

**Vom Genom zum Proteom:  
Genetische und physikalische Kartierung  
von Gehirnproteinen der Maus**

**Dissertation**

zur Erlangung eines Doktorgrades der Naturwissenschaften  
im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Diplom Biologin Christina Nock  
aus Allensbach

Berlin, 2001

Datum der Disputation      11. September 2001

1. Gutachter              Prof. Dr. Dr. Joachim Klose

2. Gutachter              Prof. Dr. Ferdinand Hucho

## DANKSAGUNG

Ich möchte mich hier bei allen Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht hätte durchgeführt und vollendet werden können.

Herzlich danke ich Professor Dr. Dr. Joachim Klose für die Überlassung des Themas, die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft und Unterstützung und für das Teilen seiner erfahrungsreichen, tiefen Einsichten in die Komplexität der Proteinwelten.

Marion Löwe danke ich für die Einweisung in die 2-D Elektrophorese und das Teilen ihrer grossen Erfahrung auf diesem Gebiet.

Priv.Do. Dr. Hans Lehrach danke ich dafür, 2 Jahre in seiner Abteilung am Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik, Berlin, die praktischen Arbeiten durchzuführen zu dürfen.

Besonders möchte ich mich bei Dr. habil. Heinz Himmelbauer, Dr. Leo Schalkywk und allen meinen Kolleginnen am Max-Planck-Institut für die gute wissenschaftliche Betreuung und Zusammenarbeit und das Teilen von Freud und Leid der genetischen Kartierungen bedanken. Jedoch, nicht zuletzt wäre diese Arbeit ohne die liebe Unterstützung meiner Eltern, Schwester Ursel und meines Freundes Arjen nicht vollendet worden.

Very special thanks also to Dr. Walter Blackstock and my colleagues at GlaxoSmithkline, UK, for their support and friendliness which helped me very much during that time of writing up and finishing my thesis.

## ZUSAMMENFASSUNG

Mit der Totalsequenzierung des Genoms eines Organismus und der Identifizierung der kodierenden Sequenzen kann – im Prinzip – jedes Protein des betreffenden Organismus seinem Strukturgen zugeordnet werden, wenn genügend Information über die Primärstruktur (Aminosäuresequenz, Peptidmassen) der Proteine vorliegt. Ungeklärt dabei bleibt jedoch, inwieweit ein Protein über sein Strukturgen hinaus von anderen kodierenden DNA-Sequenzen abhängig ist. Das sind Gene, die auf die Modifikation und Expression der Proteine Einfluss nehmen können. Unter dieser Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit mit genetischen Methoden eine umfangreiche Kartierung von Proteinen der Maus durchgeführt.

Die Untersuchung der Gehirnproteine der beiden Mäusespezies *Mus musculus* und *Mus spretus* durch hochauflösende zweidimensionale Elektrophorese (2-DE) in der Arbeitsgruppe Prof. J. Klose (Klose 1999b) hatte zum Nachweis von 1324 qualitativen oder quantitativen Proteinpolymorphismen innerhalb einer Gesamtzahl von etwa 8700 Proteinspots geführt. Im Rahmen einer europäischen Kooperation (The European Collaborative Interspecific Backcross; EUCIB) wurde mit den Mäusespezies *Mus musculus* und *Mus spretus* eine Feinkartierung des Genoms der Maus auf der Basis von DNA-Polymorphismen von etwa 1000 Rückkreuzungstieren durchgeführt. Die durchschnittliche Markerdichte betrug 0.61cM. Die Kartierung von 1324 Proteinpolymorphismen auf der genetischen Karte der Maus in dieser Arbeit basierte auf den Ergebnissen der Analyse der Polymorphismen in 2D-Gelen von 64 Rückkreuzungstieren der EUCIB-Kreuzung. Da viele der 64 Rückkreuzungstiere innerhalb des EUCIB-Projektes nur unzureichend mit Mikrosatellitenmarkern genotypisiert worden waren, wurden in dieser Arbeit zunächst IRS-PCR-Marker eingesetzt, um die Markerdichte zu erhöhen. Dies diente dazu, die Rekombinationen in den 64 Rückkreuzungstieren vollständig zu erfassen und für die Proteinkartierung nutzbar zu machen. IRS-PCR-Marker sind Marker, die ohne jede Sequenzinformation eingesetzt werden können. Sie werden mit einem einzigen Primer, hier dem Primer B1R für das repetitive SINE-Element B1 der Maus, gewonnen. IRS-PCR-Produkte von genomischer DNA von *Mus musculus*, die einen quantitativen Polymorphismus zwischen *Mus musculus* und *Mus spretus* aufwiesen, wurden zur Genotypisierung von bis zu 300 Rückkreuzungstieren der EUCIB-Rückkreuzung verwendet. Die Integration von 70 IRS-PCR Markern und 9 Mikrosatellitenmarkern in das Ankermarkergerüst aus 90 DNA-Markern des EUCIB-Projektes bot ein dichtes Netz von Markern und damit eine wesentlich verbesserte Ausgangslage für die Positionierung der Proteine auf der genetischen Karte der Maus. Mit dem Programm MAPMAKER/EXP 3.0 wurde aus DNA- und Proteinpolymorphismen eine genetische Karte erstellt. Die Ergebnisse zeigten: Von 1324 polymorphen Proteinspots konnten 664 Spots genetisch kartiert werden. Spotserien, die gleiche Vererbung und gleichen Variationstyp zeigten, wurden unter demselben Variantennamen zusammengefasst und als ‚homogene Spottfamilie‘ bezeichnet. Die 664 kartierten Spots stellen demnach 409 Varianten dar. Von diesen konnten 360 auf den Chromosomen positioniert oder zumindest Regionen zugeordnet werden. Als Grenzwert für die Anordnung der Proteine auf einem Chromosom galt ein LOD-Wert von 2,5. 49 Varianten zeigten nur geringe, jedoch

signifikante Kopplung (LOD-Wert >3) an einzelne Marker der Chromosomenenden und konnten daher zumindest einem Chromosom zugeordnet werden.

Mit dem hier verwendeten genetischen Verfahren der Kartierung mendelnder Merkmale liessen sich nur monogen bedingte Polymorphismen kartieren. Die nicht positionierten, nur schwache Kopplung zeigenden 49 Varianten sowie die andere Hälfte (660 Spots) der 1324 Polymorphismen, die nicht zur Kartierung eingesetzt werden konnten, liessen sich offenbar deswegen nicht kartieren, weil diese Proteine polygen determiniert waren. Die Polymorphismen dieser Spots werden vermutlich von mehr als nur einem – dem Strukturgenlocus – determiniert.

Um herauszufinden, welche Proteine die 664 kartierten Spots oder 409 Varianten darstellen, bestand der zweite Schritt nach der Kartierung in der Identifizierung der kartierten Proteinspots durch Massenspektrometrie. Das Ziel hierbei war, Spotfamilien zu erkennen, d.h. die Isoformen eines Proteins zu finden. Insgesamt wurden bisher etwa 200 polymorphe Proteinspots identifiziert. Neben den genannten homogenen Spotfamilien konnten bisher 25 heterogenen Spotfamilien gefunden werden. Eine heterogene Spotfamilie enthält Spots, die als dasselbe Protein identifiziert wurden, aber unterschiedliche Polymorphismen aufweisen. Die genetische Analyse zeigte, dass einige der polymorphen Spots auf die genetische Position des identifizierten Strukturgenortes kartierten, während andere polymorphe Spots auf einen anderen chromosomalen Locus kartieren. Diese Kartierungspositionen zeigen offenbar Protein-modifizierende oder –regulierende Gene an. Die identifizierten Proteine konnten folgenden Gruppen zugeordnet werden: 103 Proteinspots gehörten 70 Proteinen an und erwiesen sich als neue Kartierungen in der Maus. 20 Proteine waren bereits kartiert worden und unsere Kartierung stimmte mit der bekannten Kartierungsposition überein. Diese Proteinpolymorphismen wurden als Strukturgen-bedingte Polymorphismen gewertet. Sie beruhen auf verschiedenen Allelen des Gens in den beiden Mausstämmen. Eine dritte Klasse bildeten 21 Polymorphismen, die abweichend von der bisher bekannten Kartierungsposition in der Maus oder der des menschlichen Orthologs kartierten. Zum Beispiel gehören Spots der heterogenen Spotfamilie des Proteins ‚Gamma-Enolase‘ zu allen drei genannten Klassen: vier Mobilitäts-Varianten kartieren auf die bekannte Position des Gens für Gamma-Enolase auf Chromosom 6, zwei auf weitere unterschiedliche Positionen auf Chromosom 6 und eine auf Chromosom 15, auch ein nicht-varianter Spots wurde identifiziert, der ein kleineres Molekulargewicht zeigt und wahrscheinlich ein Fragment darstellt, das die Mutation verloren hat. Auf Einzelspotebene sind 70% der mit Massenspektrometrie identifizierten polymorphen Spots strukturgenbedingt, während 30% der Polymorphismen durch einen Modifikator- oder Regulatorgenort verursacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die cytosolische Fraktion der Gehirnproteine untersucht. Zur weiteren Untersuchung liegt die Membranfraktion vor. Ferner wurden von den gleichen Rückkreuzungstieren der EUCIB-Kreuzung auch die Organe Leber, Herz, Niere und Muskel entnommen. Die genetische Analyse wurde inzwischen auf die Organe Leber und Herz ausgeweitet. Die 2DE-Muster zeigten, dass viele Proteine in mehreren oder allen Organen auftreten. Die genetische Untersuchung dieser Proteine wird zeigen, ob der Effekt von Protein-modifizierenden und –regulierenden Genen wesentlich zur Organspezifität der Proteine beiträgt.

## SUMMARY

After completing genome sequencing of organism and after identification of the coding sequences virtually every protein of the organism can be assigned to its structural or coding gene, provided enough information exists about the primary structure of the protein (amino acid sequence, (e.g. tryptic) peptide masses). Unknown stays yet to which extent the appearance of a protein depends on its gene and to which extent it depends on further coding DNA-sequences. These are genes, that influence expression or modification of other proteins. In respect of these questions about regulation and modification we performed genetic mapping of polymorphic proteins in the mouse. The investigation of brain proteins of the two mouse species *Mus musculus* and *Mus spretus* with high resolution two-dimensional electrophoresis had revealed 1324 quantitative or qualitative protein polymorphisms out of a total number of 8700 cytosolic proteins (Klose 1999b). An European Collaborative Interspecific Backcross project (EUCIB) was founded for high resolution mapping of the mouse genome, based on 1000 backcross animals from the two species *Mus musculus* and *Mus spretus*. DNA-markers were spaced 0.61cM on average. The mapping of 1324 protein polymorphisms on the genetic map of the mouse was based on the analysis of the polymorphisms in 64 of the 1000 backcross animals of the EUCIB cross. Because a part of the 64 backcross animals were not sufficiently genotyped with DNA-markers, we started with using additional markers based on IRS-PCR to substantially increase the marker density as a prerequisite for mapping the protein polymorphisms. This aimed at fully revealing the existing recombinations in all of the 64 backcross animals and utilizing them for the mapping of polymorphic proteins. IRS-PCR markers were used because they can be used without knowing any genomic sequence information. They are generated using a single primer, e.g. the primer B1R for the repetitive SINE-element B1 of the mouse. IRS-PCR products of genomic DNA from *Mus musculus* revealing a quantitative polymorphism between *Mus musculus* and *Mus spretus* were used here for genotyping of up to 300 backcross animals from the EUCIB cross. The integration of 70 IRS-PCR markers and 9 microsatellite markers in the markerframework of 90 anchor markers provided by EUCIB established an improved, sound framework for positioning of the polymorphic proteins on the genetic map of the mouse. The software MAPMAKER/EXP 3.0 was used to build a genetic map out of DNA- and protein polymorphisms.

The results showed: 664 of the 1324 polymorphic protein spots could be mapped on the genetic map of the mouse. Spots showing identical inheritance and the same type of variation were given the same name and defined as a 'homogeneous spot family'. The 664 mapped spots represented therefore 409 variants. 360 variants could be placed on the mouse chromosomes. As threshold for the ordering of protein polymorphisms between DNA-markers a logarithmic odds ratio of 2.5 was applied. 49 of the 409 variants showed only linkage to a chromosome.

With the procedure used here for mapping polymorphisms based on mendelian inheritance we could only assess monogenetically caused polymorphisms. For the variants that showed linkage to a chromosome only as well as the 660 of the 1324 polymorphic spots that didn't show a mendelian segregation pattern at all, it can be concluded that the polymorphisms are caused by the effects of not only one but several genes. The polymorphisms of these spots are probably caused by additional loci

other than the protein coding gene locus itself. To find out which proteins are represented by the 664 mapped spots or 409 variants mass spectrometry was used to identify the spots. The aim was, to recognize spot families and to find all the isospots that represent the same protein. Until now about 200 protein spots could be identified. Next to spots belonging to homogeneous spot families mentioned above 25 heterogeneous spot families could be recognized. A heterogeneous spot family contains spots that are all identified as the same protein, but the single spots show different types of polymorphisms. The genetic analysis showed, that some of the polymorphic spots mapped to the known position of the coding gene whereas others mapped to an unexpected chromosomal location. These mapping positions reveal probably protein-modifying or regulating genes. The identified proteins belong to several different classes: 103 protein spots represented 70 proteins which were mapped newly in the mouse. 20 proteins had already been mapped and were confirmed in our approach. These polymorphisms were considered as based on coding gene polymorphisms, where the polymorphism reflects different alleles of the gene in the two mouse species. A third class contained 21 proteins that mapped differently from the known mapping position in mouse or the human orthologue. For example, spots of the heterogeneous spot family of 'Gamma Enolase' belong to all three classes: four mobility variants map to the known position of the 'Gamma Enolase' gen on chromosome 6, two variants map to different positions on chromosome 6, one on chromosome 15 and one spot is non-variant, probably due to loss of the coding-gene-based variation during degradation of the protein. Counting single spots that are identified by mass spectrometry 70% of the polymorphisms are based on the protein-coding gene whereas 30% can be lead back onto modifying or regulating gene locus.

In the examination presented the cytosolic fraction of mouse brain was investigated. Further investigation on the membrane fraction and on several additional mouse tissues (liver, heart, kidney and muscle) will follow. The analysis of liver and heart proteins revealed already that the majority of spots overlap with spots also present in the brain 2D-pattern. The genetic analysis of the polymorphisms will show to which extend regulating and modificating loci are responsible for organ specificity of proteins.

Danksagung.....	I
Zusammenfassung.....	II
Summary.....	IV
Inhaltsverzeichnis.....	VII
Liste der Abbildungen.....	IX
Liste der Tabellen.....	X
Abkürzungen.....	X

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Konzept einer Large-Scale Analyse in der Biologie.....	1
1.2 Funktionelle Genomanalyse.....	3
1.3 Proteomanalyse - die Wiederentdeckung der Proteine.....	4
1.4 Proteomanalyse - Stand der Technik.....	7
1.4.1 Gelsysteme.....	7
1.4.2 Proteinextraktion.....	9
1.4.3 Quantitative Analyse von 2D-Mustern.....	10
1.4.4 Bildanalyse von 2D-Mustern.....	10
1.4.5 Massenspektrometrie von Proteinen.....	11
1.5 Proteomanalyse im Vergleich zur Genomanalyse.....	12
1.5.1 Methodische Aspekte.....	12
1.5.2 Syntheserate und zelluläre Konzentration der Proteine.....	13
1.5.3 Posttranslationale Modifikationen der Proteine.....	13
1.6 Die genetische Analyse als Bindeglied zwischen Genom und Proteom...15	15
1.6.1 Proteinpolymorphismen.....	15
1.6.2 Das Netzwerk zwischen Gen- und Proteinebene.....	17
1.7 Genetische und physikalische Kartierung von Proteinen der Maus Ansatzpunkte zur eigenen Untersuchung.....	18
1.7.1 Ein Europäisches Kollaborationsprojekt zur genetischen Kartierung der Maus (EUCIB).....	18
1.7.2 Die physikalische Karte des Mausgenoms.....	19
1.7.3 Ansatz und Ziele der eigenen Untersuchungen.....	20
<b>II. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>22</b>
2.1 Molekulargenetische Untersuchungen.....	22
2.1.1 Material.....	22
Enzyme.....	22
Größenstandards.....	22
Oligonukleotide.....	22
Gefässe.....	23
DNA- und Protein-bindende Membranen.....	23
Geräte.....	23
Puffer und Medien.....	23
Klonbanken.....	24
2.1.2 Versuchstiere.....	25
2.1.3 Methoden.....	28
Mikrobiologische Methoden.....	28
Molekularbiologische Methoden.....	28
2.2 Biochemische Untersuchungen.....	34
2.2.1 Material.....	34
Chemikalien.....	34
Geräte.....	34
Lösungen.....	34
2.2.2 Versuchstiere.....	35



2.2.3	Methoden.....	35
	Präparation von Gehirnen.....	35
	Proteinextraktion.....	35
	2D-Elektrophorese.....	36
	Färbetechniken.....	36
	Massenspektrometrie.....	37
<b>2.3</b>	<b>Erfassung der genetischen Daten aus 2D-Proteinmustern.....</b>	<b>38</b>
<b>2.4</b>	<b>Genkartierung.....</b>	<b>40</b>
2.4.1	Zusammenstellen der Protein- und DNA-Segregationsdaten in Dateien..	40
2.4.2	Berechnung der genetischen Karte.....	40
	Untersuchung paarweiser Kopplung (two-point linkage).....	41
	Mehrpunkt-Analyse (multipoint analysis).....	41
	Kontrollen.....	41
<b>III.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Segregationsanalyse von DNA-Polymorphismen.....</b>	<b>42</b>
3.1.1	Bedeutung und Häufigkeit von DNA-Polymorphismen und ihre Darstellung mittels genetischer Marker: RFLP-Marker, SSLP-Marker und IRS-PCR-Marker.....	42
3.1.2	Vorgehensweise bei der Genotypisierung der B1-Mäuse durch IRS-PCR-Marker.....	44
3.1.3	Kartierungsdaten der IRS-PCR-Marker.....	46
3.1.4	Datenqualität.....	49
3.1.5	Einsatzmöglichkeiten der IRS-PCR Marker für andere Mäusekreuzungen.	51
3.1.6	Kartierungsdaten für Mikrosatellitenmarker.....	53
<b>3.2</b>	<b>Segregationsanalyse von Protein-Polymorphismen - Ergebnisse aus 2D-Mustern.....</b>	<b>55</b>
<b>3.3</b>	<b>Eine genetische Karte aus DNA- und Proteinpolymorphismen.....</b>	<b>57</b>
3.3.1	Vorbemerkung zur Genkartierung.....	57
3.3.2	Genkartierungsdaten.....	59
	Der Ausgangspunkt der Kartierung: die Rahmenkarte (framework map)..	59
	Erweiterung der Rahmenkarte mit IRS-PCR und Mikrosatellitenmarkern.	59
	Integration von Proteindaten in das DNA-Marker Netzwerk.....	64
	Integration der MSO-Marker des EUCIB Projektes in die genetische Karte.....	65
3.3.3	Datenqualität.....	66
3.3.4	Verteilung der kartierten Proteine auf die einzelnen Chromosomen - Vergleich mit der MBx-Datenbank.....	66
	Die Kartenlänge in Abhängigkeit von der Kartierungsfunktion.....	69
<b>3.4</b>	<b>Identifizierung von genetisch kartierten Proteinspots durch Massenspektrometrie.....</b>	<b>71</b>
<b>3.5</b>	<b>Physikalische Kartierung nichtpolymorpher Proteinspots von 2DE-Gelen.....</b>	<b>77</b>
3.5.1	Vorgehensweise.....	77
3.5.2	Proteinidentifizierung und Identifizierung eines entsprechenden cDNA-Klons.....	78
3.5.3	Kartierung von I.M.A.G.E cDNA-Klonen mittels IRS-PCR auf YAC-Klonen.....	80
	Identifizierung von genomischen BAC-DNA-Klonen für IRS-PCR.....	80
	Herstellung der IRS-PCR Produkte von genomischen BAC-DNA Klonen....	82
	Hybridisierung von IRS-PCR Produkten der BACs gegen YAC-Klonbanken.	82
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>89</b>
<b>4.1</b>	<b>Genetische Kartierung bei der Maus.....</b>	<b>89</b>
<b>4.2</b>	<b>Markersysteme.....</b>	<b>90</b>

<b>4.3</b>	<b>Die Beobachtung: Proteinspots eines 2DE-Musters zweier Mausstämmen zeigen Variationen.....</b>	<b>92</b>
4.3.1	Sind die Variationen der Proteinspots der Mäusestämme <i>Mus spretus</i> und <i>Mus musculus</i> genetisch bedingt?.....	92
4.3.2	Welche Variationstypen wurden gefunden und welchen Erbgängen folgen sie?.....	93
4.3.3	Die molekulare Basis von genetischer Variation.....	95
4.3.4	Häufigkeit von Proteinpolymorphismen zwischen zwei Mäusespezies....	96
4.3.5	Detektierbarkeit von Mutationen mittels 2D-Elektrophorese.....	97
	Quantitative Variabilität der Proteine.....	99
4.3.6	Praktische Anwendungen: Sind Proteinpolymorphismen als genetische Marker einsetzbar?.....	100
<b>4.4</b>	<b>Die Identifizierung kartierter, polymorpher Proteinspots mit MALDI Massenspektrometrie enthüllt abweichende Kartierungsergebnisse....</b>	<b>101</b>
4.4.1	Die abweichende Kartierung des polymorphen Proteinspots mV147.....	102
4.4.2	Die abweichende Kartierung des polymorphen Proteinspots paV410....	103
	Wie sicher ist unsere Kartierung: besteht Kopplung zu anderen Regionen des Genoms?.....	104
4.4.3	Die abweichende Kartierung des polymorphen Proteinspots mV134.....	105
	Wie sicher ist unsere Kartierung: besteht Kopplung zu anderen Regionen des Genoms?.....	105
4.4.4	Die abweichende Kartierung des polymorphen Proteinspots paV419....	106
	Wie sicher ist unsere Kartierung: besteht Kopplung zu anderen Regionen des Genoms?.....	106
4.4.5	Die abweichende Kartierung des polymorphen Proteinspots aV19.....	108
	Wie sicher ist unsere Kartierung: besteht Kopplung zu anderen Regionen des Genoms?.....	108
4.4.6	Die abweichende Kartierung des polymorphen Proteinspots mV82.....	109
4.4.7	Die abweichende Kartierung des polymorphen Proteinspots mV248.....	109
<b>4.5</b>	<b>Zusammenfassend: Anwendungen der Proteinkartierungen.....</b>	<b>110</b>
4.5.1	Neukartierte Proteine als Kandidaten für Krankheitsloci.....	111
4.5.2	Proteinphenotypen - wer verursacht den Phänotyp?.....	114
4.5.3	Identifizierung von variantem und nichtvariantem Spot des 2D-Gels.....	115
4.5.4	Nichtkartierbare Proteinpolymorphismen.....	117
<b>4.6</b>	<b>Die Biologische Aussage der Kartierung von Interspezies-Polymorphismen.....</b>	<b>119</b>
	Der Prozess der Artbildung.....	119
	Die Auflösung der genetischen Karte - warum kartieren viele Proteine auf gleiche Positionen?.....	120
	Analyse der Spotgruppen identischer, genomischer Position hinsichtlich der Abschätzung der Anzahl verschiedener Proteine auf einem 2DE-Gel.....	122
<b>4.7</b>	<b>cDNA-Kartierung - die physikalische Alternative.....</b>	<b>124</b>
<b>V.</b>	<b>Referenzen.....</b>	<b>128</b>

## ANHANG

### Chromosomenkarten:

Chromosom 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 und X der Maus

Legende zu den Chromosomenkarten

Tabelle1: Liste der polymorphen Proteinspost und Varianten in der cytosolischen Fraktion von Maus Gehirn.

Kartierungsposition, Kopplungswahrscheinlichkeiten und genetische Abstände

Legende zu Tabelle 1

Tabelle 2: Liste von polymorphen und nicht-polymorphen Spots, die zur selben Spotfamilien gehören, jedoch auf mehrere verschiedene Positionen der Mauschromosomen kartieren

Veröffentlichte Arbeiten

## Liste der Abbildungen

Abb.1.7.1	Ein Stammbaum der Gattung <i>Mus</i> .....	19
Abb.2.1.2	Die Rückkreuzung des EUCIB-Projekts .....	25
Abb.2.3	Erbgänge der Protein-Varianten .....	39
Abb.3.1.1	Die unterschiedliche Verteilung und Orientierung der B1-Elemente im Genom zweier Mauslinien bildet die Grundlage für +/- Polymorphismen und Längenpolymorphismen einer IRS-PCR .....	43
Abb.3.1.2.a)	IRS-PCR Produktpalette von Rückkreuzungstieren .....	44
Abb.3.1.2.b)	Hybridisierung eines radioaktiv markierten IRS-PCR-Produkts gegen eine komplexe Mischung genomischer IRS-PCR Produkte .....	44
Abb.3.1.2.c)	Filter mit IRS-PCR Produkten von 298 Rückkreuzungstieren .....	46
Abb.3.1.6.a)	Der Mikrosatellitenmarker D1Mit211 .....	54
Abb.3.1.6.b)	Der Mikrosatellitenmarker D19Mit12 .....	54
Abb.3.3.2	Bereiche der Chromosomen, in denen Kopplung nachgewiesen werden kann Chromosom 1-8, Chromosom 9-16, Chromosom 17-X .....	61, 62, 63
Abb.3.4.	Neukartierung der 3-Merkaptopyruvat-Schwefeltransferase (mV363) in der Maus .....	76
Abb.3.5.1	Strategie zur physikalischen Kartierung von EST-Sequenzen .....	78
Abb.3.5.3.a)	Koloniefilter-Hybridisierung: Hybridisierung einer cDNA gegen BAC-Klon-Filter .....	80
Abb.3.5.3.b)	Southernblot-Hybridisierung: Hybridisierung von restriktionsverdauten, geblotteten BAC-Klonen mit der entsprechenden, radioaktiv markierten cDNA .....	81
Abb.3.5.3.c)	Autoradiogramm der Hybridisierung eines radioaktiv markierten IRS-PCR-Produkts gegen einen YAC-Filter .....	83
Abb.3.5.3.d)	Ergebnisse der cDNA-Kartierungen .....	86
Abb.4.3.3	Die Segregation eines paV/aV- Polymorphismus und eines mV-Polymorphismus unter der Einflussnahme eines Modifikators .....	96
Abb.4.4.1	Die abweichende Kartierung des Proteinpolymorphismus mV147 .....	102
Abb.4.4.2	Kopplung der Variante paV410 .....	104
Abb.4.4.3	Kopplung der Variante mV134 .....	105
Abb.4.4.4.a)	Kopplung der Variante paV419 .....	106
Abb.4.4.4.b)	Kartierung der Fructose-Bisphosphat-Aldolase A, B und C .....	108
Abb.4.4.5	Die Kopplung der Variante aV19 .....	108
Abb.4.5.3	Massenspektrometrisch identifizierten Polymorphismen, die auf Strukturgenpolymorphismen beruhen und monogen bedingt sind und Polymorphismen, die auf der Einwirkung eines Modifier- oder Regulatorgenorts beruhen und vermutlich polygen bedingt sind .....	117
Abb.4.5.4	Die Segregation eines dominant vererbten Allels in der Rückkreuzungsgeneration B1 kann nur erfasst werden, wenn das dominante Allel von B6 stammt .....	118
Abb.4.6	Zahl der Proteinspots je Maus-Gewebe und Fraktion nach Klose .....	122

## Liste der Tabellen

Tab.2.1.2	Mikrotiterplatte mit DNA von Kontrolltieren (Reihe 1), von Tieren für die Proteinkartierung (dick gedruckt), sowie weiteren Rückkreuzungstieren der EUCIB-Kreuzung.....	27
Tab.2.2.3	Protokoll für eine sensitive Silberfärbung von 2D-Gelen.....	37
Tab.2.4.1	Zusammenstellen der Protein- und DNA-Segregationsdaten in Dateien.....	40
Tab. 3.1.3.a)	Handgespottete Filter mit 118 Rückkreuzungstieren.....	47
Tab. 3.1.3.b)	Mikrodispenser-gespottete Filter mit 303 Rückkreuzungstieren.....	47
Tab. 3.1.5.	Einsatzmöglichkeiten der IRS-PCR Marker für andere Mäusekreuzungen.....	51
Tab. 3.1.6	Mikrosatellitenmarker.....	53
Tab.3.2.a)	Die Analyse der Polymorphismen zwischen <i>Mus musculus</i> und <i>Mus spretus</i> .....	55
Tab.3.2.b)	Häufigkeit der verschiedenen Variationstypen.....	56
Tab.3.3.1	Zusammenhang zwischen der klassischen statistischen Methode, der Bayes'schen Analyse und der LOD-Wert Methode zur Analyse von Kopplung.....	57
Tab.3.3.2.a)	Anzahl der Proteinpolymorphismen, die Kopplung zum DNA-Markernetzwerk zeigen.....	64
Tab.3.3.2.b)	Kartierte Varianten.....	66
Tab.3.3.4.a)	Anzahl der kartierten Varianten der Mbx-Datenbank im Vergleich zu hiesigen Kartierung.....	67
Tab.3.3.4.b)	Berechnung der Länge von Chromosom 1 mit dem Algorithmus nach Haldane bzw. Kosambi.....	70
Tab.3.3.4.c)	Die Gesamtlänge der genetischen Karte.....	70
Tab.3.4.a)	Identifizierung von polymorphen Spotpärchen der Elternstämme <i>Mus musculus</i> (B6) und <i>Mus spretus</i> (SPR).....	71
Tab.3.4.b)	Genetisch kartierte Varianten, die sich nach der Identifizierung mit Massenspektrometrie als neukartierte Proteine erwiesen haben.....	72
Tab.3.4.c)	Genetisch kartierte Varianten, die sich nach der Identifizierung mit Massenspektrometrie als bereits kartierte Proteine erwiesen haben und in ihrer Kartierungsposition bestätigt wurden.....	73
Tab.3.4.d)	Genetisch kartierte Varianten, die sich nach der Identifizierung mit Massenspektrometrie als bereits kartierte Proteine erwiesen haben Ihre Kartierungsposition weicht jedoch von der in dieser Arbeit gefundenen ab.....	75
Tab.3.4.e)	Zusammenfassung der Kartierungs- und Identifizierungsergebnisse.....	75
Tab.3.5.2	Proteinspot, Identifizierung und korrespondierender cDNA / I.M.A.G.E Klon.....	79
Tab.4.3.2	Variationstyp und Vererbungsmodus der 1324 Polymorphismen (936 Varianten) von <i>Mus musculus</i> und <i>Mus spretus</i> .....	93
Tab.4.5.a)	Anwendungen der Proteinkartierungen: Genkartierung und Kartierung von Proteinphänotypen.....	110
Tab.4.5.b)	Liste der Proteine, die in dieser Arbeit in der Maus neu kartiert wurden.....	112
Tab.4.5.3	Identifizierung von variantem und nichtvariantem Spot des 2D-Gels.....	115

## Abkürzungen

EUCIB	European Collaborative Interspecific Backcross
MBx	European Collaborative Interspecific Backcross Database
YMO	EUCIB-Ankermarker ( <b>Y</b> es, an anchor, <b>M</b> apped + <b>O</b> rdered)
MSO	EUCIB-sekundärer Mikrosatellitenmarker ( <b>M</b> icrosatellite <b>O</b> rdered)
NMO	Marker von Nutzern der Kartierungskreuzung ( <b>N</b> ot an anchor, <b>M</b> apped + <b>O</b> rdered)
NNM	EUCIB-Marker ( <b>N</b> ot an anchor, <b>N</b> ot <b>M</b> apped)
2-DE	zweidimensionale Elektrophorese
a. bidest	destilliertes Wasser
A <sub>260</sub>	Absorption bei 260nm
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
B1	Rückkreuzungsgeneration 1
B6	<i>Mus musculus domesticus</i> C57BL/6
BAC	bacterial artificial chromosome (künstliches Bakterien-Chromosom)
CCR	Chromosome Committee Report
cM	Centimorgan
Cm	Chloramphenicol
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiaminteträressigsäure
EST	expressed sequence tag (ansequenzierter cDNA-Klon)
HMFM	Hogness Modified Freezing Medium
I.M.A.G.E.	Integrated Molecular Analysis of Genome Expression
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IRS	interspersed repetitive sequence (eingestreute repetitive Sequenzen)
IRS-PCR	interspersed repetitive sequence PCR
kb	Kilobasen
LB	Luria-Bertani Medium
mA	Milliampere
MALDI-MS	'Matrix assisted laser desorption ionisation' Massenspektrometrie
Mb	Megabasen
Mr	Molekulargewicht
Msp	<i>Mus spretus</i>
OD	optische Dichte
P1	Parentale Generation
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluorid
PTM	Posttranslationale Modifikation
QTL	quantitative trait locus
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SINE	short interspersed nuclear element
SNP	single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotidaustausch)
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Therm(ophil)us aquaticus</i>

TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
YT	Yeast, Trypton
U	Unit
ÜN	über Nacht
YAC	yeast artificial chromosome (künstliches Hefe-Chromosom)