

Va ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren wurden auf dem langen Arm von Chromosom 1 des Menschen drei strukturell verwandte Genfamilien lokalisiert, die für die Ausbildung einer intakten Epidermis von entscheidender Bedeutung sind. Sie codieren sowohl strukturgebende als auch regulatorisch wirkende Proteine, die während der Differenzierung der Epidermis funktionell zusammenspielen. Die koordinierte Expression der Gene führte in Verbindung mit ihrer Anordnung innerhalb eines eng begrenzten Bereichs der Region 1q21 zur Definition eines neuen Genkomplexes, des Epidermalen Differenzierungskomplexes (EDC, *epidermal differentiation complex*).

Zwei für die Charakterisierung des EDC unverzichtbare Ressourcen wurden im Rahmen dieser Arbeit geschaffen. Als erstes ist das aus 24 YACs (*yeast artificial chromosomes*) bestehende Contig zu nennen, das sich über 6 Mb der Region 1q21 erstreckte. Insgesamt 43 Genmarker, 20 neue, 1q21-spezifische Hybridisierungsmarker und sieben polymorphe STS (*sequence-tagged site*)-Marker wurden innerhalb des Contigs kartiert; bis auf zwei kleinere Abschnitte war die Region mindestens doppelt mit DNA-Klonen abgedeckt. Durch Zwei-Farben-FISH (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung) zweier, den EDC begrenzender, YACs wurde die Orientierung des Genkomplexes auf Chromosom 1 bestimmt. Um die Auflösung des Contigs zu erhöhen, wurde eine Sall-Restriktionskarte der YACs erstellt und, um die Ergebnisse zu verifizieren, zusätzlich eine genomische Restriktionskarte, die ca. 4,5 Mb der Region 1q21 umfaßte. Die Positionierung von sieben STS-Markern der genetischen Karte auf den YACs führte zur integrierten Karte der Region 1q21, die für Kopplungsanalysen besonders wertvoll ist.

Für die Analyse der während der Differenzierung der Epidermis exprimierten Gene wurde das zweite Hilfsmittel angefertigt, eine feingerasterte cDNA-Bibliothek aus Keratinozyten unterschiedlicher Reifegrade. Diese war sowohl aufgrund ihrer Größe (10 Filter mit je 18432 doppelt aufgetragenen Klonen) als auch der enthaltenen cDNA-Sequenzen, die selbst späte Differenzierungsstadien einschlossen, einzigartig und ermöglichte die systematische und schnelle Analyse nahezu des gesamten bei der Keratinozytenreifung vorliegenden Transkriptoms. Für die Verwaltung der cDNA-Bibliothek wurde eine zentrale Datenbank angelegt, in der alle erzielten Ergebnisse gespeichert und ausgewertet wurden.

Zusätzlich wurde eine Methode zur Genidentifizierung weiterentwickelt, die YACs als Sonden für die Hybridisierung einer cDNA-Bibliothek nutzt. Durch subtraktive Hybridisierung einer feingerasterten cDNA-Bibliothek mit nicht überlappenden YACs konnten zuvor beschriebene Probleme mit falsch positiven Klonen nahezu vollständig gelöst werden: Fast 90% der subtraktiv ausgewählten cDNA-Klone konnten im EDC kartiert werden.

Die cDNA-Sequenzen repräsentierten 40 verschiedene Transkripte, die von 33 Genen stammten. Von diesen konnten 21 Gene erstmals dem EDC zugeordnet werden: *ADARI*, *ANXA9*, *HAX1*, *LAMRL6*, *PIAS3*, *PIP5K1A*, *PSMB4*, *PSMD4*, *PSMD8L*, *RBM8* und *TPM3* sowie zehn zuvor nicht charakterisierte Gene (*NICE1* bis *NICE10*), von denen eines eine Homologie zum *NOTCH2*-Gen aufwies. Vier weitere Gene, *CHRN2*, *RPTN*, *S100A11* und *TDRKH*, wurden unabhängig von der subtraktiven Hybridisierung im EDC lokalisiert. Die bekannten Genfamilien des EDC konnten mit *RPTN* und *S100A11* um zwei neue Mitglieder erweitert werden; außerdem wurde ein polymorphes Transkript des *SPRR3*-Gens identifiziert. Expressionsuntersuchungen und Sequenzanalysen des *NICE1*-Gens, das ebenfalls in der ursprünglichen EDC-Region kartiert, lassen eine neue, differenzierungsspezifisch exprimierte Genfamilie innerhalb des EDC vermuten.

Durch die Zuordnung der entsprechenden Gene im Mausgenom konnte eine orthologe Kopplungsgruppe auf dem Mauschromosom 3 belegt werden. Ebenso konnten paraloge Regionen auf den Chromosomen 1, 6, 9 und 19 im menschlichen Genom aufgezeigt werden. Darüberhinaus bestätigen vier neue EDC-Gene, denen homologe Gene auf dem langen Arm von Chromosom 15 zugeordnet werden konnten, Hinweise auf eine fünfte paraloge Region – ein weiterer Schritt zur Aufklärung der Chromosomenentwicklung.

Der EDC konnte als Ergebnis dieser Arbeit von 2 auf 6 Mb ausgedehnt werden, innerhalb der jetzt 52 Gene kartieren, von denen fast alle in Keratinozyten exprimiert werden und die somit potentiell am Aufbau der Epidermis beteiligt sind. Da die Transkriptionsanalyse der Region nicht erschöpfend durchgeführt wurde, wird ihre Zahl voraussichtlich noch zunehmen. Auch ist die tatsächliche Ausdehnung des EDC auf Chromosom 1 noch unbekannt, so daß weitere Analysen dieser außergewöhnlichen Region des menschlichen Genoms erstrebenswert sind.