

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem Max-Delbrück-Centrum
für Molekulare Medizin

**Physikalische Kartierung und Genomische Struktur des
Kariopherin Alpha 2 Gens -
Untersuchungen zu Heterozygotieverlusten in der
chromosomalen Region 17q23 und zum allgemeinen
Mikrosatellitenstatus an mikrodisezierten kolorektalen und
Mammakarzinomen beim Menschen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Heiko Pidde

Tierarzt aus Magdeburg

Berlin 1999

Journal-Nr. 2336

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. K. Hartung

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. R. Rudolph

Zweiter Gutachter: Dr. habil. S. Scherneck

Tag der Promotion: 21.01.2000

meinen Kindern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	9
2. LITERATURÜBERSICHT	10
2.1. Molekulargenetische Grundlagen	10
2.1.1. Organisation des Genoms des Menschen	10
2.1.2. Mikrosatellitenmarker und deren Bedeutung	11
2.1.3. Intrazellulärer Proteintransport	12
2.1.3.1. Aktiver Transport karyophiler Proteine in den Zellkern	12
2.1.3.2. Rücktransport der Rezeptoren ins Cytoplasma	15
2.1.3.3. Bedeutung und Aufbau des KPNA2-Gens	17
2.1.4. Physikalische Kartierung	17
2.1.5. Polymerasekettenreaktion (PCR) und DNA-Sequenzierung	19
2.2. Tumorgenetische Grundlagen	20
2.2.1. Kolorektales Karzinom	20
2.2.1.1. Vorkommen und Bedeutung	20
2.2.1.2. Mehrschrittkanzerogenese beim kolorektalen Karzinom	20
2.2.1.3. Erblich bedingte Formen des Dickdarmkrebses	21
2.2.1.3.1. Hereditäres kolorektales Karzinom ohne Polyposis (HNPCC)	21
2.2.1.3.1.1. Reparatur-Mutator-Gene und Mikrosatelliteninstabilität	22
2.2.1.3.1.2. Zielgene genomischer Instabilität	23
2.2.1.3.2. Familiäre adenomatöse Polypose (FAP)	23
2.2.2. Mammakarzinom	24
2.2.2.1. Vorkommen und Bedeutung	24
2.2.2.2. Brustkrebskanzerogenese	24
2.2.2.2.1. Amplifikation und Überexpression von Onkogenen	24
2.2.2.2.2. Heterozygotieverlust und Tumorsuppressorgene	24
2.2.2.3. Erbliche Disposition zu Brustkrebs	25
2.2.3. Tumorgenetische Untersuchungen in der Region 17q23	25
2.2.4. OHO31-ein Tumorsuppressorgen bei <i>Drosophila melanogaster</i>	26

3. MATERIAL UND METHODEN	27
3.1. Hybridzellen	27
3.1.1. Somatische Zellhybride	27
3.1.2. Zellhybride mit chromosomalen Fragmenten	28
3.2. Künstliche Hefechromosomen (YACs)	28
3.2.1. Auswahl, Herkunft und Untersuchung der Hefezellen mit YACs	28
3.2.2. Anzucht von Hefezellen	29
3.2.3. DNA-Extraktion aus Hefezellen	30
3.2.3.1. Schnellpräparation unter Verwendung von Proteinase K	30
3.2.3.2. DNA-Präparation nach Agaroseeinbettung	30
3.3. Bakteriophagen P1-abgeleitete künstliche Chromosomen (PACs)	31
3.3.1. Auswahl, Herkunft und Untersuchung der Bakterien mit PACs	31
3.3.2. Anzucht von Bakterien mit PACs	33
3.3.3. DNA-Extraktion aus Klonen mit PACs	33
3.3.3.1. Mini-Präparation	33
3.3.3.2. Maxi-Präparation mittels QIAGEN Plasmid Kit	35
3.4. Künstliche Bakterienchromosomen (BACs)	36
3.4.1. Auswahl, Herkunft und Untersuchung der Bakterien mit BACs	36
3.4.2. Anzucht von Bakterien mit BACs	36
3.4.3. DNA-Extraktion aus Klonen mit BACs	37
3.5. Untersuchungsmaterial	37
3.6. Histologische Beurteilung und Mikrodisektion	38
3.7. DNA-Präparation aus Zellen vom Menschen	38
3.7.1. DNA-Extraktion aus Blut	38
3.7.2. DNA-Extraktion aus mikrodiseziertem Gewebe	40
3.7.2.1. Paraffineingebettetes Gewebe	40
3.7.2.2. Frischgewebe	40
3.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)	41
3.8.1. Reagenzien und Bedingungen der PCR	41

3.8.2. Verwendete Primer	42
3.8.2.1. Mikrosatellitenmarker	42
3.8.2.2. Primer aus dem KPNA2-Gen	42
3.8.2.3. Marker aus der Region 17q23	42
3.9. Auftrennung und Detektion der PCR-Produkte	47
3.9.1. Agarosegelelektrophorese	47
3.9.2. Polyakrylamidgelelektrophorese	47
3.9.2.1. Silberfärbung	47
3.9.2.2. Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer	48
3.10. DNA-Sequenzierung	49
3.10.1. Sequenzierung von PCR-Produkten	49
3.10.2. Direktsequenzierung von PAC-/BAC-DNA	50
4. ERGEBNISSE	51
4.1. Physikalische Kartierung eines STS-Markers aus dem KPNA2-Gen	51
4.1.1. Kartierung unter Verwendung somatischer Zellhybride	51
4.1.2. Kartierung mit Hilfe von YACs	53
4.1.3. Zellhybride mit chromosomalen Fragmenten aus der Region 17q	55
4.2. Konstruktion eines PAC-/BAC-Contigs	56
4.2.1. Screening einer PAC-/BAC-Bibliothek mit Markern aus der Region 17q23	56
4.2.2. Untersuchung der PAC-/BAC-Klone mittels PCR	56
4.3. Untersuchung von Heterozygotieverlusten in der Region 17q23 und allgemeiner Mikrosatellitenstatus	59
4.3.1. Mikrodisezierte Kolonkarzinome	59
4.3.2. Mikrodisezierte Mammakarzinome	65
4.4. Sequenz und genomische Struktur des KPNA 2-Gens	68
4.4.1. Sequenzierung genomischer DNA zur Identifizierung der Exon-Inton-Übergänge	68
4.4.1.1. Verwendung genomischer DNA aus Leukozyten	68
4.4.1.2. Verwendung von DNA aus dem YAC <i>931_d_10</i> und dem PAC <i>B9_81</i>	69
4.4.2. Analyse der genomischen Struktur des KPNA2-Gens	73

5. DISKUSSION	76
5.1. Das KPNA2-Gen und dessen Bedeutung für die Zelle	76
5.2. Die physikalische Kartierung des KPNA2-Gens	77
5.3. Die Konstruktion eines PAC-/BAC-Contigs und dessen Bedeutung	79
5.4. LOH-Untersuchung in der Region 17q23 und allgemeiner Mikrosatellitenstatus	81
5.5. Sequenz und genomische Struktur des KPNA2-Gens	82
6. ZUSAMMENFASSUNG	83
7. SUMMARY	85
Physical mapping and genomic structure of the Karyopherin Alpha 2 (KPNA2) Gene - Analysis of the loss of heterozygosity (LOH) in the chromosomal region 17q23 and investigation to the general state of microsatellites in microdissected colorectal and mammary carcinomas of men	
8. LITERATURVERZEICHNIS	87
9. ANHANG	107
9.1. Tabelle des Zellhybridpanels	107
9.2. Tabelle mit Patienten- und Tumordaten der Kolonkarzinome	108
9.3. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	109

Danksagung

Selbständigkeitserklärung

Lebenslauf

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. R. Rudolph für die Betreuung sowie für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit.

Bei Herrn Dr. Dr. K. Köhle möchte ich mich für die wertvollen Anregungen und Hinweise zur Bearbeitung des Themas bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Tumorgenetik des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin, die mir bei der Durchführung der Arbeit behilflich waren. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn O. Ullrich für eine langjährige enge Zusammenarbeit.

Des Weiteren geht mein Dank an Frau B. Barthel, Frau I. Schmidt und Herrn Dr. H. Fechner für die Durchsicht des Manuskriptes.

Ich bedanke mich auch bei L. Mountstephens, E. Horstkötter, Dr. M. Janz sowie bei allen nicht namentlich erwähnten Kollegen und Freunden, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Heiko Pidde

Berlin, Juli 1999

LEBENS LAUF

Name: Heiko Pidde, geb. Schmidt

Geburtsdatum: 31.08.1968

Geburtsort: Magdeburg

Anschrift: Köllnische Str. 23
12439 Berlin

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung: 09/1975-06/1985
Polytechnische Oberschule in Niederndodeleben

09/1985-06/1987
Erweiterte Oberschule in Magdeburg
Abschluß: Abitur

Wehrdienst: 11/1987-05/1989
Grundwehrdienst in der NVA

Hochschulbildung: 09/1989-03/1995
Studium der Veterinärmedizin an der Humboldt-
Universität zu Berlin, Abschluß an der Freien Universität
Berlin,
Abschluß: Staatsexamen

Tätigkeiten: 07-10/1987 und 06-08/1989
Melker und Tierpfleger in der Landwirtschaft-
lichen Produktionsgenossenschaft
Niederndodeleben

12/1995-10/1998
wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Tumorgenetik
am Max-Delbrück-Centrum
für Molekulare Medizin

11/1998-10/1999
Studium der Rechtswissenschaften an der
Humboldt-Universität zu Berlin

seit 11/1999
Aufbaustudium „Gewerblicher Rechtsschutz“ LL.M.
an der Humboldt-Universität zu Berlin