AAG AAC AAG GGA AAA GAC AGT ACA** gtgagtacctt ctgttgcttt cctgtgggtg t **Exon3-118-atttaa**tg ggaagacatt tggaaagggg tgaaaactga ggtattta-**Exon2+78** aa aaaaaaatgc ccccccttag caacaaaaac tggttttata ggtgaaacgg catgttatct ttectcaag **GAA ATG AGG CGT CGC AGA ATA GAG GTC AAT GTG GAG CTG AGG AAA GCT AAG AAG GAT GAC CAG ATG CTG AAG AGG AGA AAT GTA AGC TCA TTT CCT GAT GAT GCT ACT TCT CCG CTG CAG GAA AAC CGC AAC AAC CAG** gtaaaaaatg tattttagtt tatgagttac gtgaaatcca gaaaatcagt agggactttt ctagaaatt caagtaaact taacatttct agtcttaacg gttttaacta tctgtgaaca t-**Exon3+100** dtttttctc tgtttgcaat tagtaattgt cttctttcct gccttctgta atccactgaa gctgatttag gatcttctt tagctctgac cttcctcag acttccctgc atttctagct actagctggg taccttggcc tgaccagtgt gtccagagcc agccagtttc tggttatttc ttctttt. (B9_81).....

Exon 4; Codon 72-101.2

.....**Exon4-79-ctgccttca** caagtaagtgt ggattttatt gtttgattt aatcttaatg ataatgtgca aactttcact tttcttctag **GGC ACT GTA AAT TGG TCT GTT GAT GAC ATT GTC AAA GGC ATA AAT AGC AGC AAT GTG GAA AAT CAG CTC CAA GCT ACT CAA GCT GCC AG** gtaagtcttg tctgcatag catgggtagc ctaa-**Exon4+34** gaaatt tgtgtttta gattttttt cgggggggtg gggcaggaag ggacagacag atagtacaa ggaaagatta ggccagccag ccataagcca aatagttatt tttatttatt aatttggagg agaggggagg ccttgctatt ttgccaggc aggccaggaa tgcttgggtt caagctatcc tctgacctca acctcctgaa gtcttgggat cacaggtgtg tgccctccca ccagccceta aagtttttac c. (931_b_10)

Exon 5; Codon 101.3-191.1

....accctgtc agaatgtgaa aagtttttt aaaagtgtac aagatctgga gtagatttct gcagggatgg aaaggagggt
aatctacatt aatttctgga aaaatggtag ttaattatac cgcatacata gcaccataca agtaatctgt tcagcttctc
cttaggttcc agcatgtctc agcatttagt gatttactta aaaggtt **Exon5-113**-gtc tgaagtctta aactcttgaa
ttgcatttta tattggtttt tacacaaact ccttttgta atcaactgtca acttttattt gtctttttgt tcccctttag **G AAA CTA**
CTT TCC AGA GAA AAA CAG CCC CCC ATA GAC AAC ATA ATC CGG GCT
GGT TTG ATT CCG AAA TTT GTG TCC TTC TTG GGC AGA ACT GAT TGT
AGT CCC ATT CAG TTT GAA TCT GCT TGG GCA CTC ACT AAC ATT GCT
TCT GGG ACA TCA GAA CAA ACC AAG GCT GTG GTA GAT GGA GGT GCC
ATC CCA GCA TTC ATT TCT CTG TTG GCA TCT CCC CAT GCT CAC ATC
AGT GAA CAA GCT GTC TGG GCT CTA GGA AAC ATT GCA G gtacttgac
ttgaagtctt ttgactgaa tgtatctaata cgtaattagt tggaagaaag gccttggtat aagtaataat gactttgtca
agttttgagc-**Exon5+100** ttgctttcaa gcccttatta ggaatgaaag tctgccttt acaaaggcag (931_b_10)

Exon 6 und Exon 7; Codon 191.2-222 und Codon 223-310;

cagaggccat ctaagtaagt ttgggagttt t **Exon6-363**-tgctgggtgc attcagtcac tgaaaattga tgggtgttga
caagtaata aaattaatct tgcctc *ALU*-ggcc gggcatgggtg gctcacgcct gtaatcccag cactttggga
ggcagaggcg ggtggatcat gaggtcagga gattgagacc atcctggcta acacagtga accccacctc tactaaaaat
acaaaaaatt agccgggctt ggtggcgggc gcctgaagct gaagcaggag aatggcttga acccagagcg
gacttgcaat gagccgagat cgcgccactg cactccagcc tgggcgacag aNagaactcc gtctcaaaaa
aaaaaaaaaa aattaatctt gcctttttt tcag **GT GAT GGC TCA GTG TTC CGA GAC TTG**
GTT ATT AAG TAC GGT GCA GTT GAC CCA CTG TTG GCT CTC CTT GCA
GTT CCT GAT ATG TCA TCT TTA GCA gtaagttac **Exon7-91**-taacatgagta aagtactca
cttcttcatt ctaatttccc ccattctctc aaaagacaga acctctcatt gcctat-**Exon6+86** tttt ttccccccag
(B0981)**TGT GGC TAC TTA CGT AAT CTT ACC TGG ACA CTT TCT AAT CTT**
TGC CGC AAC AAG AAT CCT GCA CCC CCG ATA GAT GCT GTT GAG CAG
ATT CT T CCT ACC TTA GTT CGG CTC CTG CAT CAT GAT GAT CCA GAA
GTG TTA GCA GAT ACC TGC TGG GCT ATT TCC TAC CTT ACT GAT GGT
CCA AAT GAA CGA ATT GGC ATG GTG GTG AAA ACA GGA GTT GTG CCC
CAA CTT GTG AAG CTT CTA GGA GCT TCT GAA TTG CCA ATT GTG gtaa
Exon8-gttatt tactttaga ttaggacata agtataagaa gcctatgagc-**Exon7+58** gt ggtagtgggtg
gct *ALU*-cacacct gtgtaatccc agcactttgg gagaccaagg caggtggatc acctgaggtc aggagtcaa
gaccagcctg gccaacattg tgaagccca tetctactaa aaatacaagg aaattatctg gacatgggtg cacgtgtctg
taatctcaac tactcgggag gctaaggcag gagaattgct tgatctggag cagagctgca gtgaccgaaa tctgtccatta
tactccatct ctcaaaaaaaaa (B9_81)....

Exon 8 und Exon 9; Codon 311-388 und Codon 389-449

...*ALU* ca.120bp..ttttttttttcag **ACT CCT GCC CTA AGA GCC ATA GGG AAT ATT GTC ACT GGT ACA GAT GAA CAG ACT CAG GTT GTG ATT GAT GCA GGA GCA CTC GCC GTC TTT CCC AGC CTG CTC ACC AAC CCC AAA ACT AAC ATT CAG AAG GAA GCT ACG TGG ACA ATG TCA AAC ATC ACA GCC GGC CGC CAG GAC CAG ATA CAG CAA GTT GTG AAT CAT GGA TTA GTC CCA TTC CTT GTC AGT GTT CTC TCT AAG** gtaacaaagt ctaggattt aatcaagtca ttttagtat ttatagaag ctgtgcttga taagcttctt **cacgtgcaag_gaat-Exon8+84** ctgggg ttctactagg agtcctttgc tgaacaatac ccagtaacce ctttt **Exon9-115** **actta aggttgata gaaccttgg** actttcagtc attgttttg tgaaaaagta ctcttggat cttatttgg caactgttct gaaataaac catttcetta tgtttaatag(B0981) **GCA GAT TTT AAG ACA CAA AAG GAA GCT GTG TGG GCC GTG ACC AAC TAT ACC AGT GGT GGA ACA GTT GAA CAG ATT GTG TAC CTT GTT CAC TGT GGC ATA ATA GAA CCG TTG ATG AAC CTC TTA ACT GCA AAA GAT ACC AAG ATT ATT CTG GTT ATC CTG GAT GCC ATT TCA AAT ATC TTT CAG** gtaagtecta tcaaggtggc ttgtttgaa ttggacttg ataataatca **gtttactatt tagactgg-Exon9+68** gg ggagggcagc tgtaagtta ctcactagta agccacagaa tcagaaagc (B9_81) ...

Exon 10; Codon 450-499

..... *ALU* aaacttggatttttttttttag **GCT GCT GAG AAA CTA GGT GAA ACT GAG AAA CTT AGT ATA ATG ATT GAA GAA TGT GGA GGC TTA GAC AAA ATT GAA GCT CTA CAA AAC CAT GAA AAT GAG TCT GTG TAT AAG GCT TCG TTA AGC TTA ATT GAG AAG TAT TTC TCT GTA GAG** gtgagtaatg gatggtaata ttaataacaa cttggaaaca tgtagtcaag gccataagcc ttttttccc ttttaaaaat aagtgtcata tctttgttaa atatagtaaa atatcagtgt gcatgggaca taatgtactt atttggccct ctagtttggc ttgatggtaa taaaatctt ttaaactgag attttaaaag tcaccagatt agtttcaaat gaacaacctt gagaatctta (B9_81)....

Exon 11; Codon 500-530

..... tcctattgaa aagtgacggt tggggaagaa aaaaatctcg gcctgtttgt gttactgtag tagctagcat ttatgaattg
gcaaagttc agagaccctc cctcctctat gtcaaatact ataatac atacaggatt aaaggtgta atatgcagat
caagaccta **Exon11-81** g agattaaata cagacttcag gtaggctgct gcttggata cttatatcat tttatactt
atTTTTaat atattccag **GAA GAG GAA GAT CAA AAC GTT GTA CCA GAA ACT ACC**
TCT GAA GGC TAC ACT TTC CAA GTT CAG GAT GGG GCT CCT GGG ACC
TTT AAC TTT TAG ATCATGTAGC TGAGACATAA ATTTGTTGTG
TACTACGTTT GGTATTTTGT CTTATTGTTT CTCTACTAAG AACTCTTTCT
TAAATGTGGT TTGTTACTGT AGCACTTTTT ACACTGAAAC TATACTTGAA
CAGTTCCAAC TGTACATACA TACTGTATGA AGCTTGTCCT CTGACTAGGT
TTCTAATTC TATGTGGAAT TTCCTATCTT GCAGCATCCT GTAAATAAAC-
1952-33 ATTCAAGTCC ACCCTTttct tgaactcacc atgctatgt gttgctttct aatttgggg cctttaatgt
tgctagt gaa aggtaacctg tccaaactga tgggattaac cagaggtagt cctggctgca gttttgcag aagaatgaat
aacattttct ggaaaccctc agccagtgtc tccttaagtc tccttgcca gggagatggg ctaaataccg taaatthaat
cataaatctc tgctggagct acaaatggaa ttcttctc ccaaactca aggccgaatg gggttccaag gtaaatcacg
gctgcacatg ggctNatct gggaaagtac ccagttctgt ttcgttgatg aggggcatga gggccacca tg. (B9_81)

4.4.2. Analyse der genomischen Struktur des KPNA2-Gens

Aus den Ergebnissen der PCR-Untersuchungen zur Ermittlung der Introngrößen und der Sequenzuntersuchungen läßt sich schließen, daß das KPNA2-Gen aus 11 Exons und 10 Introns besteht und ohne die Promotersequenz eine Größe von ca. 11000 bp besitzt. Die Ergebnisse der genomischen Strukturanalyse des KPNA2-Gens sind in der Abbildung 4.18. auf der Seite 75 graphisch dargestellt.

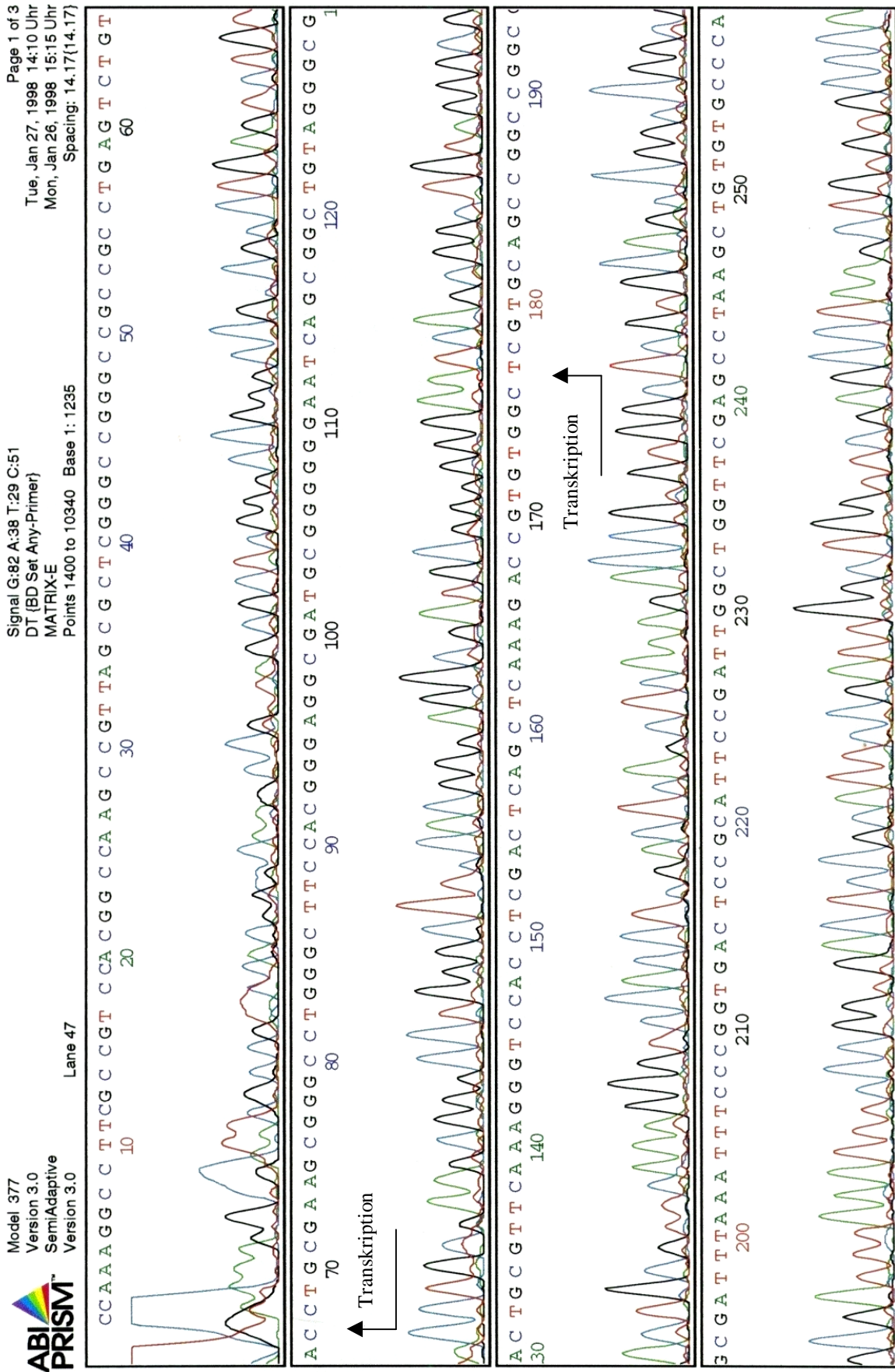


Abb. 4.17: Sequenz des Exon 1 des KPNA2-Gens mit Exon-Intron-Übergängen - Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung des PACs B9_81. Für die Sequenzierreaktion wurde der intronische Primer Exon1+106 (vgl. S. 68) verwendet. Der transkribierte Abschnitt ist durch die Pfeileinrahmung gekennzeichnet (vgl. Sequenz des Exon 1 auf Seite 68).

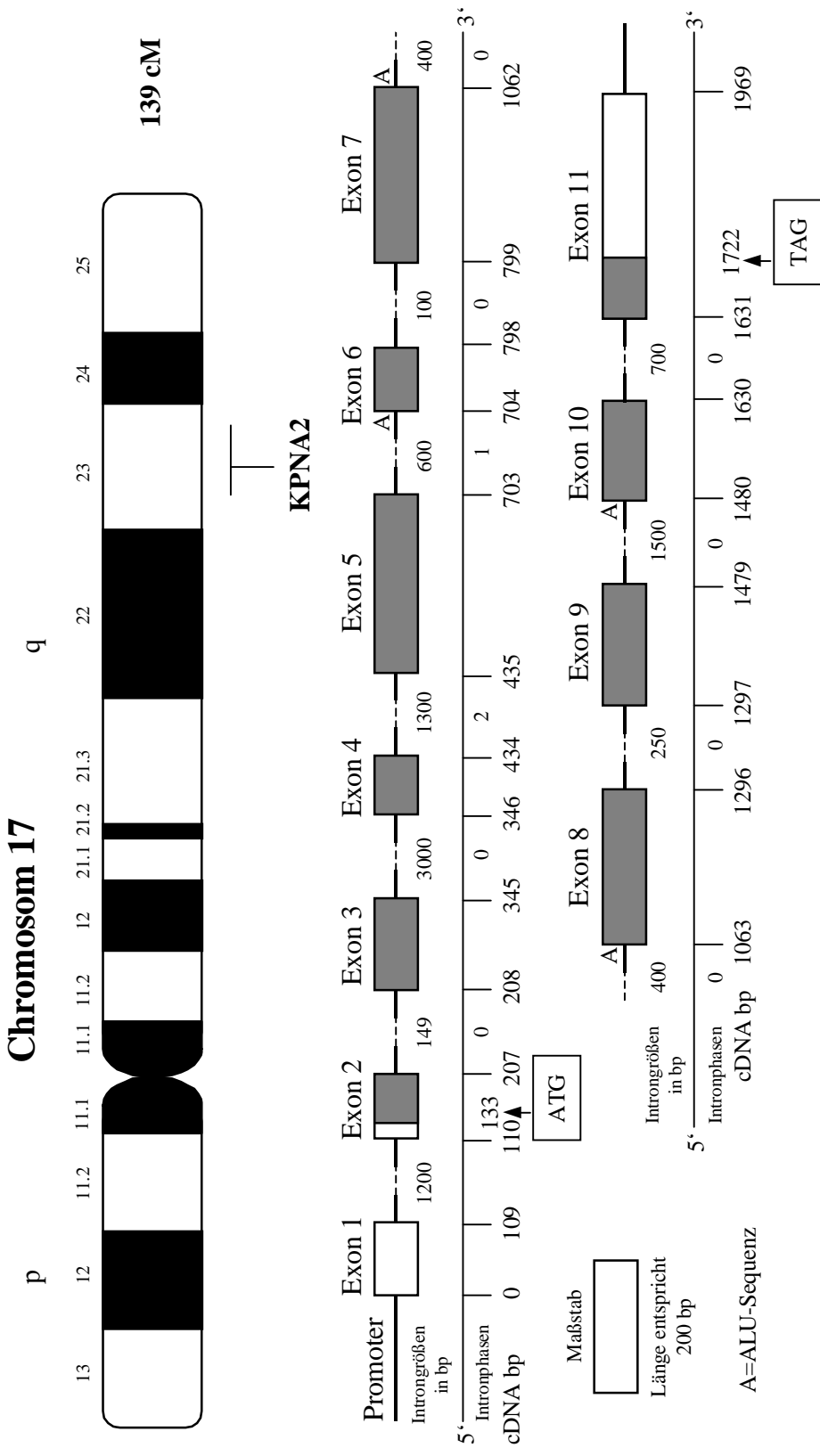


Abb. 4.18: Genomische Struktur des KPNA2-Gens - Die Balkenstrukturen stellen das Transkript dar, wobei der graue Bereich in das eigentliche Protein umgewandelt wird (ATG=Startcodon; TAG=Stopcodon).