

Jens Hanke
Dr. sc. hum.

Physikalische Kartierung des Chromosom III von *Trypanosoma cruzi*

Geboren am 17.05.1966 in Frankfurt am Main

Reifeprüfung am 10.06.1985

Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1987/88 bis SS 1993

Vordiplom am 23.08.1989 an der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt

Diplom am 17.09.1993 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Experimentelle Pathologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Angel Alonso

Trypanosoma cruzi ist ein parasitisch lebender Protozoe, der beim Menschen die sogenannte Chagas-Krankheit hervorruft. Weltweit sind von dieser Krankheit, für die zur Zeit weder wirksame Medikamente noch zuverlässige diagnostische Methoden existieren, etwa 16-18 Millionen Menschen betroffen. In den meisten Fällen führt sie zum Tod der betroffenen Patienten. Um ein besseres Verständnis von biochemischen Vorgängen und während der Infektion ablaufende Interaktionen mit dem Wirt zu erhalten, wurde das *Trypanosoma cruzi* Genomprojekt gestartet, das im Rahmen des Spezialprogrammes "Research And Training In Tropical Disease" (TDR) von der WHO finanziert wird. Zu den Zielen des Projekts gehört neben der Herstellung von geeigneten DNA-Bibliotheken, der EST-Sequenzierung und dem Aufbau von Datenbanken auch die Sequenzierung des gesamten Genoms.

Ein wichtiges Hilfsmittel für das Sequenzieren von großen genomischen Bereichen ist eine hochauflösende physikalische Karte, durch deren Verwendung eine hohe Datenredundanz vermieden und die Sequenzierung wesentlich beschleunigt werden kann. Eine solche Karte soll durch das Ordnen einer Cosmidbibliothek für das gesamte Genom von *T. cruzi* hergestellt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Herstellung und Analyse dieser Cosmidbibliothek, durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die physikalische Kartierung von Chromosom III, die als Pilotprojekt wichtige Informationen über die noch weitgehend unbekannte Struktur des Genoms von *T. cruzi* und die Tauglichkeit der angewandten Methoden liefern sollte.

Die für die Kartierung notwendige Chromosom III-Bibliothek wurde durch eine Selektion von Chromosomen-spezifischen Klonen aus der gesamt-genomischen Bibliothek hergestellt. Zu diesem Zweck wurden die 28.000 Klone der gesamt-genomischen Bibliothek in einem Raster hoher Dichte auf Filter aufgebracht (18.432 Klone pro Filter) und Chromosomen-spezifische Klone durch eine Hybridisierung von Chromosom III-DNA identifiziert.

Die Kartierung von Chromosom III erfolgte durch die Identifikation von Klonen mit überlappenden Sequenzen. Durch Hybridisierungen einzelner Sonden auf Klonfilter der gesamten Chromosom III-Bibliothek konnten benachbarte Klone identifiziert werden. Durch die parallele Bearbeitung aller Klone konnten pro Experiment große Datenmengen produziert werden, die anschließend mit einem speziellen Computerprogramm ausgewertet wurden. Mit dieser Methode konnte eine nahezu vollständige Karte des Chromosoms, bestehend aus 26 zu ca. 30% überlappenden Klonen, hergestellt werden.

Über die Kartierung von Chromosom III hinaus zeigt diese Arbeit für die weitere Kartierung von *T. cruzi* wichtige Erkenntnisse. So werden beispielsweise bei der Kartierung des gesamten Genoms cDNAs statt genomischer DNA als Hybridisierungssonde verwendet werden. Weiterhin werden Sondengemische zur Anwendung kommen, die den nötigen Arbeitsaufwand für das mehr als 70 mal größere Gesamt-Genom reduzieren werden. Obwohl das Genom aufgrund seiner komplizierten Struktur wohl nie an einem Stück kartiert werden wird, wird eine vollständige Abdeckung der nicht-repetitiven Bereiche, selbst in einer Vielzahl von Contigs, äußerst nützlich sein für die Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die die Grundlage der Pathogenität des Organismus darstellen.