

2. Literaturübersicht

2.1. Molekulargenetische Grundlagen

2.1.1. Organisation des Genoms des Menschen

Bei eukaryoten Organismen wird die genetische Information in Form von Desoxyribonucleinsäure (DNA) gespeichert. Die DNA-Moleküle befinden sich beim Menschen in den Chromosomen des Zellkerns und in den Mitochondrien (Abb. 2.1.). Die somatischen Zellen des Menschen enthalten einen diploiden Chromosomensatz, das sind 22 mit nahezu identischen DNA-Sequenzen ausgestattete Chromosomenpaare (Autosomen) und zuzüglich entweder zwei X-Chromosomen im weiblichen Geschlecht oder ein X- und ein Y-Chromosom im männlichen Geschlecht (Karyotyp 46, XX bzw. 46, XY). Demgegenüber besitzen die haploiden Gameten (Spermien und Eizellen) nur halb so viele Chromosomen (PASSARGE, 1994).

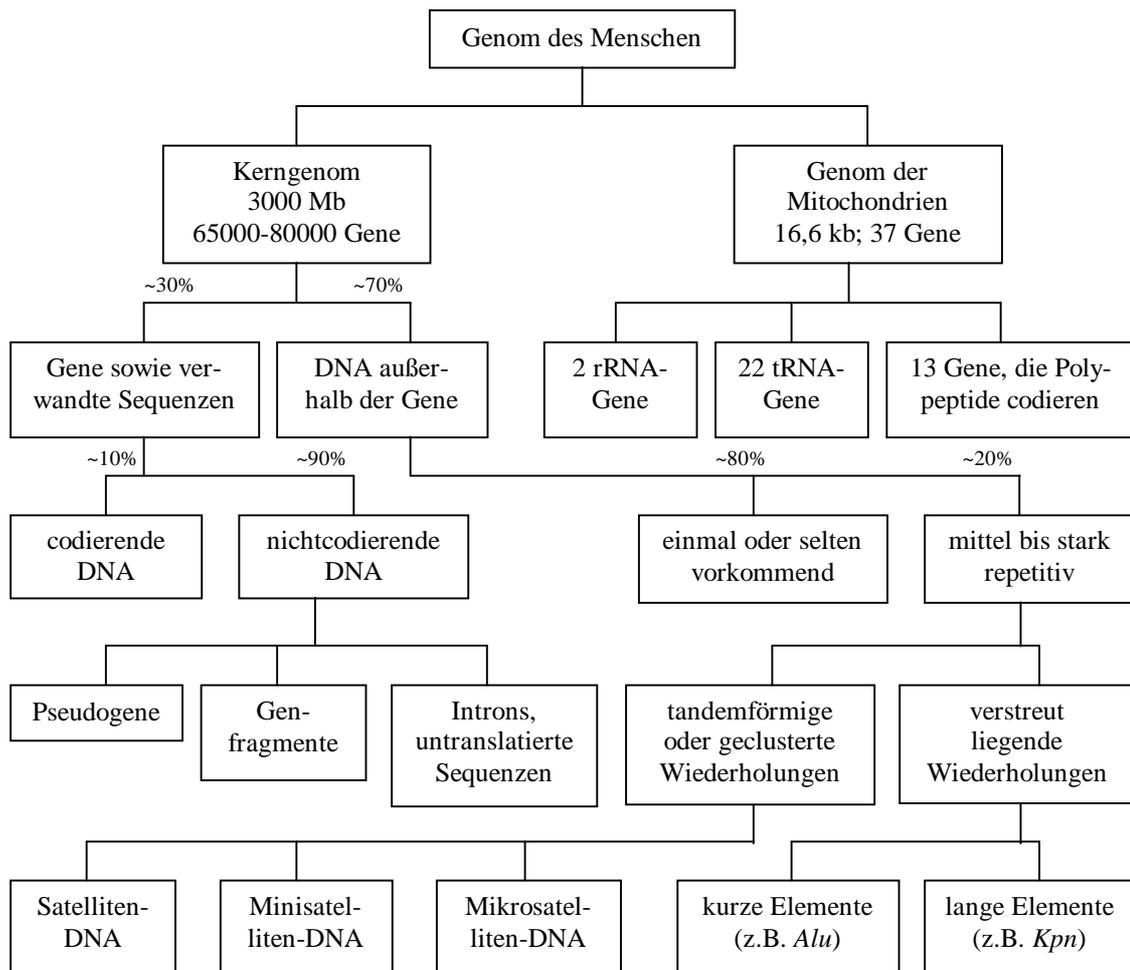


Abb. 2.1: Organisation des Genoms beim Menschen in Anlehnung an STRACHAN und READ (1996)

2.1.2. Mikrosatellitenmarker und deren Bedeutung

Das Kerngenom des Menschen enthält eine große Menge hochrepetitiver DNA-Sequenzfamilien. Direkte, tandemförmige Wiederholungen einer DNA-Sequenz können je nach der Größe der Wiederholungseinheiten in drei Hauptklassen eingeordnet werden: **-die Satelliten-DNA**, die aus sehr langen Folgen tandemförmiger Wiederholungen mit einer einfachen bis mittelkomplexen repetitiven Einheit besteht; **-die Minisatelliten-DNA**, die durch eine Ansammlung mittelgroßer Folgen von Sequenzwiederholungen gekennzeichnet ist; und schließlich **die Mikrosatelliten-DNA**, die kurze Folgen direkt repetitiver Einheiten enthält (SINGER, 1982). Mikrosatelliten bestehen aus Sequenzwiederholungen von einem bis vier Nukleotiden und sind insgesamt oft kürzer als 150 Basenpaare. Befinden sich Mikrosatelliten in DNA-Abschnitten, deren Sequenz bekannt ist, sogenannter sequenz-markierter Stellen (*sequence-tagged-sites*, STSs), lassen sich daraus Marker konstruieren. Diese Mikrosatellitenmarker (Abb. 2.2. und 2.3.) stellen durch ihren ausgeprägten Polymorphismus ein wichtiges genetisches Markersystem dar (PASSARGE, 1994).

```

1  agctccaaag ttacataatg catcctcgtt aattaaCA CACACACACA CACACACACA
61 CACACACACA CACACACAga aaagcctggt tccaaatctt taaaccttgg gctnagatgt
121 acaaatctga agatatgctc caaagaaata acctggctgg gtgtggtgct cacgcctgca atcccagcat
191 tttgggagac cgagggggat ggatcactn aggttcgaga ccagcctggc caacatgggtg aaaccccgctc
261 tctactnaaa atacaaaaat tagccgggcg tggtggtgca cacctgtaat nccagct

```

Abb. 2.2: Sequenz des Mikrosatellitenmarkers D17S1813 - Für die Amplifikation mittels PCR werden die unterstrichenen Sequenzbereiche als Primer verwendet.

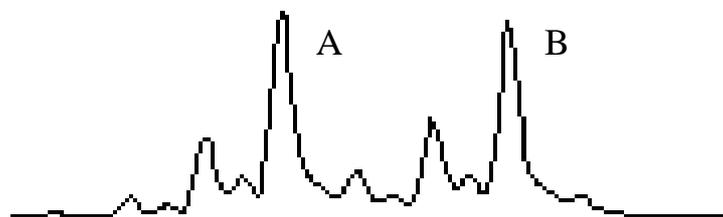


Abb. 2.3: Darstellung eines Mikrosatellitenmarkers (D17S789), der unter Anwendung der PCR-Technik amplifiziert wurde - Die Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer ermöglicht die Detektion mit Hilfe automatisierter Verfahren (hier mittels ABI-373 Sequenzierautomaten). Die beiden Hauptspitzen (peaks) entsprechen dem maternalem und dem paternalem Allel (**A** und **B**). Die links davon befindlichen, kleineren Nebenspitzen sind Pseudoallele, die dadurch entstehen, daß die Taq-Polymerase bei der PCR Fehler bei der Amplifikation der repetitiven Sequenz macht.

2.1.3. Intrazellulärer Proteintransport

2.1.3.1. Aktiver Transport karyophiler Proteine in den Zellkern

Der Transport von Molekülen zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma erfolgt durch nukleäre Poren (*nuclear pore complex*, NPC), das sind komplexe Proteinstrukturen in der Zellplasma-Membran, die aus 60 bis 100 Proteinen bestehen und ein Molekulargewicht von ca. 1.24×10^8 D besitzen (AKEY, 1989; REICHELDT et al., 1990). Während kleine Moleküle bis zu 70 kD und Ionen die Poren mittels Diffusion frei passieren können, stellt der Transport größerer Moleküle und der meisten nukleären Proteine einen energieabhängigen Prozeß dar (PAINE et al., 1975). Der aktive Import karyophiler Proteine in den Zellkern bedingt das Vorhandensein kurzer Aminosäuresequenzen, sogenannter *nuclear localisation signals* (NLS), und erfolgt in mindestens zwei Schritten (AKAY und GOLDFARB, 1989; NEWMAYER und FORBES, 1988). Der erste Schritt besteht aus einem energieunabhängigen Anlagern des Substrates an nukleäre Rezeptoren und der zweite, energieverbrauchende Schritt ist die Translokation des Molekül-Rezeptor-Komplexes durch die nukleären Poren (RICHARDSON et al., 1991). Das am besten charakterisierte NLS besteht aus einer kurzen Abfolge basischer Aminosäuren, die in einfacher Form (**PKKKRKV**), zum Beispiel im Tumor-Antigen des Affen-Sarkom-Virus (SV40), oder in geteilter Form (**KRPAATKKAGQAKKK**), zum Beispiel im Nucleoplasmin, vorkommt (DINGWALL und LASKEY, 1991). In den letzten Jahren wurden weitere Signalvarianten identifiziert, so zum Beispiel die NLSs von *c-myc* (MAKKERH et al., 1996), einem Onkogen, das beim Burkitt-Lymphom eine zentrale Rolle spielt, oder das *NP-Protein* des Influenza-Virus (WANG et al., 1997).

Die Erkennung der NLS-Motive im Cytoplasma und die nachfolgende Anlagerung der zu transportierenden Proteine an die Kernmembranoberfläche wird durch einen Proteinkomplex gewährleistet, der aus zwei Untereinheiten besteht. Die α -Untereinheit (*Karyopherin- α* / *Importin- α*) besitzt ein Molekulargewicht von ca. 50-60 kD und gehört zu einer großen Proteinfamilie, die für die direkte NLS-Erkennung und -Anlagerung verantwortlich ist und bei verschiedenen Spezies identifiziert wurde (Tab. 2.1., S. 13). Die β -Untereinheit (*Karyopherin- β* / *Importin- β*) ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 97 kD und ist verantwortlich für die Interaktion des Substrat-NLS-Rezeptor-Komplexes mit dem NPC (CHI et al., 1995; GÖRLICH et al., 1995; MOROIANU et al., 1995).

Die direkte Bindung an Proteine des NPC wurde nachgewiesen (RADU et al., 1995 a). Dieser β -Faktor wurde ebenfalls bei verschiedenen Spezies charakterisiert (Tab. 2.1.).

Tab. 2.1: Aufstellung der bekannten Importin α - und β -Homologe mit Einordnung in vorhandene Subfamilien, Spezieszugehörigkeit, fortlaufender Nummerierung, genauer Bezeichnung und Referenz

Importin-Familie	Importin-Subfamilie	Spezies	Nr.	Bezeichnung	Referenz
Alpha-Untereinheit	SRP1-ähnlich	Homo sapiens	1	SRP1; NPI-1	Cortes et al., 1994 O'Neill et al., 1995
			2	Importin- α 6	Köhler et al., 1997
		Mus musculus	3	SRP1; α -S1	Weis et al., 1995
			4	m-importin α -S2	Tsuji et al., 1997
		Saccharomyces cerevisiae	5	SRP1	Yano et al., 1992
		Arabidopsis thaliana	6	T10M13.16	Köhler et al., 1997
			7	KAP- α , alMP α	Hicks et al., 1996
	Qip1-ähnlich	Homo sapiens	8	Qip1	Seki et al., 1997
			9	Importin- α 4	Köhler et al., 1997
		Mus musculus	10	m-importin α -Q1	Tsuji et al., 1997
			11	m-importin α -Q2	Tsuji et al., 1997
		Caenorhabditis elegans	12	F12E10.4	Köhler et al., 1997
	Rch1-ähnlich	Homo sapiens	13	Rch1; hSRP1 α	Cuomo et al., 1994 Weis et al., 1995
		Mus musculus	14	m-pendulin, α -P1	Imamoto et al., 1995
		Xenopus levis	15	importin α	Görlich et al., 1994
		Drosophila melanogaster	16	OHO31	Török et al., 1995
			17	pendulin	Küssel und Frasch, 1995
	sonstige	Homo sapiens	18	hSRP1 γ	Nachury et al., 1998
		Caenorhabditis elegans	19	F16B1.3	Köhler et al., 1997
			20	T19B10.7	Köhler et al., 1997
Beta-Untereinheit		Homo sapiens	1	Karyopherin β	Radu et al., 1995b
		Xenopus levis	2	Importin β	Görlich et al., 1995a
		Homo sapiens	3	p97	Adam und Adam, 1994; Chi et al., 1995
		Mus musculus	4	PTAC 97	Imamoto et al., 1995
			5	Kap95p	Enenkel et al., 1995

Für den Transport des Protein-Rezeptor-Komplexes durch den NPC sind zwei weitere Faktoren notwendig. Zum einen die GTPase *Ran*, die durch die Hydrolyse von Guanosintriphosphat (GTP) die notwendige Energie bereitstellt (MOORE und BLOBEL, 1993; MELCHIOR et al., 1993) und zum anderen ein Protein namens *p10* oder NTF2 (*nuclear transport factor 2*), das als Katalysator für die GTP-Hydrolyse wirkt (MOORE und BLOBEL, 1994; PASCHAL und GERACE, 1995).

Ein charakteristisches Merkmal des Ran-Systems ist eine asymmetrische Verteilung der Komponenten in der Zelle. Ran liegt im Zellkern in relativ hoher Konzentration vor (BISCHOFF und POSTINGL, 1991). Das chromatingebundene Enzym RCC1 (*regulator of chromosome condensation 1*) (OHTSUBO et al., 1989) ist für die Umwandlung von GDP in GTP verantwortlich und bedingt dadurch einen intranukleären Konzentrationsanstieg von Ran-GTP (BISCHOFF und POSTINGL, 1991). Im Gegensatz dazu befinden sich das RanGTPase-aktivierende Enzym RanGAP1 (*GTPase-activating protein*) (FLOER und BLOBEL, 1996) und das diesen Prozeß katalysierende RanBP1 (*Ran-binding protein*) (BISCHOFF et al., 1995; COUTAVAS et al., 1993; RICHARDS et al., 1995) im Cytoplasma (HOPPER et al., 1990; RICHARDS et al., 1996) und führen dort zu einer erheblichen Verringerung der Ran-GTP Konzentration. Ran-GTP geht eine spezifische Bindung mit Importin β ein (CHI et al., 1996; PASCHAL et al., 1996), was im Zellkern zu einer Spaltung der Importin α - β -Verbindung führt (GÖRLICH et al., 1996; REXACH und BLOBEL, 1995), die wahrscheinlich durch eine Konformationsänderung des Importin β hervorgerufen wird (KUTAY et al., 1997). Da das abgespaltene Importin α seine hohe Affinität zum NLS verliert (GÖRLICH et al., 1996; REXACH und BLOBEL, 1995), wird letztendlich auch die Protein-Importin Bindung gelöst.

Der Proteinimport endet somit mit der Spaltung des Substrat-Rezeptor-Komplexes, wobei das importierte Molekül im Nukleoplasma verbleibt (GÖRLICH et al., 1996) und die beiden Importin-Untereinheiten ins Cytoplasma zurücktransportiert werden müssen (vgl. Kap. 2.1.3.3., S. 17). Eine Zusammenfassung des importinabhängigen Transportes karyophiler Proteine in den Zellkern ist in der Abbildung 2.4. auf der Seite 16 graphisch dargestellt.

2.1.3.2. Rücktransport der Rezeptoren ins Cytoplasma

Nach Spaltung des Substrat-Rezeptor-Komplexes gelangen die beiden Importin-Untereinheiten getrennt voneinander zurück ins Cytoplasma (GÖRLICH et al., 1996; WEIS et al., 1996). Für den separaten Rücktransport gibt es mehrere Hinweise. Zum einen wird Importin β schneller als Importin α re-exportiert (GÖRLICH et al., 1995; MOROIANU et al., 1995). Zum anderen wird der aminoternale Abschnitt des Importin α , der für die Bindung mit dem Importin β notwendig ist, zwar für den Transport in den Zellkern benötigt, jedoch nicht für den Rücktransport ins Cytoplasma (GÖRLICH et al., 1996; WEIS et al., 1996). Außerdem wird eine erneute stabile Bindung der Importin α - mit der β -Untereinheit durch die hohe intranukleäre RanGTP-Konzentration verhindert. Der Importin α - Rücktransport ist im Gegensatz zur Importin β - Ausschleusung nicht von einer relativ hohen RanGTP-Konzentration im Zellkern abhängig (KOEPP et al., 1996; GÖRLICH et al., 1997). Sowohl die α - als auch die β -Untereinheit werden in Form eines Importin-Ran-GTP Komplexes aus dem Nukleus ausgeschleust, wobei für den Importin α -Export ein weiteres Protein namens CAS (*Cellular Apoptosis Susceptibility gene*), welches ursprünglich mit der Apoptose und Zellproliferation in Zusammenhang gebracht wurde (BRINKMANN et al., 1995 und 1996), notwendig ist (KUTAY et al., 1997 a). Im Cytoplasma wird das GTP durch die Anwesenheit des GTPase aktivierenden Proteins (RanGAP1) und des RanBP1 zu GDP hydrolysiert, was zu einer Freisetzung der jeweiligen Importin-Untereinheit führt (GÖRLICH et al., 1996; KUTAY et al., 1997 b; LOUNSBURY und MACARA, 1997) und die Rezeptoren für einen erneuten Proteintransport zur Verfügung stellt. Die Abbildung 2.4. auf der Seite 16 stellt unter anderem eine Zusammenfassung der Vorgänge des Importinrücktransportes in das Cytoplasma dar.

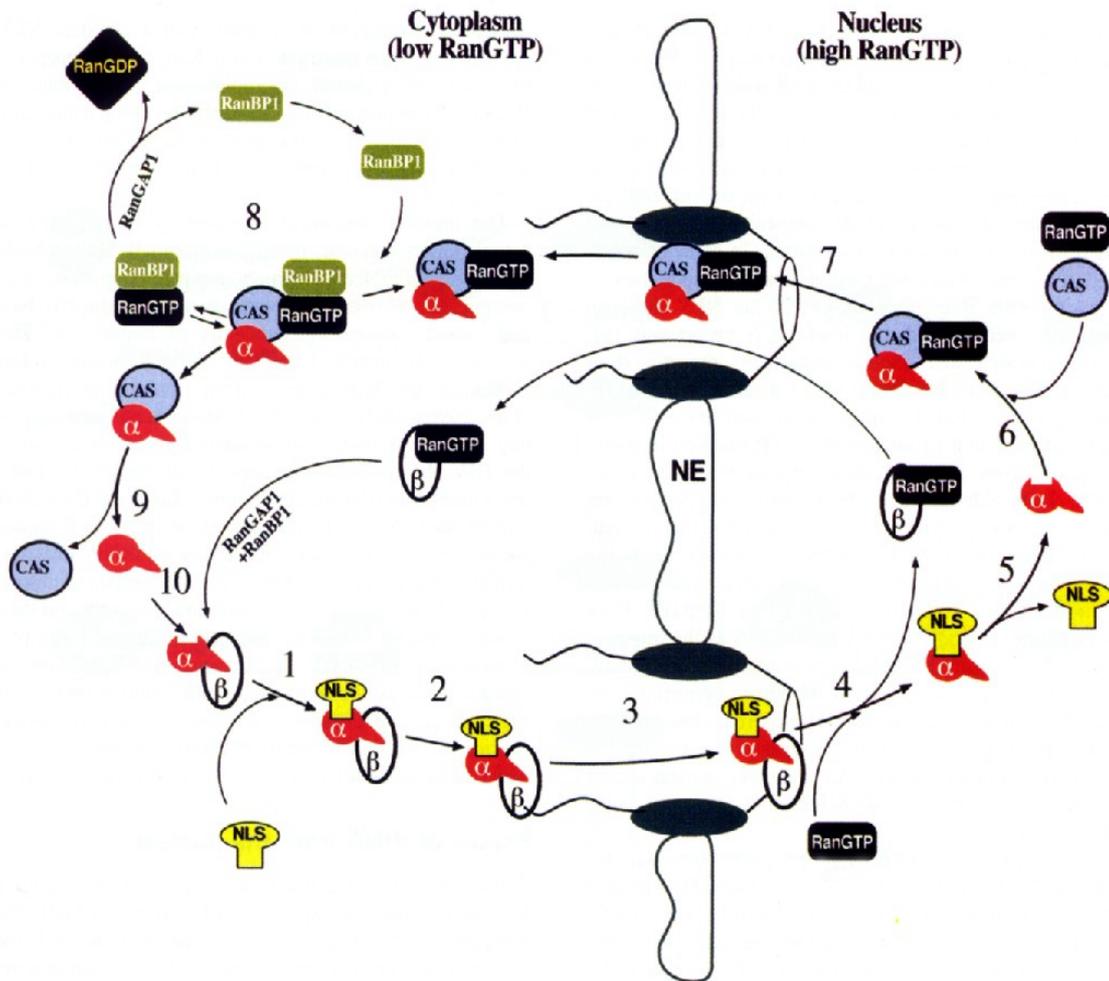


Abb. 2.4: Darstellung des Importin α/β -vermittelten Transportes karyophiler Proteine vom Cytoplasma in den Zellkern (in Anlehnung an GÖRLICH, 1998)

(1) Der erste Schritt ist die Anlagerung des Proteins über dessen NLS an die α -Untereinheit des Importin α/β -Heterodimers. (2) Der Importin-Substrat-Komplex verbindet sich über die β -Untereinheit mit einem cytoplasmatischen Rezeptor des NPC. (3) Bedingt durch die relativ hohe intranukleäre RanGTP-Konzentration erfolgt der Transport des Heterotrimeres durch den NPC in den Zellkern. (4) Die Trennung der Importin α - β -Bindung erfolgt durch ein direktes Anlagern von RanGTP an die α -Untereinheit, (5) in dessen Folge sich schließlich auch die Importin α /Protein-Verbindung löst. (6) Importin α wird in Form eines RanGTP/CAS/Importin α -Komplexes gebunden und (7) in diesem Zustand aus dem Zellkern zurück ins Cytoplasma transportiert. (8) Im Cytoplasma verursacht RanBP1 die Dissoziation von RanGTP vom RanGTP/CAS/Importin α -Komplex. Die Irreversibilität dieser Reaktion ist durch die RanGAP1 bedingte GTP-Hydrolyse bedingt. (9) Infolge des Verlustes des RanGTP verliert das CAS seine hohe Affinität zum Importin α , was letztendlich zu einer Spaltung der CAS/Importin α -Bindung führt. (10) Das freie Importin α bildet mit dem ebenfalls durch RanGTP ins Cytoplasma zurücktransportierte Importin β erneut ein Heterodimer, welches die Voraussetzung für einen neuen intranukleären Proteintransport darstellt.

2.1.3.3. Bedeutung und Aufbau des Karyopherin Alpha 2 Gens

Das KPNA2-Gen transkribiert eine mRNA mit einer Länge von ca. 2 kb, wobei nur die Nukleotide 133 bis 1722 translatiert werden. Es kodiert ein 529 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von 57.8 kD (WEIS et al., 1995; CUOMO et al., 1994). Dieses Eiweiß, welches als hSRP1 α (WEIS et al., 1995) oder Rch1 (CUOMO et al., 1994) bezeichnet wird, gehört zu einer großen Proteinfamilie, deren Mitglieder für die direkte NLS-Erkennung und –Anlagerung verantwortlich sind (vgl. Kap. 2.1.3.1., S. 12) und bei verschiedenen Spezies identifiziert wurden (Tab. 2.1., S. 13). Die Importin α -Homologe besitzen prinzipiell den gleichen Aufbau und bestehen auf Proteinebene aus einer hydrophilen N-terminalen Region, einer hydrophoben zentralen Region und einer kurzen hydrophilen C-terminalen Region. In der N-terminalen Region befindet sich die hoch konservierte Importin- β bindende Domäne (*IBB domain*), die zum Beispiel beim hSRP1 α / Rch1 die ersten 65, vorwiegend basischen, Aminosäuren umfaßt (WEIS et al., 1996). Die IBB-Domäne ist sowohl für die Bindung des NLS-Importin- α -Komplexes an die Importin β -Untereinheit als auch für den nukleären Proteintransport notwendig (GÖRLICH et al., 1996; WEIS et al., 1996). Die zentrale Region enthält Sequenzwiederholungen des „Arm Motivs“, das zuerst im *Drosophila armadillo* Gen identifiziert wurde (RIGGLEMAN et al., 1989). Im hSRP1 α / Rch1 befindet sich die Region zwischen den Aminosäuren 112 und 455 und ist durch acht Wiederholungen des 43 Aminosäuren umfassenden Motivs gekennzeichnet (PFEIFER et al., 1994; YANO et al., 1994).

2.1.4. Physikalische Kartierung

Die Kenntnis der chromosomalen Lokalisation eines Gens ist eine der Voraussetzungen für die genetische Diagnostik und besitzt somit unmittelbare medizinische Bedeutung (PASSARGE, 1994). Die Feststellung der chromosomalen Lage von Genloci (Genkartierung) verfolgt zwei prinzipielle Ziele (STRACHAN und READ, 1996):

1. Es werden die Grundlagen für die Analyse der Funktion von Genen hinsichtlich ihrer biologischen Bedeutung (z.B. Tumorentstehung) geschaffen.
2. Die Genkarten ermöglichen den Vergleich des Genoms und homologer Gene bei verschiedenen Organismen zur Aufklärung evolutionärer Beziehungen.

Die Zuordnung eines DNA-Fragmentes zu einem bestimmten Chromosom geschieht häufig unter Verwendung somatischer Hybridzellen, die aus der Fusion von Zellen menschlicher Herkunft und Nagetierzellen entstehen und als Ergebnis in der Regel mehrere Chromosomen des Menschen enthalten (ABBOTT und POVEY, 1991).

Das *Human Genome Project* ist ein internationales Vorhaben, dessen Ziel die vollständige Beschreibung des Genoms des Menschen mit Hilfe der DNA-Sequenzierung ist (ENGEL, 1993; OLSON, 1993). Die Isolierung von Klonen, die DNA des Genoms und cDNA enthalten, ist der erste Schritt zur Konstruktion hochauflösender genetischer und physikalischer Karten, die wiederum die Grundlage für die endgültige Karte, die vollständige Sequenz des Genoms, bilden. Die DNA-Fragmente werden durch partielle Spaltung von genomischer DNA mittels chemischer (Restriktionsendonucleasen) oder physikalischer Methoden erzeugt und in Bakterien (*E. coli*) kloniert und besitzen, je nach verwendetem Klonierungsvektor, verschiedene Größen (Tab. 2.2.). Mit Hilfe der PCR-Technik (vgl. Kap. 2.1.5., S. 19) und unter Verwendung von Markern aus sequenzmarkierten Stellen (STS-Marker) können sogenannte Klon-Contigs erstellt werden (PASSARGE, 1994). Ein Klon-Contig besteht aus einer linearen Folge von DNA-Klonen mit überlappenden Insertionsfragmenten.

Tab. 2.2: Zur Klonierung von DNA-Fragmenten verwendete Vektoren mit Angaben zur Größe der Fragmente in Anlehnung an STRACHAN und READ (1996)

Klonierungsvektor	Größe der klonierbaren DNA in Kilobasen
übliche Plasmide mit hoher Kopienzahl	bis 10
Insertionsvektor des Bakteriophagen λ	bis 10
Cosmide	30 bis 44
Bakteriophage P1	70 bis 100
PAC (künstliches P1-Chromosom)	130 bis 150
BAC (künstliches Bakterienchromosom)	bis 300
YAC (künstliches Hefechromosom)	200 bis 2000 (enthalten oft Fragmente von unterschiedlichen Chromosomen)

Zur Konstruktion genomischer DNA-Banken, aus denen sich mittels verschiedener Screening-Verfahren Klon-Contigs erstellen lassen, werden die DNA-Fragmente vorwiegend in künstlichen Hefechromosomen (*yeast artificial chromosomes*, YACs) (SCHLESSINGER, 1990), künstlichen Bakterienchromosomen (*bacterial artificial chromosomes*, BACs) (SHIZUYA et al., 1992) oder Bakteriophagen P1-abgeleiteten künstlichen Chromosomen (*P1 artificial chromosomes*, PACs) (STERNBERG, 1992; IOUANNOU et al., 1994; IOUANNOU und de Jong, 1996) kloniert.

2.1.5. Polymerasekettenreaktion (PCR) und DNA-Sequenzierung

1985 entwickelte *Kary Mullis* die Methode der **Polymerasekettenreaktion (PCR)** (SAIKI et al., 1985) und erhielt dafür 1993 den Nobelpreis für Chemie. Die PCR ist eine *in vitro*-Methode der Nukleinsäuresynthese, mit der man definierte Ziel-DNA-Sequenzen eines bestimmten Ausgangsmaterials schnell und selektiv vervielfältigen kann (MULLIS et al., 1986; MULLIS und FALOONA, 1987; MULLIS, 1990).

Für die Konstruktion zweier Oligonukleotidprimer benötigt man Sequenzinformationen über den Ziel-DNA-Bereich. Wenn man diese 15-30 Nukleotide-umfassenden Primer zu einer denaturierten DNA gibt, binden sie spezifisch an komplementäre Sequenzen, die die gesuchte DNA-Region einrahmen. Beim Vorhandensein einer hitzestabilen DNA-Polymerase sowie der vier Desoxynucleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP kann die Synthese neuer DNA-Stränge starten. Die synthetisierten DNA-Stränge sind dabei komplementär zu den einzelnen Strängen der gesuchten Ziel-Sequenz. Die PCR ist eine Kettenreaktion, bei der die neu synthetisierten DNA-Stränge in den folgenden Zyklen als Matrize dienen. In 30 Zyklen werden zusätzlich zur Ausgangs-DNA etwa 10^5 Kopien der speziellen Ziel-DNA synthetisiert. Die Reaktion besteht aus 20-40 aufeinanderfolgenden Zyklen mit jeweils 3 Schritten:

1. Trennung der DNA-Stränge durch Erhitzen auf 93-95°C
2. Spezifisches Anlagern der Primer durch Abkühlung auf 50-70°C;

Die Temperatur ist von der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer abhängig, die sich nach folgender Gleichung berechnen läßt:

$$[(\text{Anzahl von A+T}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{Anzahl von G+C}) \times 4^\circ\text{C}] \text{ (SUGGS et al., 1981).}$$

3. DNA-Synthese durch Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase bei einer Temperatur von etwa 70-75°C - Die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (SAIKI et al., 1988) wird am häufigsten für die PCR verwendet.

In früherer Zeit verwendete man für die **DNA-Sequenzierung** häufig chemische Verfahren (Maxam-Gilbert-Technik), die auf einer basenspezifischen Modifikation und der anschließenden Spaltung der DNA beruhen (MAXAM und GILBERT, 1977). Heutzutage erfolgt die DNA-Sequenzierung häufig mit Hilfe einer enzymatischen DNA-Synthese (Sanger-Methode) in Gegenwart basenspezifischer Didesoxynucleotide, die einen Kettenabbruch bewirken (SANGER et al., 1977). Die synthetisierten Einzelstränge unterschiedlicher Länge werden auf denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mittels unterschiedlicher Detektionsverfahren analysiert. Dabei kommen immer häufiger Fluoreszenzmarkierungsverfahren (Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxynucleotide oder fluoreszierender Primer) und automatisierte Nachweissysteme (Sequenzierautomaten) zum Einsatz (WILSON et al., 1990).

2.2. Tumorgenetische Grundlagen

2.2.1. Kolorektales Karzinom

2.2.1.1. Vorkommen und Bedeutung

Das kolorektale Karzinom ist die häufigste Todesursache unter Nichtrauchern in westlichen Industriestaaten. Bei einer steigenden Inzidenz besteht gegenwärtig eine 5-Jahres-Überlebenszeit von unter 40 % (SCHERNECK und KÖLBLE, 1998). Dickdarmkrebs tritt in den meisten Fällen sporadisch auf, wenngleich eine Reihe genetischer Syndrome mit überwiegend autosomal-dominantem Erbgang beschrieben wurden, deren Ursachen zu kolorektalen Karzinomen disponieren.

2.2.1.2. Mehrschrittkanzerogenese beim kolorektalen Karzinom

Das Spektrum der molekularen Veränderungen und die Häufung in einzelnen Stadien der Tumorentwicklung haben zu einem Modell der Mehrschrittkanzerogenese beim kolorektalen Karzinom geführt (FEARON und VOGELSTEIN, 1990). Danach reicht der konstitutionelle Verlust einer Kopie des APC-Gens (GRODEN et al., 1991; JOSLYN et al., 1991) auf dem Chromosom 5q21 durch eine somatische oder eine germinale Mutation aus, um im Dickdarm proliferative Epithelveränderungen entstehen zu lassen. Der Übergang zum Adenom geht mit dem Auftreten von Deletionen in dieser Region und somit mit dem Verlust des zweiten funktionsfähigen Allels einher (ICHII et al., 1992).

An der Weiterentwicklung von frühen zu intermediären und späten Adenomen sind möglicherweise *K-ras*-Mutationen beteiligt. Das auf dem Chromosom 12p12.1 lokalisierte *K-ras-2*-Onkogen weist in etwa 50 % der größeren Adenome aktivierende Punktmutationen auf. In frühen, unter 10 mm messenden Adenomen konnten ähnliche Mutationen hingegen nur in 9 % der Fälle identifiziert werden (BOS et al., 1987; VOGELSTEIN et al., 1988).

Ungefähr 50 % der späten Adenome und Karzinome zeigen einen Heterozygotieverlust (vgl. Kap. 2.2.2.2.2., S. 24) auf dem Chromosom 18q, was auf die weitere Beteiligung eines Tumorsuppressorgens in dieser Region an der Tumorprogression hindeutet. Ein mögliches Zielgen ist das auf 18q21 befindliche DCC (*deleted in colon cancer*)-Gen (FEARON et al., 1990). Es codiert ein Protein, das Homologien mit an der Zelladhäsion beteiligten Zelloberflächenglykoproteinen aufweist.

Da unmittelbar proximal des DCC-Gens ein weiteres Tumorsuppressorgen namens DPC4 (*deleted in pancreatic carcinoma, locus 4*) identifiziert wurde (HAHN et al., 1996), ist bislang nicht eindeutig geklärt, ob DCC das einzige relevante Zielgen dieser Region ist (THIAGALINGAM, 1996).

Eine weitere, offenbar für spätere Stadien der Tumorentwicklung bedeutsame Verlustregion befindet sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (VOGELSTEIN et al., 1989). Kolorektale Karzinome, nicht jedoch Adenome, weisen sehr häufig Mutationen in dem auf 17p13 befindlichen *TP53*-Gen auf (BAKER et al., 1989).

Die Zahl der unabhängigen Schritte im Laufe der Tumorprogression dürfte nach neueren Erkenntnissen von Heterozygotiestudien mit einer großen Anzahl von Markern aber noch deutlich höher liegen (BOLAND et al., 1995).

2.2.1.3. Erblich bedingte Formen des Dickdarmkrebses

2.2.1.3.1. Hereditäres kolorektales Karzinom ohne Polyposis (HNPCC)

Das hereditäre kolorektales Karzinom ohne Polyposis (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*, HNPCC) ist wahrscheinlich das häufigste erbliche Syndrom mit gesteigerter Karzinomsuszeptibilität (SCHERNECK und KÖLBLE, 1998). Nach Schätzungen sind 3-15 % der sporadischen Kolonkarzinome auf dieses Syndrom zurückzuführen (LYNCH et al., 1993). Der Erbgang ist autosomal-dominant mit einer geschätzten Penetranz von 70-80 %.

2.2.1.3.1.1. Reparatur-Mutator-Gene und Mikrosatelliteninstabilität

Bei Untersuchungen von HNPCC-Tumoren mit Mikrosatellitenmarkern wurden erstmals längenveränderte Amplifikate, im Vergleich zur konstitutionellen DNA, nachgewiesen (PEINADO et al., 1992; IONOV et al., 1993). Sowohl Mono-, Di-, Tri-, und Tetranukleotidsequenzen als auch höhergradige und komplexe Mikrosatelliten sind in Abweichung von ihrer individuellen Allelkonstellation expandiert (größeres zusätzliches Allel), kontrahiert (kleineres zusätzliches Allel) oder kombiniert verändert (THIBODEAU et al., 1993). Dieses Phänomen des Auftretens zusätzlicher, neuer Allele in Tumorproben wird auch als **Mikrosatelliteninstabilität** (MIN) bezeichnet.

Das MIN-Phänomen wird auf nicht korrigierte Basenfehlpaarungen (speziell ungepaarte, kurzstreckige Einzelstrangschleifen, die bevorzugt im Bereich repetetiver Sequenzen durch sogenannten Polymeraseschlupf entstehen), die während der DNA-Verdopplung vor der Mitose auftreten und normalerweise durch ein DNA-Fehlpaarungskorrektursystem (*mismatch repair system*) berichtigt werden, zurückgeführt (FISHEL et al., 1993; FISHEL und KOLODNER, 1995; KUNKEL, 1993). Dieses multimolekulare Reparatursystem wurde zuerst in *E. coli* beschrieben und besteht aus einem Erkennungsprotein (*MutS*), einer Endonuklease (*MutH*), einem komplexierenden Protein (*MutL*), einer DNA-Helicase (*MutU*), einem Einzelstrang-bindenden Protein, sowie zwei Exonukleasen (MODRICH, 1991). Die auch als **Reparatur-Mutator-Gene** bezeichneten Fehlpaarungsreparaturgene wurden beim Menschen auf den Chromosomen 2p22-p21 (*MSH2*), 3p21.3 (*MLH1*), 2q31 (*PMS1*), 7p22 (*PMS2*) und 2p15 (*GTBP*) identifiziert. In diesen Genen konnten Keimbahnmutationen bei HNPCC-Patienten bzw. Patienten mit genomisch instabilen Tumoren nachgewiesen werden (FISHEL et al., 1993; LEACH et al., 1993; BRONNER et al., 1994; NICOLAIDES et al., 1994; PALOMBO et al., 1995; PAPADOPOULOS et al., 1994). Sie spielen demzufolge eine allgemeine Rolle beim Schutz der Integrität der genetischen Information und unterscheiden sich somit grundsätzlich von den, direkt an der Zellzykluskontrolle beteiligten, Onko- und Tumorsuppressorgenen.

2.2.1.3.1.2. Zielgene genomischer Instabilität

Im Gegensatz zu den Mikrosatellitenmarkern besitzen Längenvariationen kurzer repetitiver Elemente in der kodierenden Sequenz von Genen direkte biologische Bedeutung. So führt der Verlust einer Base zur Verschiebung des Leserahmens, was in den meisten Fällen ein verkürztes Protein zur Folge hat. Der Nachweis einer längenveränderten (A)₉-Wiederholung im Leseraster des TGFBR-2-(*transforming growth factor β type 2 receptor*) Gens in genomisch instabilen kolorektalen Zelllinien (MARKOWITZ et al., 1995) verdeutlicht die außerordentliche Bedeutung kurzer repetitiver Sequenzen in transkribierten Genabschnitten für die Tumorprogression mikrosatelliteninstabiler Tumoren.

Als weiteres Zielgen genomischer Instabilität wurde das, die Apoptose fördernde, *BAX*-Gen identifiziert. Bei über 50 % der untersuchten mikrosatelliteninstabilen kolorektalen Tumoren wurde eine Längenvariation der zwischen den Codons 38 und 41 befindlichen (G)₈-Wiederholung festgestellt (RAMPINO et al., 1997).

2.2.1.3.2. Familiäre adenomatöse Polypose (FAP)

Die familiäre adenomatöse Polypose ist eine autosomal-dominante Erbkrankheit mit einer Penetranz von nahezu 100% und einer Frequenz von ca. 1/7000. Die betroffenen Patienten entwickeln im Laufe des 2. Lebensjahrzehnts Tausende von Polypen in Kolon und Rectum, die in der Regel in der 4. Dekade karzinomatös entarten (SCHERNECK und KÖLBLE, 1998). Das für diese Erkrankung disponierende APC-Gen wurde mittels Kopplungsanalysen in FAP-Familien auf dem Chromosom 5q22 lokalisiert (LEPPERT et al., 1987) und einige Jahre später isoliert (GRODEN et al., 1991; JOSLYN et al., 1991; KINZLER et al., 1991 a, b; NISHISHO et al., 1991). Es wurden bisher über 250 verschiedene APC-Mutationen beschrieben (BEROUD und SOUSSI, 1996), wobei auch in ca. 50 % der untersuchten sporadischen Kolonkarzinome und Adenome inaktivierende Mutationen in diesem Gen gefunden wurden (POWELL et al., 1992).

2.2.2. Mammakarzinom

2.2.2.1. Vorkommen und Bedeutung

Brustkrebs ist weltweit die häufigste Tumorerkrankung der Frau. Es wird geschätzt, daß jede 12. Frau im Verlauf ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt (CHANG-CLAUDE et al., 1995). Heute gibt es jedoch neben den, ätiologisch zu berücksichtigenden, hormonellen sowie Ernährungs- und Umwelteinflüssen keinen Zweifel mehr am Konzept einer genetischen Basis des Brustkrebses (SCHERNECK und KÖLBLE, 1998).

2.2.2.2. Brustkrebskanzerogenese

2.2.2.2.1. Amplifikation und Überexpression von Onkogenen

Onkogene, die aus Protoonkogenen durch Amplifikation, Translokation oder Punktmutation (vgl. Kap. 2.2.1.2., S. 20) entstehen, erlangen durch diese genetischen Veränderungen einen dominant wirksamen Funktionsgewinn (STRACHAN und READ, 1996).

In Mammakarzinomen häufig amplifizierte und teilweise auch überexprimierte Onkogene sind der Zelloberflächenrezeptor *ERBB2* (17q12), der Transkriptionsfaktor *MYC* (8q24) und das an der Zellzykluskontrolle beteiligte Cyclin *PRADI / CYCLIN D* (11q13) (DEVILEE und CORNELISSE, 1994).

2.2.2.2.2. Heterozygotieverlust und Tumorsuppressorgene

Zu den häufigsten in Mammakarzinomzellen nachweisbaren chromosomalen Veränderungen zählen Makro- oder Mikrodeletionen, die zu Wildtypallelverlusten eines oder mehrerer Gene führen (SCHERNECK und KÖLBLE, 1998). Unter Verwendung von Mikrosatellitenmarkern, die eine Unterscheidung zwischen väterlichen und mütterlichen Chromosomen erlauben, kann der Verlust eines Allels, das in der DNA von Nichttumorzellen (z.B. Lymphozyten oder an den Tumor angrenzendes nichtentartetes Gewebe) vorhanden ist, nachgewiesen werden. Da der Tumorgenotyp nun homozygot bzw. hemizygot für das mutierte Allel ist, spricht man von einem **Heterozygotieverlust** (loss of heterozygosity, LOH). Nach dem 2-Mutationen-Modell von Knudson (KNUDSON, 1987) weisen Heterozygotieverluste auf die chromosomale Lokalisation von Tumorsuppressorgenen hin.

Bei Mammakarzinomen wurden bisher mindestens 12 Chromosomenarme (1p, 3p, 6q, 8p, 11q, 13q, 16q, 17p, 17q, 18q, 22q) identifiziert, die Regionen mit LOH-Frequenzen von über 25 % bis fast 60 % aufweisen (DEVILLEE und CORNELISSE, 1994). Auf dem Chromosom 17 wurden zum Beispiel 2 LOH-Regionen auf dem kurzen und 4 auf dem langen Arm charakterisiert (BIECHE und LIDEREAU, 1995).

2.2.2.3. Erbliche Disposition zu Brustkrebs

Trotz einer leichten Tendenz der familiären Häufung, besonders bei Erkrankungen in ungewöhnlich frühem Alter, konnten nur 4-5 % der Brustkrebsfälle von 1500 mittels Segregationsanalyse untersuchten Familien erblichen Faktoren zugeschrieben werden (NEWMAN et al., 1988). Nach Untersuchungen von Familien mit nahezu Mendelschen Stammbäumen mit Hilfe von Kopplungsanalysen wurde 1990 ein Anfälligkeitslocus auf 17q21 beschrieben (HALL et al., 1990) und Ende 1994 das BRCA1-Gen isoliert (MIKI et al., 1994). Bisher sind mehr als 75 verschiedene Mutationen in mehr als 100 Familien beschrieben worden (SZABO und KING, 1995; FEUNTEUN und LENOIR, 1996; NEUHAUSEN et al., 1996 a).

Auf dem Chromosom 13q12-13 wurde schließlich ein zweites, für Brustkrebs disponierendes Gen, das BRCA2, kartiert und positionell kloniert (WOOSTER et al., 1994; WOOSTER et al., 1995). Bisherige Untersuchungen ergaben mehr als 20 verschiedene BRCA2-Mutationen in ca. 100 Familien (COUCH et al., 1996; COUCH und WEBER, 1996; NEUHAUSEN et al., 1996b; PHELAN et al., 1996; TAVTEGIAN et al., 1996; THORLACIUS et al., 1996).

2.2.3. Tumorgenetische Untersuchungen in der Region 17q23

Auf dem langen Arm von Chromosom 17 wurden eine Reihe gesicherter bzw. vermuteter Tumorsuppressorgene beschrieben, so z. B. *NME1* (VARESCO et al., 1992) und *NME2* (BACKER et al., 1993; CHANDRASEKHARAPPA et al., 1993) auf 17q21, *NF1* (CAWTHON et al., 1990; XU et al., 1990 a, b) auf 17q11.2 und *BRCA1* (HALL et al., 1990) auf 17q21.

LEGGETT et al. (1994) identifizierten bei der LOH-Untersuchung von 72 kolorektalen Karzinomen eine Verlustregion auf 17q22-23 mit einer LOH-Rate von über 50 %. Als kleinste überlappende Verlustregion wird ein Bereich angegeben, der den Mikrosatellitenmarker D17S40 enthält.

BÄRLUND et al. (1997) untersuchten 14 Brustkrebszelllinien mittels CGH (comparative genome hybridisation) und FISH (fluorescence in situ hybridisation) und beschrieben zwei separate Regionen auf 17q23, die in 43 % (CGH) bzw. 50 % (FISH) hochgradig amplifiziert vorlagen. Diese Bereiche lassen sich durch ca. 5 Mb nicht amplifizierter DNA voneinander trennen.

2.2.4. OHO31-ein Tumorsuppressorgen bei *Drosophila melanogaster*

Das Tumorsuppressorgen OHO31 (*overgrown hematopoietic organs 31*) ist entwicklungs-geschichtlich gesehen von den bisher bekannten Importin- α Homologen (Tab. 2.1., S. 13) am nächsten mit dem *Importin- α* von *Xenopus levis* (GÖRLICH et al., 1994), dem *Pendulin* von *Mus musculus* (IMAMOTO et al., 1995) und schließlich mit dem *RCH1/SRP1 α* von *Homo sapiens* verwandt (KÖHLER et al., 1997). Eine deutliche Reduzierung der Expression von OHO31 durch das Einfügen eines beweglichen genetischen Elementes (P-Element) in die 5'-untranslatierte Region des Transkriptes bzw. eine komplette Inaktivierung des Genes durch das ungenaue Entfernen des P-Elementes führt bei *Drosophila melanogaster* zur tumorösen Entartung der blutbildenden Organe und der Genitalanlage. Die zellzyklusabhängige Akkumulation des OHO31-Proteins im Zellkern (Anstieg in später Interphase und Prophase) und die enorme Ähnlichkeit zu Proteinen, deren Funktion als Rezeptoren beim intranukleären Proteintransport bereits bekannt sind (vgl. Kap. 2.1.3., S. 12), läßt vermuten, daß OHO31 eine direkte Rolle bei der Regulation der Zellteilung spielt (TÖRÖK et al., 1995). OHO31 ist somit das erste Tumorsuppressorgen, das in den nukleären Proteinimport involviert ist.