

Marcus Frohme
Dr. sc. hum.

**Kartierung pathogener Mikroorganismen mit Cosmiden und
Repräsentative Differenz Analyse pathophysiologischer Zustände**
Methoden zur strukturellen und funktionellen Genomanalyse

Geboren am 25. Juli 1967 in Hannover
Reifeprüfung am 5. 6. 1986
Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1988/89-1995
Vordiplom am 10. 10. 1990 an der Universität Heidelberg
Diplom am 9. 3. 1995 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktorvater: PD Dr. med. Thomas Dandekar

Für zwei pathogene Organismen wurden als Beitrag zur strukturellen Genomanalyse Cosmidbibliotheken und Hybridisierungskarten angefertigt, die als Grundlage für weitergehende Untersuchungen in den jeweiligen Genomprojekten genutzt werden. Im Rahmen der *Trypanosoma cruzi* Genominitiative wurde das Chromosom IV [1], und als Basis für die Sequenzierung von *Xylella fastidiosa* dessen gesamtes Genom kartiert [2]. *T. cruzi* ist ein Flagellat, der nach Übertragung durch Raubwanzen die Chagas-Krankheit hervorruft, welche vor allem unter den ärmeren Bevölkerungsschichten in Südamerika eines der schwerwiegendsten medizinischen Probleme darstellt. *Xylella f.* ist ein im Xylem vom Pflanzen lebendes Bakterium. Es verursacht in Südamerika durch den Befall von Orangenbäume die Krankheit CVC (*citrus variegated chlorosis*), was zu millionenschweren Ernteverlusten führt. Aus den Genomprojekten erhofft man sich neue Erkenntnisse, die zur Lösung der beschriebenen Probleme beitragen können. Ein weiterer positiver Aspekt beider Projekte war ein erheblicher Technologietransfer nach Südamerika zur Etablierung der entsprechenden Methoden vor Ort.

Für die Generierung der chromosomenspezifischen *T. cruzi* Klon-Bibliothek musste zunächst eine entsprechende Methodik etabliert werden. Die Cosmidkarten wurden durch Klon-Hybridisierungen auf Membranen erzeugt, die teilweise mit Robotern hergestellt wurden [3]. Mit verschiedenen Techniken wurden die Karten dann verfeinert, um möglichst alle Lücken zu schließen. Hierbei wurden andere Klon-Bibliotheken sowie Hybridisierungen von großen genomischen Fragmenten eingesetzt und eine subtraktive Hybridisierungstechnik entwickelt. Die *T. cruzi* Chromsomen IV Karte soll die Basis für die inzwischen begonnene Sequenzierung des Chromosoms bilden. Im Rahmen des *Xylella*-Projekts hat die Erstellung der Cosmidkarte erheblich dazu beigetragen, das Sequenzierprojekt erfolgreich durchzuführen [4]. Die generierte Karte wurde mit der zwischenzeitlich vorliegenden vollständigen Sequenz validiert.

Neben der oben beschriebenen strukturellen Analyse werden häufig funktionelle Untersuchungen eines Genoms im Hinblick auf die Genexpression der codierenden Bereiche durchgeführt. In diesem Rahmen bieten sich vergleichende Untersuchungen zwischen unterschiedlichen (patho-)physiologischen Zuständen an. Die Identifikation neuer Gene bzw. neuer funktioneller Zusammenhänge bereits bekannter Gene sind dabei die Hauptziele. Im zweiten Teil dieser Arbeit wird beschrieben, wie zu diesem Zweck die Methodik der Repräsentativen Differenz Analyse (RDA) eingesetzt wurde. Diese Technik identifiziert die Unterschiede zwischen zwei cDNA Populationen mittels subtraktiver Hybridisierung und anschließender selektiver PCR (Hubank M und Schatz D G (1994). Nucleic Acids Res. 22

(25): 5640-8). Neben der Weiterentwicklung der Technik werden die verschiedenen Validierungsmöglichkeiten über Southern-Blots, Northern-Blots und reverse Northern-Blots beschrieben. Zur Untersuchung wurden in verschiedenen Kooperationen vor allem Systeme von hoher medizinischer Relevanz ausgewählt. Ferner wird ein Beispiel aus der Botanik beschrieben.

Aus dem Bereich der Onkologie wurden das Pankreas- [5] und das Larynxkarzinom [6] untersucht. Eine große Zahl potenziell hoch- oder herabregulierter Gene wurde identifiziert und zum Teil auch validiert. Darunter waren sehr viele bisher nicht näher charakterisierte Gene und eine erhebliche Anzahl Genprodukte aus interessanten Funktionsbereichen wie Signaltransduktion, Apoptose etc., jedoch auch solche die auf eine nicht-tumorspezifische Gewebereaktion im Sinne einer Entzündung hindeuten. Die letztgenannte Erkenntnis konnte bei den folgenden Experimenten zu wesentlichen Verbesserungen bei der Auswahl der Startmaterialien beitragen. Die Genexpression bei induzierter Herzinsuffizienz wurde in einem Tiermodell untersucht. Ein hierbei identifiziertes Gen spielt möglicherweise als Transkriptionssilencer auch beim Menschen eine Rolle im Krankheitsverlauf. Schließlich wurde mittels cDNA-RDA die Expression von schließzellenspezifischen Genen im pflanzlichen Modellsystem *Arabidopsis thaliana* untersucht. Hierbei wurde die RDA soweit modifiziert, daß es möglich war mit kleinsten cDNA-Mengen zu arbeiten. Im zur Verfügung gestellten Ausgangsmaterial war jedoch offenbar durch die Präparation der Zellen eine Stressantwort induziert worden, die die Beobachtung schließzellenspezifischer Genexpression erschwerte.

Die gewonnenen praktischen Erkenntnisse konnten in vielen weiteren Experimenten in unserer und anderen Arbeitsgruppen verwendet werden. Die wissenschaftlichen Ergebnisse werden teilweise z. Z. noch auf eine wirtschaftliche Verwertbarkeit untersucht. Für einige der identifizierten Gene wurden bereits weitere Experimente gestartet. Deren Fernziel ist die Identifikation von Wirkstoffen, zur Behandlung der jeweiligen Krankheitsbilder.

Ausgewählte Publikationen zur denen diese Arbeit beigetragen hat:

- [1] Hanke J *et al.* (1998). *Electrophoresis* 19 (4): 482-485.
- [2] Frohme M *et al.* (2000). *Nucleic Acids Res.* 28 (16): 3100-3104.
- [3] Frohme M *et al.* (1998). *Electrophoresis* 4: 478-481.
- [4] Simpson A J *et al.* (2000). *Nature* 406 (6792): 151-157.
- [5] Gress T M *et al.* (1997). *Genes Chromosomes Cancer* 19 (2): 97-103.
- [6] Frohme M *et al.* (2000). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 910: 85-105.