

**Molekulargenetische Charakterisierung
des Epidermalen Differenzierungskomplexes (EDC)
auf Chromosom 1 des Menschen**

**Im Fachbereich
Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin
eingereichte Dissertation**

**von
Ingo Marenholz
aus Salzgitter**

Januar 2002

Diese Arbeit wurde am Institut für Immungenetik des Universitätsklinikums Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, vormals Institut für Experimentelle Onkologie und Transplantationsmedizin des Universitätsklinikums Rudolf Virchow der Freien Universität Berlin, angefertigt. Der Verfasser versichert, die Arbeit selbständig durchgeführt und alle verwendeten Hilfsmittel und Hilfen angegeben zu haben.

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Ziegler
Prof. Dr. Volker A. Erdmann

Tag der Disputation: 02.10.2002

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	III
Danksagung	VII
Symbole und Abkürzungen.....	IX
I EINLEITUNG	1
1 Die Haut – Aufbau und Funktion	1
2 Die Differenzierung der Epidermis	2
3 Molekularbiologie der Keratinozyten.....	4
4 Die Bedeutung der Region 1q21 für die Epidermidifferenzierung	8
4 Die Bedeutung der Region 1q21 für die Epidermidifferenzierung	9
5 Der Epidermale Differenzierungskomplex (EDC)	12
6 EDC-assoziierte Krankheiten	12
7 Genomanalyse	15
8 Genetische Kartierung	16
9 Physikalische Kartierung	17
10 Methoden zur Identifizierung neuer Gene	20
11 Das Humangenom-Projekt	22
12 Ziele der Arbeit	25
II MATERIAL & METHODEN	27
1 Geräte	27
2 Arbeitsmaterial & Hilfsmittel	27
3 Reagenzien	28
4 Enzyme	29
5 Reagenziensets	29
6 Nucleinsäuren.....	30
6.1 Vektoren.....	30
6.2 DNA-Sonden.....	30
6.3 Oligonucleotid-Primer.....	31
6.4 Molekulargewichtsstandards.....	31
7 DNA-Bibliotheken	32
8 Lösungen	32
8.1 Stammlösungen.....	32

8.2 Puffer	33
8.3 Nährmedien	35
9 Zellen und ihre Aufzucht	35
9.1 Zellkultur	35
9.2 Hefekultur.....	36
9.3 Bakterienkultur	36
10 DNA-Isolierung	36
10.1 Genomische DNA des Menschen (hoch- bzw. niedermolekular)	36
10.2 DNA aus Hefezellen (hoch- bzw. niedermolekular)	37
10.3 YAC-DNA (Elektroelution)	38
10.4 Plasmid-DNA	39
10.5 Plasmidinserts (Elution mit Glas- <i>beads</i>)	39
10.6 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	40
11 Restriktionsanalyse	40
11.1 Restriktion von DNA in Lösung.....	40
11.2 Restriktion von DNA in Agarose	40
12 DNA-Klonierung	41
12.1 Ligation	41
12.2 Herstellung kompetenter Zellen	42
12.3 Transformation	42
13 Gelelektrophorese	43
13.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	43
13.2 Agarosegelelektrophorese	43
13.3 Gelelektrophorese im rotierenden Feld (ROFE).....	43
13.4 DNA-Nachweis mit Ethidiumbromid.....	44
14 Southern-Blotting	44
15 Radioaktive Hybridisierung	45
15.1 DNA-Sonden	45
15.2 Markierung der Sonde	45
15.3 Hybridisierung.....	46
15.4 Autoradiographie.....	47

16 Polymerasekettenreaktion (PCR)	48
17 DNA-Sequenzierung (Dideoxy-Verfahren)	49
17.1 Sequenzierungsreaktion	49
17.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese.....	50
17.3 Detektion und Fehlerkorrektur	50
18 Computergestützte Sequenzanalysen.....	51
19 Herstellung einer feingerasterten (<i>gridded</i>) cDNA-Bibliothek	51
19.1 Aufziehen der Klone	52
19.2 Automatisches Auflesen der Klone (<i>picking</i>)	54
19.3 Vervielfältigung der cDNA-Bibliothek (<i>replicating</i>).....	54
19.4 Automatisches Aufbringen der Klone auf Membranen (<i>spotting</i>)	55
19.5 Verarbeiten der Filter (<i>processing</i>)	56
19.6 Verwalten der cDNA-Bibliothek	56
III ERGEBNISSE	58
1 Erstellung eines YAC-Contigs der Region 1q21.....	58
1.1 Auswahl der YAC-Klone	58
1.2 YAC-Größenbestimmung	60
1.2 YAC-Größenbestimmung	61
1.3 Charakterisierung instabiler YACs	61
1.4 Zusammensetzen eines Contigs des EDC	62
1.5 Erweiterung des Contigs durch die Integration genetischer Marker	63
1.6 Herstellung und Kartierung neuer Sonden zur Erhöhung der Markerdichte	65
1.6 Herstellung und Kartierung neuer Sonden zur Erhöhung der Markerdichte	66
1.7 Identifizierung rearrangierter YACs	67
1.8 Chromosomale Orientierung des EDC.....	67
1.9 Diskussion.....	69
2 Identifizierung neuer EDC-Gene durch subtraktive Hybridisierung	70
2.1 Eine direkte Methode zur Identifizierung neuer Gene	71
2.2 Hybridisierung der feingerasterten cDNA-Bibliothek mit einem YAC	71
2.3 Auswertung der Hybridisierung.....	72
2.4 Hybridisierung der feingerasterten cDNA-Bibliothek mit einem zweiten YAC.....	75

2.5 Subtraktive Auswertung	75
2.6 Hybridisierungsergebnisse zweier weiterer YACs aus der centromeren Region	78
2.7 Mögliche Fehlerquellen und ihre Vermeidung.....	78
3 Kartierung der neuen EDC-Gene.....	79
3.1 YAC-Restriktionskarte.....	80
3.2 Genomische Restriktionskarte.....	85
3.3 Fusion der physikalischen Karten.....	88
3.4 Integration der genetischen Marker.....	88
4 Charakterisierung der cDNA-Sequenzen.....	90
4.1 Ermittlung der cDNA-Sequenzen.....	91
4.2 cDNA-Sequenzen bekannter EDC-Gene.....	91
4.3 cDNA-Sequenzen anderer bekannter Proteine	94
4.4 cDNA-Sequenzen unbekannter Funktion.....	94
IV DISKUSSION.....	102
1 Die Ressourcen	102
1.1 Das YAC-Contig des EDC.....	102
1.2 Die feingerasterte Keratinozyten-cDNA-Bibliothek	104
2 Die Hybridisierungsmethode	106
3 Die integrierte Karte der Region 1q21	108
4 Die neuen EDC-Gene	109
5 Der Genkomplex.....	116
5.1 EDC oder „CDC“?	116
5.2 Kontrolle der Genexpression.....	117
5.3 Orthologie im Mausgenom – der EDC der Maus.....	119
5.4 Paralogie im menschlichen Genom	121
6 Ausblicke	124
Va ZUSAMMENFASSUNG.....	126
Vb SUMMARY	128
Literaturverzeichnis.....	130
Publikationsliste	149
Lebenslauf.....	151

DANKSAGUNG

Zum Gelingen der vorliegenden Arbeit haben beigetragen:

Dietmar Mischke mit der Bereitstellung des Themas, einer hervorragenden Betreuung und anregenden Diskussionen, darüberhinaus als Koordinator des Biomed-Projekts „*Integrated analysis of expression and chromosomal organisation of genes localised on human chromosome 1q21: Implications for human disease and cancer*“, der aus den unterschiedlichen Arbeitsgruppen ein kooperierendes Team formte und maßgeblichen Anteil am Erfolg des Projekts hatte, dessen Ende er leider nicht mehr miterlebte;

Andreas Ziegler als Institutsdirektor mit großem persönlichen Einsatz und als kritischer Begleiter, dessen Ratschläge einen großen Gewinn für diese Arbeit bedeuteten;

Volker A. Erdmann als Gutachter vom Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin;

Armin Volz mit technischer Unterstützung und als Ansprechpartner bei experimentellen und inhaltlichen Fragestellungen jeglicher Art;

Maja Zirra mit 500000 Basen;

David F. Fischer und Claude Backendorf, Leiden, durch Überlassung der Keratinozyten-cDNA-Bibliothek und Unterstützung bei der Bearbeitung derselben sowie der Herstellung des Northern-Blots;

Ioannis Ragoussis, London, an dessen Institut die FISH-Experimente durchgeführt wurden;

Beat Schäfer und Claus W. Heizmann, Zürich (YACs 100_f_3 und 692_c_1; *S100A1*-, *S100A2*-, *S100A11*- und *S100A13*-Sonden; Korrekturlesen);

Marcel Huber und Daniel Hohl, Lausanne (*RPTN*-Sonde);

Andrew South und Dean Nizetic, London (Zusammenarbeit bei der Erstellung des PAC/BAC/Cosmid-Contigs des EDC);

Leonardo Meza-Zepeda und Anne Forus, Oslo (Zusammenarbeit bei der Identifizierung von Genamplifikationen in der Region 1q21);

Philip Djian, Paris, und Fiona Watt, London (weitere Diskussions- und Kooperationspartner des 1q21-Konsortiums);

Kira K. Lueders, Bethesda, Maryland (*CHRNA2*-Sonde);

Brian C. Schutte, Iowa City, Iowa (*TDRKH*-Primer);

das Ressourcenzentrum in Berlin und seine Mitarbeiter mit der Bereitstellung des Materials und der Geräte zur Herstellung der feingerasterten cDNA-Bibliothek und durch Unterstützung der dortigen Arbeiten;

die Kollegen am Institut für Immungenetik, vormals Institut für Experimentelle Onkologie und Transplantationsmedizin (Waltraud Bangel, Natalija Backmann, Anke Ehlers, Hans-Heinrich Förster, Katja Laun, Ruth Menßen, Martina Richter-Freund, Christian Seitz, Barbara Uchanska-Ziegler, Hagen Wende, Gabriele Wille, Angelika Zank);

die Deutsche Forschungsgemeinschaft und die Europäische Union, die den Großteil der finanziellen Mittel beigesteuert haben, sowie die Berliner Krebsgesellschaft und die Sonnenfeld-Stiftung (Berlin), die Finanzmittel für die Anschaffung diverser Geräte bereitstellten.

Allen ein herzliches Dankeschön!

SYMBOLE UND ABKÜRZUNGEN

A	Absorption
aa	Aminosäuren (<i>amino acids</i>)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAC	künstliches Bakterienchromosom (<i>bacterial artificial chromosome</i>)
BIS	N,N'-Methylendiacylamid
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BME	2-Mercaptoethanol (β -Mercaptoethanol)
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin Fraktion V (<i>bovine serum albumin</i>)
C-	Carboxy-
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CE	„Hornzellwand“ (<i>cornified cell envelope</i>)
CEPH	<i>Centre d'Etude du Polymorphisme Humain</i>
cfu	Kolonien bildende Einheiten (<i>colony forming units</i>)
CHLC	<i>Cooperative Human Linkage Center</i>
cM	CentiMorgan
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTE	1,4-Dithioerythrit
EDC	Epidermaler Differenzierungskomplex (<i>epidermal differentiation complex</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EST	exprimierte sequenzmarkierte Stelle (<i>expressed sequence tag</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
IF	Intermediärfilamente
IPTG	1-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen

kD	KiloDalton
LB	Luria-Bertani
Mb	Megabasen
MBq	MegaBecquerel
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIT	<i>Massachusetts Institute of Technology</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
N-	Amino-
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
p (pter)	kurzer Chromosomenarm (Terminus des kurzen Chromosomenarms)
PAC	künstliches Bakteriophagen P1-Chromosom (<i>P1 artificial chromosome</i>)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
q (qter)	langer Chromosomenarm (Terminus des langen Chromosomenarms)
RH	Strahlungshybrid (<i>radiation hybrid</i>)
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROFE	Gelelektrophorese im rotierenden Feld (<i>rotating field gel electrophoresis</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SPRR	kleines Prolin-reiches Protein (<i>small proline-rich protein</i>)
SSC	<i>saline sodium citrate</i>
STE	<i>sodium TRIS EDTA</i>
STS	sequenzmarkierte Stelle (<i>sequence-tagged site</i>)
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGase	Transglutaminase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
UV	ultraviolett
YAC	künstliches Hefechromosom (<i>yeast artificial chromosome</i>)
YMM	Hefe-Minimalmedium (<i>yeast minimal medium</i>)
YT	<i>yeast tryptone</i>