

Andreas Rätsch
Dr. sc. hum.

Untersuchungen zur Topologie des *c-MYC* Gens und des Immunglobulinlocus innerhalb der t(2;8) Translokation bei Burkitt-Lymphom Zelllinien

Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1986/87 bis WS 1993/94
Vordiplom am 15. Februar 1989 an der Universität Heidelberg
Diplom am 14. Oktober 1993 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Humangenetik
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Peter Lichter

Die Fehlregulation des *c-MYC* Gens beim Burkitt-Lymphom beruht auf spezifischen Chromosomentranslokationen (t(2;8), t(8;14), t(8;22)), durch die auf molekularer Ebene das *c-MYC* Gen und einer der Immunglobulinloci gemeinsamen auf einem Chromosom zusammengelagert werden. Regulatorische Kontrollelemente innerhalb der Immunglobulingene beeinflussen dadurch „in cis“ die Expression des *c-MYC* Gens. Da der Abstand dieser beiden Genloci mehrere hundert kbp betragen kann, ist der Mechanismus unklar, über den die Fehlregulation von *MYC* erfolgt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die weitreichende Wirkung des Immunglobulinlocus auf *c-MYC* durch eine topologische Zusammenlagerung der beiden Genloci erklärt werden kann, die z.B. über eine spezifische DNA-Schleife erkennbar wird.

Die Analysen wurden an Halo-Präparationen normaler Lymphozyten und verschiedener Burkitt-Lymphom-Zelllinien mittels der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) durchgeführt. Bei einer Halo-Präparation wird der Zellkern permeabilisiert und die genomische DNA durch eine hochmolare Salzbehandlung decondensiert. Ein Großteil der DNA quillt dadurch aus dem Kernbereich in die Peripherie und liegt gespreitet in Form eines Halos vor. Die bisher beschriebenen Präparationsprotokolle wurden in dieser Arbeit weiterentwickelt und optimiert, so daß Halo-Strukturen präpariert werden konnten, die nach FISH-Experimenten Rückschlüsse auf die topologische Organisation einzelner Genloci zuließen. Zu den wichtigsten methodischen Parametern des neuen Protokolls zählten die Ausgangszelldichte auf den Objektträgern und die Dauer der Salzbehandlung. Untersuchungen von telomer- und zentromerspezifischen DNA-Sequenzen ergaben eine spezifische Verteilung innerhalb der Halo-Strukturen.

Für die Untersuchungen zur Topologie des *c-MYC* Gens und der Immunglobulingene in Halo-Präparaten von Burkitt-Lymphom Zelllinien wurden 41 PACs und YACs isoliert und fein-

kartiert. Diese DNA-Sonden überspannen in den Burkitt-Lymphom Zelllinien Ly66 und MAKU vollständig einen mehrere 100 kbp großen Bereich zwischen dem *c-MYC* und dem Immunglobulingenlocus. Neben den hier beschriebenen Analysen werden diese DNA-Sonden inzwischen auch für den Nachweis molekular-zytogenetischer Veränderungen der *c-MYC* Region in Tumorzellen eingesetzt.

Die topologischen Untersuchungen an Halo-Präparaten humaner Monozyten und der Burkitt-Lymphom Zelllinie Ly66 ergaben folgende Ergebnisse:

a.) Die Verteilung der FISH-Signale des *c-MYC* Gens und der Immunglobulingene war bei Monozyten und der Zelllinie Ly66 unterschiedlich. In Monozyten lagen die Signale der beiden Gene überwiegend im Bereich der gespreiteten genomischen Halo-DNA, bzw. waren nicht mit dem verbliebenen Zellkern assoziiert. Ähnlich war die Situation bei den *c-MYC*- und Immunglobulin Wildtyp-Allelen in der Zelllinie Ly66. Dagegen zeigten die beiden translozierten Allele eine signifikante Häufung von Signalen, die mit dem verbliebenen Zellkern assoziiert waren. Mit dem in dieser Arbeit optimierten Halo-System können somit Unterschiede in der nukleären Topologie verschiedener Allele eines Gens nachgewiesen werden.

Da bisherige Untersuchungen mit Burkitt-Lymphom Zelllinien gezeigt haben, daß nur das translozierte *c-MYC* Allel transkriptionell aktiv ist, deuten die Ergebnisse dieser Arbeit an, daß die Expression von *c-MYC* mit einer spezifischen Anheftung an den verbliebenen Zellkern verbunden ist. Die Signalverteilung der Immunglobulingene in Halo-Strukturen korrelierte ebenfalls mit früher gewonnenen Daten zur Genexpression in den analysierten Zellen.

b.) Die Assoziation von DNA-Sonden mit dem verbliebenen Zellkern in Halo-Strukturen resultierte bei FISH-Experimenten in V-förmigen Signalen. Über diese Signale wurde eine Anheftungsstelle der DNA im Zellkern sowohl bei humanen Monozyten, als auch bei der Zelllinie Ly66 im 3' Bereich des *c-MYC* Gens kartiert (Monozyten: $16\text{kbp} \pm 5\text{kbp}$; Ly66: $36\text{kbp} \pm 5\text{kbp}$). Die voneinander abweichende Lage der Anheftungsstellen könnte auf einen zelltypspezifischen Unterschied zurückzuführen sein.

c.) Abstandsmessungen in Halo-FISH-Experimenten ergaben, daß die Distanz zwischen dem *c-MYC* Gen und den Immunglobulingenen auf dem von der Translokation betroffenen Chromosom der Zelllinie Ly66 kürzer war, als aufgrund der physikalischen Daten zu erwarten gewesen wäre. Dies wurde durch weitere statistische Berechnungen bestätigt und ist mit der Vorstellung einer spezifischen Anordnung des *c-MYC*/Immunglobulinlocus unter Beteiligung einer Schlaufenbildung in Burkitt-Lymphom Zellen vereinbar.

Zusammenfassend konnten am Beispiel des *c-MYC*/Immunglobulinlocus in Burkitt-Lymphom Zellen Hinweise auf einen Mechanismus gewonnen werden, wie sich Gene über einen Bereich von mehreren hundert kbp beeinflussen können. Nach den hier vorgelegten Ergebnissen spielen dabei schlaufenartig angeordnete DNA-Bereiche eine Rolle, durch die regulatorische Kontrollelemente (z.B. des Immunglobulinlocus) in die Nähe eines weiteren Gens (z.B. des *c-MYC* Onkogens) gelangen und so deren Expression beeinflussen können.