

II. Material und Methoden

2.1 Molekulargenetische Untersuchungen

2.1.1 Material

Enzyme:

Restriktionsendonukleasen und Terminale Transferase wurden von der Firma New England Biolabs, Beverly, MA, USA bezogen, Klenow-Polymerase (5U/ul) von der Firma United States Biochemical USB, Cleveland, Ohio, USA. Taq-Polymerase wurde von Leo Schalkwyk nach Engelke (Engelke et al. 1983) hergestellt. Die Aktivität der gereinigten Fraktionen wurde empirisch ermittelt.

Größenstandards:

Phi X 174 DNA (HaeIII) Marker (Promega, Madison, U.S.A.): Fragmente der Grösse 118bp, 194bp, 234bp, 271bp, 281bp, 310bp, 603bp, 872bp, 1078bp und 1353bp

Lambda DNA (HindIII) Marker (Promega, Madison, U.S.A.): Fragmente der Grösse 23130bp, 9416bp, 6557bp, 4361bp, 2322bp, 2027, 564bp, 125bp

100bp DNA-Leiter (GibcoBRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA): Fragmente der Grösse 100bp, 200bp, 300bp, 400bp, 500bp, 600bp, 700bp, 800bp, 900bp, 1000bp, 1100bp, 1200bp, 1300bp, 1400bp, 1500bp, 2072bp

Oligonukleotide:

Mikrosatellitenprimer: Für die Amplifizierung der Mikrosatellitenloci (Dietrich et al. 1996 und Webseite des Whitehead Instituts/ MIT unter http://carbon.wi.mit.edu:8000/cgi-bin/mouse/sts_info?database=mouserelease) wurden folgende Primerpaare verwendet (die Sequenz des Primers für D1Mit234 wurde von Schalkwyk verändert (<http://www.mpimg-berlin-dahlem.mpg.de/~schalkwy/primer.html>) und Schalkwyk et al. 1999).

D1Mit234	5'-TCCATTATTCCCAGAACCCA-3' 5'-TCAATGTTATTTTTGCATC-3'
D1Mit211	5'-GTTATTCATCAAAACAGATGGCC-3' 5'-TCTGCTGCTAAGTAGAATGAATGC-3'
D8Mit4	5'-CCAACTCATCCCCAAAGGTA-3' 5'-GTATGTTCAAGGCTGGGCAT-3'
D16Mit4	5'-AGT TCC AGG CTA CTT GGG GT-3' 5'-GAG CCC TCA TTG CAA ATC AT-3'
D19Mit12	5'-TGC ATA TGT TTT CTC AAA TGT GG-3' 5'- GTT CCC ACC ACA CCT TTA TAC C-3'
DXMit81	5'-GAGGAGCATCAACCTTCTCG-3' 5'-GAGGTGGGGAGAAACAGAGG-3'

Die Amplifizierung der Loci wurde für alle Primerpaare bei einer Primer-Bindungstemperatur von 55°C durchgeführt.

B1R-Primer 5'-A GTT CCA GGA CAG CCA GGG CTA YAC AGA-3' (Himmelbauer et al. 1998b)

Vektorspezifische Primer: Primer für die Amplifizierung klonierter DNA der Vektoren pCMV-SPORT2 und pT7T3D-Pac:

pCMV-SPORT2:

Primer T3 5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA -3'
(20mer, geeignete Primer-Bindungstemperatur 48°C)

Primer T7 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
(20mer, geeignete Primer-Bindungstemperatur 45°C)

pT7T3D-PAC:

Primer T7 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
(20mer, geeignete Primer-Bindungstemperatur 45°C)

Primer 3/86 5'-CCG GTC CGG AAT TCC CGG GT-3'
(20mer, geeignete Primer-Bindungstemperatur 65°C)

Gefässe:

PCR-Reaktionsgefässe 'Thermofast-96', Advanced Biotechnologies LTD, Epsom, Surrey UK
Mikrotiterplatten mit Rundboden von der Firma Greiner Labor Technik, PS-Mikroplatte, KO, U-Form für Suspensionskulturen, Frickenhausen, FRG. Mikrotiterplatten mit flachem Boden der Handelsmarke Falcon von Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA.

DNA- und Protein-bindende Membranen:

Hybond N+ Nylon Transfer Membran (Amersham-Buchler GmbH, Braunschweig, FRG)
Immobilon PVDF Transfer Membran (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)

Geräte:

Pipettierroboter: 96-Kanal-Mikrodispenser (Hydra-96, Robbins Scientific, Sunnyvale, California)

PCR: Gene-Amp PCR-Amplifier 9600 von Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
PTC-100 Programmable Thermal Controller, Peltier-Effect Cycler, MJ Research Inc., Watertown, MA, USA

Roboter für Plasmidisolierung: PI-100S automatic plasmid isolation system, Kurabo Industries Ltd, Osaka, Japan

Schweissgerät: für das Verschliessen von 96-Loch Thermofastplatten mit Plastikfilm:
genetiX Limited, Christchurch, Dorset, UK

Puffer und Medien:

2 x YT-Medium: 16g Trypton, 10g Yeast extract, 5g NaCl mit A.bidest ad 1000 ml

LB-Medium: 10g Bacto Trypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl, mit A.bidest ad 1000ml, pH 7,2

Agarplatten: Zusatz von 16g/l Agar zu LB-Medium

10 x HMFEM: 0,45 % w/v Natrium-Citrat, 0,9 % w/v (NH₄)₂ SO₄, 1,8 % w/v KH₂PO₄, 6,3 % w/v K₂HPO₄, 44 % w/v Glycerin, 0,36 % v/v 1 M MgSO₄ (getrennt autoklavieren, und erst nach Abkühlung auf Raumtemperatur zusetzen)

Ampicillinstammlösung (1000 x): 50mg/ml Ampicillin gelöst in A.bidest

Chloramphenicolstammlösung (1000 x): 34mg/ml Chloramphenicol gelöst in Ethanol

Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH /1,5 M NaCl

EDTA: 0,5 M EDTA, pH 8,0 mit NaOH

Church-Puffer (Hybridisierungspuffer): 0.5 M Natriumphosphat pH 7,2 (0.5M Na⁺), 5% SDS, (original 7%), 1mM EDTA

Dehybridisierungslösung: 2 mM EDTA, 0.1 % SDS

1M Natriumphosphat (1 M Na⁺): 22,49g NaH₂PO₄ x 1H₂O + 59,4g Na₂HPO₄ ad 1L H₂O, pH 7,2

0,5 M Natriumphosphatpuffer (1 M Phosphat) für Konkurrenz: 0.5 M NaH₂PO₄ x 1 H₂O/ 0.5 M Na₂HPO₄, pH 6,8

20 x SSC (3.9 M Na⁺): 3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat x 2H₂O, pH 7,5 mit NaOH einstellen

10 x TE: 100 mM Tris- Cl (pH = 8,0), 10 mM EDTA (pH = 8,0)

TENS: 50 mM Tris, 100 mM EDTA, 200 mM NaCl, pH 9

KGB-Puffer (20x): 5 ml 1M Tris Base, 4,06g Kaliumglutamat, 2ml 1M Magnesiumacetat, 223ul Eisessig, mit A.bidest. ad 10ml

Ladepuffer: 11,3 ml Glycerin (87 %), 2,4 ml 0,5 M EDTA, 6,3 ml A.bidest, 1 Spatelspitze Bromphenolblau (0.25 % w/v)

50 x TAE: 242g Tris Base, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

LS (Labeling Solution): 50 ul Hepes Puffer (1M Hepes, pH 6.6 mit HCl eingestellt)
50 ul TM Puffer (250mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM MgCl₂, 50mM B-Merkaptoethanol)
14 ul Hexanukleotid (pd(N)₆, Pharmacia Biotech) einer Stammlösung mit einer A₂₆₀ von 6 U/ml

PCR-Puffer (1x): 35mM Tris-Base, 15mM Tris-HCl, 0.1% Tween 20, 50mM KCl
1.5mM MgCl₂, 0,015 mM Cresolrot (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)

Klonbanken:

cDNA – Banken: Einzelne I.M.A.G.E-Klone aus Klonbanken, die dem I.M.A.G.E Konsortium angeschlossen sind, wurden von einem Verteiler, dem RZPD, Berlin bezogen

Genomische Banken: Eine Maus BAC-Klonbank (Korenberg et al. 1999) wurde von Research Genetics (Huntsville, AL, USA) bezogen. Sie wurde aus genomischer DNA des Mausstamms 129sV hergestellt und enthält in 615 384-Loch Platten ca 200000 genomische DNA-Klone (Abzug von 15% Leerpositionen). Maus BAC-Koloniefilter wurden von Heinz Himmelbauer hergestellt und prozessiert (Himmelbauer et al. 1998a). Auf sieben Nylonmembranen der Grösse 22 x 22 cm sind die Klone von je 72 Platten - insgesamt 504 Platten - zweifach aufgetragen (Lehrach et al. 1990; Maier et al. 1997). Die durchschnittliche Grösse der klonierten DNA beträgt 130 kb. Ein Filterset (Filter 1-7) enthält demnach 8 Genomäquivalente genomischer DNA.

Maus-YAC-Klonbanken: ICRFy902, ICRFy903, WHTy910 und WHTy917 wurden vom RZPD Ressourcen Zentrum, Berlin, bezogen.

IRS-PCR-Produkt-Banken: Die Klonbank H57r enthält PCR-Produkte, die mit Primer B1R von genomischer DNA des Stammes *Mus musculus domesticus* C57BL/6 amplifiziert wurden (Schalkwyk et al., eingereicht bei Genome Research). Die Zahl der Klone beträgt ca. 71 x 384 = 27000 Klone. IRS-PCR –Produkte wurden von Martina Hopp und Ilona Dunkel der Arbeitsgruppe Dr. H. Himmelbauer am Max-Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin, auf Polymorphismen unter mehreren Mäusestämmen untersucht, indem komplexe IRS-PCR Amplifikate genomischer DNA verschiedener Mäusestämmen auf Nylonmembranen geblottet und nacheinander mit einzelnen, radioaktiv markierten IRS-PCR Proben hybridisiert wurden (Himmelbauer, unveröffentlicht). Die Klonbank 173r enthält PCR-Produkte, die mit Primer B1R von DNA des somatischen Zellhybriden EJ167

(Pickford 1989) amplifiziert wurden. Der Zellhybrid enthält Anteile der Maus Chromosomen 17 und 3 auf humanem Hintergrund. Die Klonbank enthält ca. 7000 Klone und wurde von Leo Schalkwyk am Imperial Cancer Research Fund, London, UK hergestellt. Die IRS-PCR Fragmente wurde in beiden Fällen in den Klonierungsvektor pAMP10 (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, USA) einkloniert.

2.1.2 Versuchstiere

Für die vorliegende Untersuchung wurden Mäuse aus dem EUCIB-Projekt verwendet (Breen et al. 1994). In diesem Projekt wurden zwei verschiedene Mäusespezies verwendet: *Mus musculus domesticus* C57BL/6J (B6) und *Mus spretus* (SPR). Die Tiere wurden am Clinical Research Centre, Harrow, UK, gezüchtet. Der Stamm C57BL/6J wurde ursprünglich vom Jackson Laboratory, Bar Harbour, Maine, USA, bezogen. Der Parentalstamm *Mus spretus* (M.spret.) wurde in Harrow als kleine Kolonie gehalten. Die Kolonie wurde durch wenige Tiere begründet, jedoch nicht systematisch ingezüchtet, da Überlebensfähigkeit und Fruchtbarkeit dadurch stark reduziert wurden.

Im Rahmen des EUCIB-Projektes wurden mit den zwei Mäusespezies eine Rückkreuzung durchgeführt; es wurden 983 Rückkreuzungstiere (B1-Generation) erzeugt. Die Durchführung der Kreuzung ist in Abb.2.1.2 dargestellt.

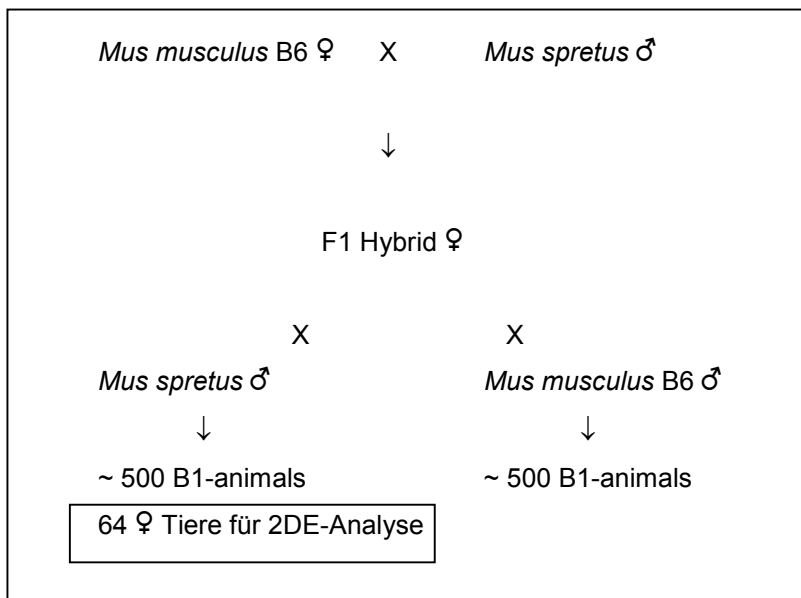


Abb.2.1.2
Die Rückkreuzung des
EUCIB-Projekts

Die weiblichen F1-Hybriden wurden sowohl mit *M. musculus* als auch mit *M. spretus* rückgekreuzt. 'LB' bezeichnet Tiere, die aus der Rückkreuzung mit B6 stammen, 'LS' bezeichnet Tiere, die aus der Rückkreuzung mit *Mus spretus* hervorgegangen sind. Für die Analyse von Proteinpolymorphismen wurden 64 Rückkreuzungstiere der Serie 'LS' eingesetzt (Kap.2.3).

Parental-Tiere:	F1-Tiere:	B1-Tiere (fe):			
B6 754 fe	22fe	LS546	LS570x	LS689x	LS713
B6 750 fe	2 fe	LS547	LS571	LS690	LS714
B6 751 fe	10 fe	LS549	LS572	LS692	LS718
B6 752 fe		LS550	LS574	LS693	LS720
B6 753 fe		LS551	LS575	LS694	LS721
B6 744 fe		LS552	LS576	LS695	LS722
M.spret. 899 male		LS554	LS577	LS696	LS724x
M.spret. 900 male		LS555	LS578	LS700	LS725
M.spret. 898 male		LS556	LS580x	LS701	LS726
M.spret. 897 male		LS558	LS581x	LS702	LS727
M.spret. 903 male		LS559	LS582	LS703	LS730
		LS560	LS584	LS705	LS731
		LS563	LS585	LS707	LS735
		LS564	LS586	LS708	LS741
		LS565	LS588	LS711	LS742
		LS569	LS589	LS712	LS743

Mäuse LS570x, LS580x, LS581x, LS689x und LS724x wurden im Rahmen des EUCIB-Projektes gezüchtet, wurden jedoch nicht mit DNA-Markern genotypisiert und sind daher nicht in der MBx-Datenbank enthalten. Die Typisierung dieser Mäuse mit DNA Markern wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Mit einbezogen in die Typisierung mit DNA Markern wurden 300 weitere Rückkreuzungstiere. Diese Tiere sind im Mikrotiterplattenformat angegeben (Tab.2.1.2). Tiere, die mit einem x vor der Nummer gekennzeichnet sind, wurden nicht zur Analyse mit DNA-Markern eingesetzt, da die vorhandenen DNA-Präparate keine ausreichende Qualität aufwiesen. Nummern der zur 2DE-Analyse (s.unten) eingesetzten Tiere sind dick gedruckt. Ausser den Parentalstämmen *Mus musculus domesticus* C57BL/6 (B6) und *Mus spretus* (SPR) wurden die Mäusestämme *Mus musculus musculus* PWB, *Mus musculus castaneus* CAST/Ei (Inzuchtstamm des Jackson Laboratoriums), *Mus spretus* MSP (Inzuchtstamm des Jackson Laboratoriums), sowie der Rattenstamm SHRSP und der Hamsterstamm A23 verwendet. Dies geschah, um zu testen, in welchen Mäusestämmen ein IRS-PCR Marker verwendet werden kann und ob ein Marker für die Typisierung auf Strahlungshybriden (Hintergrundspezies Hamster) eingesetzt werden kann.

Tab.2.1.2 Mikrotiterplatte mit DNA von Kontrolltieren (Reihe 1), von Tieren für die Proteinkartierung (dick gedruckt), sowie weiteren Rückkreuzungstieren der EUCIB-Kreuzung

B6	LS558	LS574	LS546	LS070	LS071	LS072	LS073	LS074	LS076	LS077	LS078
M.spret.	LS570x	LS575	LS547	LS090	LS091	LS093	LS095	xLS096	LS098	LS099	LS119
A23	LS581x	LS585	LS123	LS124	LS125	LS127	LS129	LS150	LS151	LS152	LS153
SHRSP	LS689x	LS586	LS178	xLS179	LS181	LS182	xLS183	LS184	xLS185	xLS186	LS187
PWB	LS552	LS589	LS191	LS192	LS193	xLS194	xLS195	LS197	LS199	xLS214	LS215
CAST	LS563	LS690	LS219	xLS220	LS221	LS222	xLS223	LS224	LS226	LS227	LS228
MSP	LS564	LS692	LS259	LS260	LS261	LS262	LS263	LS264	LS265	LS269	LS270
xH20	LS571	LS693	LS274	LS275	LS276	LS277	xLS278	LS279	xLS280	xLS281	LS282

Mikrotiterplatte mit DNA von Rückkreuzungstieren der EUCIB-Kreuzung – Platte E2

LS283	LS283a	xLS284	xLS285	LS286	LS287	xLS288	xLS289	LS310	LS311	LS312	xLS313
LS314	LS315	xLS316	xLS318	LS319	LS320	xLS321	xLS322	LS323	LS324	xLS325	LS326
xLS327	xLS328	xLS329	LS330	xLS331	xLS332	LS333	LS334	xLS335	LS336	xLS337	xLS338
xLS360	xLS361	xLS362	xLS363	LS364	xLS365	LS366	xLS367	LS368	LS369	xLS370	xLS371
xLS372	xLS373	LS374	LS375	LS376	LS377	xLS378	xLS379	LS404	LS446	xLS447	xLS448
xLS449	xLS450	LS451	LS452	LS453	xLS454	LS455	xLS456	xLS457	xLS458	xLS459	xLS460
xLS461	xLS462	xLS464	LS465	xLS466	xLS467	xLS468	xLS469	xLS470	xLS472	LS484F	LS485F
xLS486F	xLS487F	LS488F	LS489F	xLS490F	xLS491F	LS492F	LS493F	LS494F	xLS495F	LS546	LS547

Mikrotiterplatte mit DNA von Rückkreuzungstieren der EUCIB-Kreuzung – Platte E6, dick-gedruckte Tiere waren zur Proteinkartierung eingesetzt worden.

LS864F	LS865F	LS866F	LS867F	LS868F	LS869F	LS870F	LS871F	LS872F	LS873F	x538	LS562
LS580x	x710	LS724x	LS729	x740	LS758F	LS768F	LS834F	x843	LS694	LS695	LS696
LS548	LS549	LS550	LS551	LS554	LS555	LS556	LS557	LS560	LS561	LS565	LS566
LS568	LS569	LS559	LS576	LS577	LS578	LS579	LS582	LS584	LS572	LS587	LS588
LS699	LS700	LS701	LS702	LS703	LS704	LS705	LS706	LS707	LS708	LS709	LS711
LS712	LS713	LS714	LS715	LS716	LS717	LS718	LS719	LS720	LS721	LS722	LS723
LS725	LS726	LS727	LS728	LS730	LS731	LS732	LS733	LS734	LS735	LS736	LS737
LS738	LS739	LS741	LS742	LS743	LS756F	LS757F	LS759F	LS760F	LS761F	LS762F	LS763F

Mikrotiterplatte mit DNA von Rückkreuzungstieren der EUCIB-Kreuzung – Platte E4

LS764F	LS765F	LS766F	LS767F	LS769F	LS770F	LS771F	LS772F	LS773F	LS774F	LS775F	LS776F
LS777F	LS778F	LS779F	LS780F	LS781F	LS782F	LS783F	LS784F	LS785F	LS786F	LS787F	LS788F
LS789F	LS790F	LS791F	LS792F	LS790F	LS794F	LS795F	LS796F	LS797F	LS798F	LS799F	LS800F
LS801F	LS802F	LS803F	LS804F	LS805F	LS806F	LS807F	LS808F	LS809F	LS810F	LS811F	LS812F
LS813F	LS814F	LS815F	LS816F	LS817F	LS818F	LS819F	LS820F	LS821F	LS822F	LS823F	LS824F
LS825F	LS826F	LS827F	LS828F	LS829F	LS830F	LS831F	LS832F	LS833F	LS835F	LS836F	LS837F
LS838F	LS840F	LS841F	LS842F	LS844F	LS845F	LS846F	LS847F	LS848F	LS849F	LS850F	LS851F
LS852F	LS853F	LS854F	LS855F	LS856F	LS857F	LS858F	LS859F	LS860F	LS861F	LS862F	LS863F

2.1.3 Methoden

Mikrobiologische Methoden:

Kulturen: Flüssigkulturen mit Selektivmedium wurden mit Einzelkolonien beimpft. Die Anzucht erfolgte über Nacht in 50ml Falcon-Röhrchen bei 37°C im Schüttelinkubator. Selektionsplatten wurden aus autoklavierter Agarlösung hergestellt, der nach Abkühlung auf 50°C 1/1000 Volumen Antibiotikastammlösung zugesetzt wurde (Endkonzentrationen 50 mg/l Ampicillin, 34 mg/l Chloramphenicol)

Die Entnahme von Klonen aus einer Klonbank: 384-Loch Platten werden mit Plastikband zu Blocks von 24 Stück gebündelt und - in Plastikfolie eingeschweisst - bei -70 °C gelagert. Zur Entnahme von Koloniematerial aus einzelnen Löchern einer Platte wurde der entsprechende Block auf Trockeneis gelagert und geöffnet. Die gewünschte Platte wurde auf Trockeneis plaziert und mit einem Stück autoklavierten Filterpapiers abgedeckt, in das ein Loch zur Entnahme des Koloniematerials gestanzt war. Mit einer sterilen Pinzette wurde gefrorenes Material aus dem gewünschten Loch der Platte gekratzt und auf eine Agarplatte gestrichen. Die Abdeckung der Platte mit Filterpapier schützt die umliegenden Löcher vor Kontamination.

Einfrieren von Klonen: Einzelne Klone wurden in Glycerin bei -80°C eingefroren: hierzu wurden 200 ul einer Übernachtskultur mit 200 ul autoklaviertem Glycerin gemischt. Grösseren Zahlen von Klonen wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten verwendet. Pro Loch wurden 200 ul LB-Selektivmedium/ 1 x HMFM-Medium eingefüllt und die Löcher mit Einzelkolonien beimpft. Nach Anzucht über Nacht bei 37 °C wurden die Platten in Frischhaltefolie gewickelt, auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Molekularbiologische Methoden:

Elektrophorese von DNA: Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurde nach Standardprotokoll in Flachbettelektrophoreseapparaturen durchgeführt (Sambrook et al. 1989). Für alle Anwendungen wurden 1% Agarosegele in 1xTAE-Puffer eingesetzt. Eine Ausnahme bildeten Gele zur Trennung von DNA-Fragmenten kleiner als 300bp (z.B. Mikrosatelliten DNA), hier wurden 4% Gele aus "Small DNA Agarose" in 1xTAE-Puffer verwendet (Small DNA Agarose, Trennbereich 70-300bp, Biozym, Hessisch Oldendorf, FRG). Der Agaroselösung wurden 3ul einer 1% Ethidiumbromidlösung (Merck) zugesetzt (3ul/200ml = 0.015 %), das Gel aber nach dem Lauf bei Bedarf in 10ul 1% Ethidiumbromid/ 200ml 1xTAE nachgefärbt. Die Trennung erfolgte über 2 h bei 4-6V/cm.

Als Grössenstandard diente die DNA 100bp Leiter (Gibco BRL). Das Gel wurde fotografiert oder bei geringer Produktmenge geblottet und anschliessend hybridisiert (s. Kap2.1.1).

Übertragung von DNA-Fragmenten auf eine Nylonmembran (Southernblot): Für den Transfer grosser DNA Fragmente (Restriktionsverdau genomischer DNA) wurde das Gel in einem ersten Schritt für 20 min in 0.25M HCl depurinert. Der DNA werden Strangbrüche zugeführt, sie lässt sich in Form von kleineren Fragmenten effizienter transferieren. Nach kurzem Spülen des Gels mit Wasser wurde das Gel 2 x 20 min in Denaturierungslösung geschüttelt und mit der Oberseite nach unten auf zwei in Denaturierungslösung getränkte Filterpapiere (Whatman) gelegt. Eine Hybond N+ Nylonmembran wurde in Denaturierungslösung angefeuchtet

und auf die Unterseite des Gels gelegt, gefolgt von zwei weiteren Filterpapiereblättern und einem Stapel Papierhandtüchern (10cm). Das "Blotsandwich" wurde mit einer Plastikplatte bedeckt und mit einem Gewicht beschwert. Der DNA-Transfer erfolgte über Nacht. Nach Neutralisierung der Nylonmembran für 5 min in 100mM Natriumphosphatlg, pH 7.2, Trocknung für 15 min bei RT und UV-Bestrahlung (1200 μ J x 100, Stratalinker, Stratagene, La Jolla, California) wurde die Blotmembran bis zur Hybridisierung zwischen Filterpapier gelagert.

Isolierung von genomischer DNA: Leberstücke einer Grösse von wenigen mm³ wurden in einem 2ml Eppendorfggefäss mit passendem Plastikpistill im Dampf flüssigen Stickstoffs gemörsert. Nach Zugabe von 1000 μ l TENS und 30 μ l Proteinase K (10mg/ml) wurde die Probe über Nacht bei 55°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Die Proben wurden zweimal mit je 1 ml Phenol gründlich mehrere Minuten lang gemischt und 5 min in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugiert (14000 rpm). Die wässrige Phase wurde entnommen und mit 1 ml Chloroform extrahiert. Durch Zugabe von 100 μ l Natriumacetat (3M, pH5.6) und 800 μ l Isopropanol wurde die DNA aus der wässrigen Phase gefällt, anschliessend abzentrifugiert und mit 70 % Ethanol (reinst) gewaschen. Die DNA wurde ein bis drei Tage unter leichtem Schütteln bei 55°C in 200 μ l 1 x TE gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über den Vergleich mit der Bandendicke einer definierten Menge des Grössenstandards Lambda HindIII auf einem 1% Agarosegel.

Isolierung von BAC-DNA: Zur Isolierung von BAC-DNA wurden 100 ml einer Übernachtskultur in LB-Medium eingesetzt.

Die Aufreinigung erfolgte mit QIAGEN-tip 100 Säulen nach Angaben des Herstellers (QIAGEN Plasmid Purification Kit, QIAGEN, Hilden, FRG). Nach Elution von der Säule wurde die DNA in 100 μ l 1xTE gelöst. Ihre Qualität wurde auf einem Agarosegel kontrolliert, ihre Konzentration aus dem Vergleich mit DNA bekannter Konzentration abgeschätzt. Grössere Anzahlen von BAC-Präparationen wurden in einem Roboter nach Angaben des Herstellers mit 25 ml \bar{U} N-Kultur in 2 x YT durchgeführt (PI-100S automatic plasmid isolation system, Kurabo, Japan). Die DNA wurde in 50 μ l TE gelöst.

Restriktionsverdau von DNA: Restriktionsverdau von BAC-DNA wurden als Doppel- oder Einzelverdau in einem Volumen von 20 μ l mit 10-15 μ l (ca 20ng/ μ l) Plasmid DNA durchgeführt. Der Ansatz enthielt je 1 μ l des Restriktionsenzym (20U/ μ l) im Puffer des Herstellers und wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde auf einem 17 cm langen 1% Agarosegel neben dem Grössenstandard Lambda HindIII aufgetragen. Für die Photographie wurde ein Lineal neben das Gel gelegt, damit die Grösse der positiven Banden - nach Transfer der DNA auf eine Nylonmembran und Hybridisierung - anhand des Grössenstandards bestimmt werden konnten. Der Verdau genomischer DNA wurde mit 5 μ g DNA in einem Reaktionsvolumen von 30 μ l als Doppel- oder Einzelverdau mit 20U des Restriktionsenzym bei 37°C über Nacht durchgeführt. Die DNA des gesamten Ansatzes wurde gefällt, auf ein 1% Agarosegel (ohne Ethidiumbromid) geladen, über eine Laufstrecke von 10 cm getrennt (20V 6,5 h, 1V/cm) und das Gel in Ethidiumbromidlösung gefärbt.

Fällung von DNA: Für die Trennung auf einem Agarosegel mussten die DNA-Fragmente eines Restriktionsverdau von 20 oder 30 μ l gefällt und in einem kleineren Volumen aufgenommen werden. Hierzu wurde der Ansatz durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,6 - 6) auf eine Endkonzentration von 0.3N Natriumacetat eingestellt. Durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol und Inkubation für 10 min auf Eis wurde die DNA gefällt. Sie wird in einer Eppendorfzentrifuge 10 min abzentrifugiert, der Überstand wird abgenommen, die DNA 5 min luftgetrocknet und in 10 μ l 1 x TE bei RT gelöst.

Reinigung von PCR Produkten: PCR-Produkte wurden für die Sequenzierung mittels QIAQUICK PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers über Säulen gereinigt. 2,5 μ l des Eluats von 50 μ l wurden auf einem 1% Agarosegel kontrolliert und Konzentrationen im Vergleich mit DNA bekannter Konzentration abgeschätzt.

IRS-PCR Produkte von BAC-Klonen wurden vor der radioaktiven Markierung über ein 1 % LowMelt Agarosegel (Agarose mit erniedrigtem Schmelzpunkt 'SeaPlaque GTG' von FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) gereinigt: 15 μ l der 30 μ l PCR-Reaktion wurden aufgetragen und Fragmente unter langwelligem UV Licht (366nm) ausgeschnitten, mit gleichem Volumen (ca.30 μ l) 1 x TE versetzt und für den Einsatz zur radioaktiven Markierung 10 min bei 65°C geschmolzen. Für die radioaktive Markierung wurden 12 μ l eingesetzt.

Sequenzierung von PCR Produkten: Sequenzierungen wurden von der Service-Gruppe (Leiter Richard Reinhardt) am Max-Planck-Institut durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden Vektorprimer (T3 und T7 für pT7T3D-Pac klonierte DNA und T7 und 3/86 für pCMV-SPORT2 klonierte DNA) eingesetzt. Die eingesetzte Plasmid-DNA war mit dem QIAQUICK PCR Purification Kit von Nukleotiden und Primern gereinigt worden.

DNA-Amplifizierung mit PCR: Mikrosatelliten-PCR: Mikrosatellitenloci (SSLP Loci) wurden folgendermassen amplifiziert: 30 ng genomische Maus-DNA wurden mit je 0.2 uM des jeweiligen Primerpaares und 250 uM jedes Nukleotids in 1x PCR-Puffer in einer 30 ul Reaktion amplifiziert. Um eine möglichst hohe Spezifität der Primerbindung und damit der Amplifizierungsreaktion zu erhalten, wurde folgendes PCR-Programm verwendet (Schalkwyk et al. 1999): Denaturierung 2 min bei 94°C, gefolgt von 6 Zyklen, mit schrittweiser Absenkung der Primer-Bindungstemperatur um 1°C (30 s 94°C, 30 s 61°C (-1°C/Zyklus), 1 min 72°C), und 27 Zyklen mit einer Primer-Bindungstemperatur von 55°C (,touchdown' PCR). Primerpaare D1Mit234 und D16Mit4 wurden mit doppelter MgCl Konzentration (3mM) amplifiziert. 15 ul der PCR Reaktion wurden auf einem 4% Agarosegel analysiert.

PCR von plasmidklonierten Sequenzen: Amplifizierung von ESTs, die in Plasmiden pT7T3D-Pac oder pCMV-SPORT2 kloniert waren, wurde mit vektorspezifischen Primern durchgeführt. Das Reaktionsvolumen von 30 ul enthielt 0,25 uM jedes Primers, 125 uM jedes Nukleotids, 1 x PCR-Puffer und sehr wenig Material einer Einzelkolonie, das mit einer Pipettenspitze von einer Selektivplatte entnommen wurde. Als Primerpaar für das Plasmid pT7T3D-Pac dienten T7 und T3, für pCMV-SPORT2 T7 und 3/86. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1 x 3min bei 94°C, 35 x (30 s bei 94°C, 30 s bei 42°C, 60 s bei 72°C). 2,5 ul der Reaktion wurden auf einem 1% Agarosegel geprüft.

IRS-PCR: PCR-Reaktionen von genomischer Maus-DNA wurden in einem Volumen von 60ul in 96-Loch 'Thermofast' Platten durchgeführt. Das Reaktionsgemisch enthielt 50ng DNA, 125uM jedes Nukleotids und 1ug B1R-Primer in 1x PCR-Puffer. Es wurden pro Reaktion 0,2 - 2 ul Taq Polymerase eingesetzt (in Abhängigkeit von der Verwendeten Taq-Charge, Kap.2.1.1). Die PCR wurde beginnend mit einem Denaturierungsschritt von 3 min bei 94°C unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 30 s bei 94°C, 30 s bei 65°C, 180s bei 72°C (35 Zyklen) (Himmelbauer et al. 1998b). Zur Überprüfung der Produkte wurden von jeder PCR-Reaktion 5ul mit Ladepuffer versetzt und auf einem 1% Agarosegel kontrolliert. PCR-Reaktionen an DNA-Vorlagen geringer Komplexität wie BAC-Klonen oder BAC-DNA (ca 130kb) oder klonierten IRS-PCR Fragmenten (bis 2 kb) der Klonbank H57r (Kapx) wurden in einem Volumen von 30 ul mit nur 200ng B1R-Primer und sehr wenig Koloniematerial einer Einzelkolonie bzw. 1ng Plasmidisolat durchgeführt. Die PCR-Reaktion wurde mit einer Elongationszeit von 60 s durchgeführt, da im Gegensatz zur Amplifizierung genomischer DNA keine komplexe Produktpalette, sondern nur 1-3 PCR-Produkte entstehen.

Herstellung von Hybridisierungsfiltren: Das Aufbringen von DNA auf Nylonmembranen mittels Pipette oder Pipettierroboter wird mit dem englischen Ausdruck "spotting" bezeichnet. Die Ausdrücke "Filter" und "Membranen" werden synonym benutzt und bezeichnen Hybond N+ Nylonmembranen mit aufgetragener DNA. Das Anfärben der PCR-Reaktion vor dem Aufbringen auf Membranen ermöglicht eine einfache Kontrolle des Spottings. PCR Reaktionen wurden deshalb entweder in PCR Puffer durchgeführt, der Cresolrot enthielt oder nachträglich durch die Zugabe von 1/6 Volumen Bromphenolblau-haltigen Ladepuffer blau angefärbt. Je 1 ul der PCR-Reaktionen wurden entweder von Hand mit einer 8-Kanalpipette oder mit einem Pipettierroboter auf eine 7,4 x 11,2 cm grosse Hybond N+ Nylon Membran aufgetragen.

Für das Spotten mit dem 96-Kanal-Pipettierroboter wurden folgende Vorbereitungen getroffen:

Die PCR-Reaktionen wurde in 96-Loch Mikrotiterplatten mit rundem Boden umgefüllt (Firma Greiner Labortechnik, PS-Mikroplatte, KO, U-Form für Suspensionskulturen, Frickenhausen). Beim Übertragen der PCR-Reaktionen in die neue Platte wurde ihre die Anordnung beibehalten, insbesondere wurden PCR Reaktionen, die aufgrund mangelnder Qualität nicht gespottet werden sollten, durch das gleiche Volumen 1/7 verdünnten Ladepuffers ersetzt.

Nylonmembranen wurden mit einem Tintenstempel numeriert und der besseren Handhabbarkeit halber für das Spotten mit Tesafilmstreifen auf Deckeln von Mikrotiterplatten befestigt (Q Covers PS, GENETIX UK) die Positionen der höhenverstellbaren Glasspritzen wurden für die Arbeitsschritte Füllen der Glasspritzen, Spotten und Waschen ermittelt. Die Positionierung der Glasspritzen möglichst dicht über dem Boden der Rundbodenplatten erlaubte eine luftblasenfreie Aufnahme von 40 ul PCR-Reaktion aus 50 ul Ausgangsvolumen

und damit die Herstellung von 40 Filtern. Auch für das Spotten stehen die Spritzen möglichst dicht über der Membran.

Um den Fluss der Lösung aus den Spritzen zu aktivieren, wurden die ersten μl auf Filterpapier gespottet, bevor mit dem Auftrag auf Nylonmembranen begonnen wurde.

Mit dem Pipettierroboter konnten auf einer Membran der Grösse 7 x 11 cm Proben aus vier 96-Loch Mikrotiterplatten (= 384 Proben) jeweils in etwas versetzten Positionen aufgebracht werden (siehe Abb. 3.1.2.c)). Vor dem Wechsel der DNA-Probenplatte wurden die Glasspritzen viermal mit autoklaviertem A.bidest gespült.

Filterprozessierung: Direkt nach dem Spotten wurden die Filter auf fehlende Auftragspositionen überprüft und diese für jeden einzelnen Filter in einer Liste festgehalten. Anschliessend wurden die Membranen mit der DNA-Seite nach oben für 1 min auf Filterpapier gelegt, das mit Denaturierungs-lösung (1.5 M NaCl / 0.5M NaOH) getränkt war, und für 1-2 min in 0.5 l Natriumphosphat (50 mM Natrium, pH 7.2) neutralisiert. Um die DNA kovalent an die Membran zu binden, wurden die Filter im Stratalinker (Stratagene, La Jolla, California) mit $1200\mu\text{J} \times 100$ bei 254nm UV-bestrahlt.

Radioaktive Markierungen („random priming“ nach Feinberg und Vogelstein, 1983): PCR-Produkte, cDNAs, (BAC-Klone): 12 μl (ca. 50ng DNA) wurden 1 min bei 95°C denaturiert und bis zur Zugabe des Reaktionsmix auf Eis gestellt. Der Reaktionsmix für die radioaktive Markierung besteht aus: 18 μl LS, 3 μl dNTPs (je 33,3 μM dATP, dGTP, dTTP, Herstellung aus gleichen Volumina der 100 μM Stammlösungen), 3 μl BSA (5mg/ml), 0.5 μl Klenow-Polymerase (5 U/ μl , USB) und 1-2 μl [α - ^{32}P] dCTP (10 mC/ml, 3000mCi/mmol [α - ^{32}P] dCTP, Amersham Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei RT.

IRS-PCR Marker wurden mit dem Primer B1R amplifiziert. Der PCR-Ansatz wurde 1:20 mit 1 x TE verdünnt. Davon wurden 1 μl mit 11 μl H₂O versetzt und für die radioaktive Markierung eingesetzt.

B1R-Amplifikate von BAC-Klonen wurden zur Abtrennung der Template-DNA (BAC-Vektor und grosses genomisches Insert, ca. 130 kb) über ein LowMelt-Agarosegel gereinigt (Kap.2.1.3). 12 μl wurden für die radioaktive Markierung eingesetzt. Der gesamte Ansatz wurde in 10 ml Church-Puffer zur Hybridisierung eingesetzt.

Von gereinigten Amplifikaten klonierter cDNAs wurden 50ng eingesetzt und je nach Grösse des Hybridisierungsfilters 1 μl oder 2,5 μl [α - ^{32}P] dCTP (10-25 uCi, 3-8 pmol) eingesetzt. Der gesamte Ansatz wurde in 2,5ml oder 10 ml Church-Puffer gegeben und zur Hybridisierung eingesetzt.

Markierung von Oligonukleotiden: Für die Markierung des (CA)₂₀-Oligonukleotids (Mikrosatellitensonde) wurde Terminale Transferase benutzt. Der Reaktionsansatz enthielt 1 μl KGB-Puffer (20x), 20 ng (CA)₂₀, 1 μl Terminale Transferase (15U/ μl), 1 μl [α - ^{32}P] dCTP (10uCi/ μl) und wurde mit A.bidest auf 10 μl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 2h bei RT.

Test für den Einbau von Radioaktivität in Sonden (Stawinski et al. 1977; Narang et al. 1980):

0.5 μl der radioaktiven Markierungsreaktion wurden 2 cm über dem untere Ende eines ca. 7cm langen Streifens einer Cellulose-Polyethyleniminfolie (Machery Nagel, 0.1 mm oder Polygram CEL 300PEI; Brinkmann) aufgetragen und der Auftragsort mit Bleistift markiert. Zur chromatographischen Trennung der radioaktiv markierten DNA-Fragmente von nicht-eingebauten radioaktiven Nukleotiden des Reaktionsansatzes wurde die Folie mit dem unteren Ende für ca. 30 min bei RT in ein Becherglass gestellt, das auf eine Höhe von 0.5cm mit 1M Natriumphosphat (0.5M, 1M Phosphat, pH6.8) gefüllt war, anschliessend in Frischhaltefolie verpackt und auf Film exponiert. Der Film wurde nach ca. 30 min entwickelt. Das Verhältnis von eingebautem zu freiem [α - ^{32}P] dCTP wurde anhand der Schwärzung des Films abgeschätzt und betrug bei Markierungen mit Terminaler Transferase ca. 50 %, bei “random priming” mehr als 80%.

Hybridisierungen: Filtergrösse: Membranen der Grösse 7 x 11 cm wurden in Church-Puffer (Church und Gilbert, 1984) angefeuchtet, mit Hilfe einer Glaspipette zusammengerollt und in ein 15 ml-Falcon Röhrchen gegeben, das 10 ml Church-Puffer enthielt. Falcon-Röhrchen wurden in einem Ständer im Schüttelwasserbad inkubiert. Grössere Membranen wurden in Plastikfolie eingeschweisst und auf einer Wippe im

Heissluftinkubator inkubiert. Um eine gleichmässige Verteilung der Sonde während der Hybridisierung im Plastikbeutel zu gewährleisten, wurde ein wassergefüllter Plastikbeutel als Beschwerung auf den Hybridisierungsbeutel gelegt.

BAC-Koloniefilter der Grösse 22 x 22 cm wurden entweder in Glasflaschen (maximal 4 Filter pro Flasche mit 20 ml Church-Puffer) im Hybridisierungssofen hybridisiert oder es wurden, was sich als besonders praktikabel erwies, alle 7 Filter des Filtersets (Kap.2.1.1.) gemeinsam in einer Plastikbox mit Deckel in 35 ml Church-Puffer auf einer Wippe im Heissluftinkubator hybridisiert. Zur Abdichtung wurde ein grosses Stück Frischhaltefolie auf die Filter gelegt und über die Ränder der Box geklappt. Sie dichtet mit Schliessen des Deckels die Box ab und verhindert ein Verdunsten der Lösung und Austrocknen der Filter.

Southernblots der Grösse 2 x 8 cm mit genomischer DNA mussten flach liegend hybridisiert werden und wurden deshalb in Klarsicht-Prospkthüllen eingeschweisst und in einem geringen Volumen von 2,5 ml Church-Puffer hybridisiert. Sie wurden ebenfalls mit einem Wasserbeutel beschwert.

Vorhybridisierung, Konkurrenz und Hybridisierung: Vor der Zugabe der radioaktiv markierten Sonde wurden Falcon-Röhrchen und Plastikboxen mit Church-Puffer und Filtern auf Hybridisierungstemperatur gebracht (Vorhybridisierung). Vorhybridisierungen in Church-Puffer bei 65°C (mindestens 20min oder über Nacht) wurden bei unbenutzten BAC-Koloniefiltern durchgeführt, um Koloniematerial zu entfernen und bei unbenutzten YAC-Poolfiltern, um Hybridisierungssignale der Tintenpunkte (!) zu blockieren. Der radioaktive Markierungsansatz wurde entweder durch Zugabe von 5ul 1M NaOH oder durch Erhitzen für 1 min auf 94°C denaturiert, zum vorgewärmten Church-Puffer pipettiert und gut durchmischt.

Um die Hybridisierung repetitiver Anteile der IRS-PCR-Marker zu vermindern, wurde Konkurrenz durchgeführt (Litt und White 1985). Hierbei hybridisieren möglicherweise vorhandene, radioaktiv markierte repetitive Anteile einer Sonde mit den repetitiven Sequenzen unmarkierter, sonifizierter genomischer Maus DNA und sind damit der folgenden Filterhybridisierung entzogen. Der radioaktive Markierungsansatz von 30 ul wurde mit 63 ul Konkurrenzmix folgender Zusammensetzung inkubiert: 5 ul 0,5M EDTA, 25 ul genomische DNA (Maus, 4ug/ul, Grösse 500-2000bp), 18 ul H₂O, 15 ul Natriumphosphatlösung (0.5 M Na₂HPO₄/ 0.5 M NaH₂PO₄, pH 6,8). Der gesamte Ansatz wurde für 10 min bei 94°C denaturiert, für 2 h bei 65°C in einer PCR Maschine inkubiert und anschliessend schnell (ohne Abkühlung) zum vorbereiteten, vorgewärmten Filter pipettiert.

Hybridisierungen von IRS-PCR Produkten wurden für 1-3 Tage bei 65 °C durchgeführt. Hybridisierungen mit der Oligonukleotidsonde (CA)₂₀ wurden für 12 Stunden bei 42 °C durchgeführt.

Waschbedingungen und Filmexposition: Die Hybridisierung wurde durch zwei Waschschrte beendet: zur Entfernung unspezifisch gebundener DNA wurden die Filter (maximal 20 Filter der Grösse 7 x 11 cm in 1.5 L Waschlösung) in einer verschliessbaren Plastikbox mit Deckel bei 65 °C einmal 30 min mit 2 x SSC/0.1% SDS und anschliessend 30 min mit 0.1 x SSC/0.1% SDS Lösung gewaschen. Die erste Lösung hatte RT, während die zweite auf 65°C vorgewärmt wurde. Der zweite Waschschrte wurde wiederholt, wenn sich nach der Exposition herausstellte, dass der Filter starke, unspezifische Hintergrund-hybridisierung aufwies. BAC-Koloniefilter wurden 2 x15 min gewaschen, um die Beanspruchung der Filter herabzusetzen. Mit Oligonukleotiden hybridisierte Membranen wurden im 2. Schritt mit 0.2 x SSC gewaschen.

Für die Exposition wurden die Filter auf wachsbeschichtetes, stabiles Filterpapier ('Benchkote'-Papier, Whatman Ltd, Maidstone, UK) gelegt, vorsichtig mit Filterpapier abgetupft, in Frischhaltefolie eingewickelt und in Metallkassetten mit Verstärkerfolie ("intensifying screen") bei -80°C 2-3 Tage auf Kodak XAR Film exponiert und anschliessend entwickelt.

Wiederverwendung von Filtern (Dehybridisierung): Membranen mit kovalent gebundener DNA können von der - bei der Hybridisierung nicht kovalent bindenden - radioaktiv markierten DNA-Sonde durch Waschschrte befreit werden. Das Entfernen der Sonde wurde erst 3-4 Wochen nach der Hybridisierung durchgeführt, weil die DNA-Sonde durch den radioaktiven Zerfall des Isotops [α -³²P] in kleine Fragmente zerfällt, die sich leichter abwaschen lassen.

Die Membranen wurden in einer Plastikbox mit wenig Dehybridisierungslösung (0.1% SDS/ 2mM EDTA) im 65°C Wasserbad aufgewärmt (ca. 15 min). Die Dehybridisierungslösung wurde verworfen, durch 1-1,5 L 85°C heisse Lösung ersetzt und weitere 30 - 60 min im 65°C Wasserbad geschüttelt. Eine Messung der restlichen Strahlung mit einem Geiger-Müller Zähler von <= 20 cpm pro Filter galt als zufriedenstellendes Ergebnis.

Auswertung von Hybridisierungsfiltren: Filter mit Rückkreuzungstieren: Autoradiogramme wurden manuell ausgewertet. Auf einer transparenten Folie in der Grösse des Hybridisierungsfilters wurden die Positionen markiert, auf die keine DNA-Probe oder eine Probe schlechter Qualität aufgetragen worden war. Die Folie wurde über das Autoradiogramm gelegt und diente der Berücksichtigung oben genannter Proben bei der Beurteilung von Signalintensitäten. Die Daten wurden in eine web/internet-basierte Vorlage - ein Abbild des Filters - eingegeben. Ihr liegt eine Liste aller aufgetragenen Proben des Filters zugrunde. Die Daten werden den Proben zugeordnet und in Form einer Liste ausgegeben.

Für den Vergleich von Daten, die von verschiedenen Personen erhoben worden waren, diente das Programm 'mbxmerge' (Markus Kramer). Übereinstimmende Daten wurden übernommen, widersprüchliche Daten wurden aus dem Datensatz entfernt. Für die genetische Kartierung wurden die korrigierten Datensätze eingesetzt.

BAC-Koloniefilter: Autoradiogramme wurden mit einer CCD Kamera aufgenommen und als Datei des Formats 'Bitmap' gespeichert. Bilddateien wurden mit dem Programm 'Winclone' (unveröffentlicht, Markus Kiezmann, Max-Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin) bearbeitet. Durch Anklicken der vier Eckpunkte des Autoradiogramms wird ein Gitter auf das Bild gelegt. Jedes Kästchen des Gitters entspricht einer Auftragsposition einer 384-Loch-Platte. Die Auswertung besteht darin, den Hybridisierungssignalen innerhalb eines Kästchens Spotting-Positionen (Positionen 1-12) zuzuordnen. Das Programm ermittelt, aus welcher Mikrotiterplatte der Klon stammt. Da die Klonbank auf 7 Filtern gespottet wurde, musste zur Ableitung der Klonkoordinaten auch die Nummer der Mikrotiterplatte der Klonbank eingegeben werden. Die Klonkoordinaten wurden in einer Textdatei ausgegeben und der Klon kann aus der entsprechenden Platte der Klonbank entnommen werden.

YAC-Poolfilter: YAC-Klonbanken ICRFy902, ICRFy903, WHTy910 und WHTy917 wurden vom RZPD, Berlin bezogen. Klonbank WHTy917 besteht aus 400 96-Loch-Platten (Haldi et al. 1996), d.h. ca. 40 000 Klone mit einer durchschnittlichen Grösse von 820 kb, WHTy910 aus 200 Platten (Kusumi et al. 1993) und ICRFy902 und ICRFy903 bestehen aus insgesamt 200 Platten. Diese Klonbanken wurden zur Herstellung der Filter von Leonard Schalkwyk verwendet. Die Einzelklone wurden zu Mischungen ('pools') zusammengefasst. Die Klone eines Stapels von 8 96-Loch-Platten wurden in drei räumlichen Dimensionen zusammengemischt (gepoolt): Kulturmaterial der 96 Klone einer Platte wurden zusammengefasst zu einem Plattenpool, das ergibt 8 Plattenpools 1-8. Kulturmaterial der Klone A1-A8 aller 8 Platten wurden zu Säulenpools zusammengefasst, insgesamt entstehen 12 Säulenpools A-H. Kulturmaterial der Klone A1-H1 aller 8 Platten wurden zu Reihenpools zusammengefasst, insgesamt entstehen 8 Reihenpools 1(A-H) - 8(A-H). Die 8 x 96 Klone von 8 Platten wurden in 28 Pools zusammengefasst und in 28 Positionen einer Mikrotiterplatte untergebracht. Durch Erstellen von Pools wurden die 61000 Klone der 641 96-Loch-Platten zu 2243 Klonmischungen ('pools') zusammengefasst. Nach DNA-Präparation wurden die Pools mit dem IRS-PCR-Primer B1R amplifiziert und die Produkte mit einem Roboter auf eine Nylonmembran der Grösse 7 x 11 cm zweifach aufgetragen (Schalkwyk et al. eingereicht bei Nature Genetics, zur Vorgehensweise beim 'Pooling' und 'Spotting' siehe auch (Hunter et al. 1994).

Die Evaluierung von Hybridisierungssignalen auf YAC-Poolfiltern erfolgte manuell. Die Hybridisierungssignale wurden auf eine Internet-basierte Eingabevorlage übertragen (einen sogenannten 'virtuellen Filter'). Jeweils drei Hybridisierungssignale - ein Plattenpool-, ein Reihen- und ein Säulenpoolsignal - identifizierten einen YAC-Klon. Als Ausgabedatei erhält man eine Liste der Adressen der identifizierten YAC-Klone. Eine Beschreibung der Eingabevorlage findet sich bei Schalkwyl et al. (eingereicht bei Genome Research).

2.2 Biochemische Untersuchungen

2.2.1 Material

Chemikalien:

2D-Elektrophorese: Acrylamid (für IEF-Gele), Piperazindiacrylamid, Harnstoff (für IEF-Gele, Sephadex und IEF-Schutzlösung), TEMED, DTT, SDS (für SDS-Gels, 2D-Schutzlösung, Agaroselösung, 1D-Equilibrierungslösung), Bromphenolblau, Agarose (low melt) wurden von Bio-Rad in der Produktqualität ‚electrophoresis-purity reagent‘ bezogen. Phosphorsäure, Ethylendiamin, Harnstoff (für IEF-Elektrodenlösungen), Glycerol, Silbernitrat, Formaldehyd (für die Histologie) wurden von Merck (Darmstadt) bezogen. SDS (für PAGE-Elektrodenpuffer), Trizma Base, Trizma Hydrochlorid, Natriumthiosulfat wurden von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Glycin (für die Analyse), Acrylamid (Qualität 4X, für SDS-PAGE Gele), Bisacrylamid (Qualität 2X) und Servalyte 2-4 stammten von Serva Feinbiochemika (Heidelberg), DTT (für 1D-Equilibrierungslösung) stammte von Biomol Feinchemikalien (Hamburg), Sephadex (G-200 Superfine) war von Pharmacia (Heidelberg).

Geräte:

Isoelektrische Fokussierung: Giessständer, Laufkammer, Gelschienen und Glassröhren sind erhältlich bei WITA (Potsdamerstr.10, D-14513 Teltow, FRG), das Spannungsgerät EPS 3500 kann von Pharmacia (Freiburg, FRG) bezogen werden.

SDS-Gelelektrophorese: Laufkammer Desaphor VA300 (Desaga, Heidelberg, FRG), Spannungsgerät Type 2197 (Pharmacia, Heidelberg, FRG), Kühlgerät Typ RTE-100B (Life Science International, Frankfurt, FRG), die komplette Ausrüstung ist auch erhältlich bei WITA, Potsdamerstr.10, D-14513 Teltow, FRG.

Lösungen:

Isoelektrische Fokussierung

Trägerampholytmischung:

Trägerampholyt	pH-Bereich	Firma
ein Teil Pharmalyte	pH 3.5 – 10.0	Pharmacia
ein Teil Servalyte	pH 2.0 – 11.0	Serva
drei Teile Pharmalyte	pH 4.0 – 6.5	Pharmacia
zwei Teile Pharmalyte	pH 5.0 – 8.0	Pharmacia
ein Teil Pharmalyte	pH 6.5 – 9.0	Pharmacia

IEF-Gellösung:

Separationsgel	Cappgel
3.50 % (w/v) Acrylamid	12.0 % Acrylamid
0.30 % (w/v) Piperazindiacrylamid	0.13 % Piperazindiacrylamid
54 % (w/v) Harnstoff (9M)	wie Sep.gel
5.0 % (w/v) Glycerin	“
4.0 % (v/v) Ampholyte	“
0.06 % (v/v) TEMED	“
0.02 % (w/v) Ammoniumpersulfat	“

Elektrodenlösungen für die IEF:

Anodenlösung : 85% Phosphorsäure (w/w), 3M Harnstoff, Kathodenlösung: 5 % (v/v) Ethylendiamin, 5 % (w/v) Glycerin, 9M Harnstoff.

Equilibrierungslösung: 125mM Tris, 40 % Glycerin, 65mM DTT, 3 % SDS.

Sephadexlösung: Sephadex G-200 superfine wird in Wasser gequollen und mit 25% (w/v) Glycerin gewaschen und in Aliquots zu 272mg eingefroren. Die Zugabe von Harnstoff (Endkonz 9M), DTT (Endkonz. 70mM) und Ampholytmischung (Endkonz. 2% (v/v)) erfolgt vor Gebrauch.

Schutzlösung: 5 % (w/v) Glycerin, 5M Harnstoff, 2 % (v/v) Servalyt pH 2-4

SDS-Gelelektrophorese

SDS-PAGE Gellösung:

375mM Tris/HCl, pH 8.88 (20°C) (Sigma)
 15 % (w/v) Acrylamid (mit Amberlite behandelt)
 0.2 % (w/v) N,N'-methylenbisacrylamid (Serva)
 0.1 % (w/v) SDS (Sigma)
 0.03 % (v/v) TEMED (BioRad)
 0.08 % Ammoniumpersulfat (BioRad)

Der Elektrodenpuffer enthält 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.55 (20°C) und wird 2h vor Beginn des Laufs in der Gelkammer auf 15°C gekühlt.

Agaroselösung: 0.1 % SDS, 125mM Tris/Phosphorsäure Puffer, pH 6.8

2.2.2 Versuchstiere

Für die biochemischen Untersuchungen wurden die gleichen Versuchstiere verwendet wie für die molekulargenetischen Untersuchungen. Sie wurden unter 2.1.2 beschrieben und umfassen Mäuse der beiden Elternstämme B6 und SPR und 64 Rückkreuzungstiere. Untersucht wurden die Proteine des Gehirns.

2.2.3 Methoden

Präparation von Gehirnen:

Die für meine Untersuchungen verwendeten Mausgehirne lagen bereits als eingefrorenes Material vor. Die Präparation wurde zuvor von Joachim Klose und Jean Nowak am Clinical Research Centre, Harrow, UK durchgeführt. Die Präparationsmethode wurde an anderer Stelle beschrieben (Klose 1999a).

Proteinextraktion:

Die Extraktion der Proteine aus Mausgehirnen erfolgte nach der von J. Klose beschriebenen 'Fraktionierten Extraktion' (Klose 1999a). Nach diesem Verfahren wird das Gesamtprotein eines Organs in drei Fraktionen gewonnen: cytoplasmatische Fraktion, Membranfraktion und eine Restfraktion, die DNA-gebundene und ribosomale Proteine enthält. Für meine Untersuchungen wurde nur die cytoplasmatische Fraktion verwendet. Die Gewinnung dieser Fraktion ist im Folgenden beschrieben:

Die Gehirne wurden einzeln extrahiert und zunächst in gefrorenem Zustand gewogen. Sie wurden in einen Mörser aus Quarzglas transferiert, der in einer Styroporbox mit flüssigem Stickstoff stand. Der Proteaseinhibitormix CompleteTM wurde nach Angaben des Herstellers zubereitet und das 0,08-fache Volumen (in ul) des Organgewichtes (in mg) zugegeben. Konzentrierte Stammlösungen der Proteaseinhibitoren Pepstatin A und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) wurden zu einer Endkonzentration von 1.4uM bzw. 1mM zugegeben. Die Zugabe von wasserlöslichen Lösungen erfolgte durch Auftropfen auf einen in flüssigem Stickstoff gekühlten Metalllöffel, in Ethanol gelöste Proteasehemmer wurden direkt auf das gefrorene Organ aufgebracht. Nach Zugabe der Proteaseinhibitoren wurden die Gehirne zu feinem Pulver zerstoßen. Nach Ultrazentrifugation für 30 min bei 45000 upm (183378g) wurde der Überstand (S I) mit einer Pasteurpipette in ein gewogenes Plastikgefäß übertragen und eingefroren. Das Sediment wurde gewogen (in mg) und mit der 0,5-fachen Menge Tris-Puffer (in ul) versetzt. Eine erneute Zugabe von Proteaseinhibitoren erfolgte wie oben beschrieben, die Menge bezog sich diesmal auf das Gesamtvolumen von Sediment und Trispuffer. Puffer und Proteasehemmer wurden durch mörsern sorgfältig mit dem Sediment vermischt. Für eine Ultraschallbehandlung im Ultraschallbad wurden Glaskugeln eines Durchmessers von 2-2,5 mm in die Probe gegeben (Probenvolumen x 0,034 = Zahl der Kugeln). Sechs Ultraschallbehandlungen von 10 s lösten sich ab mit sechs Pausen von 50 s, in der die Probe im Eiswasser verblieb und zur Abkühlung mit einem dünnen Draht gerührt wurde. Nach Entfernen der Glaskugeln wurde eine zweite Ultrazentrifugation durchgeführt und der Überstand (S II) mit dem

ersten Überstand vereinigt und gewogen. Ein Aliquot von 50 µl der Pufferlöslichen Fraktion wurde mit 54 mg Harnstoff (BioRad, USA) auf eine Endkonz von 9M eingestellt, mit 70 mM Dithiothreitol (BioRad, USA) auf die Endkonzentration 7 mM und mit Trägerampholytlösung pH 2-4 (Servalyte, Serva, FRG) auf eine Endkonzentration von 2%. Die Gesamtproteinkonzentration des Gehirns verdünnt sich durch die Aufarbeitung auf die Hälfte.

2D-Elektrophorese:

Die für meine genetischen Analysen verwendeten zweidimensionalen Proteinmuster wurden im Labor der AG Klose hergestellt. Die für die Massenspektrometrie verwendeten Gele wurden von mir hergestellt. Gele für beide Anwendungen werden bis auf geringfügige Unterschiede (Geldicke, Probenauftragsmenge) gleich hergestellt. Die hier verwendete hochauflösende 2D-Elektrophoresetechnik nach Klose wurde bereits ausführlich beschrieben und wird im Folgenden nur kurz dargestellt (Klose und Kobalz 1995; Klose 1999c).

Isoelektrische Fokussierung: Die Isoelektrische Fokussierung wurde in 40 cm langen Glassröhren durchgeführt. Ein Isoelektrisches Fokussierungsgel besteht aus einem Separationsgel (40 cm) und einem Cappel (0.8 cm). Gele wurden drei Tage vor dem Lauf gegossen, um vollständige Polymerisation zu gewährleisten. Glassröhren mit einem Innendurchmesser von 1.5 mm wurden mit maximal 50µl Puffer-löslicher Fraktion beladen, das entspricht ca. 500µg Protein (Klose und Feller 1981). Die Gele wurden für den Probenauftrag folgendermassen vorbereitet: eine 2mm hohe Schicht einer Sephadex G-200 Suspension wurde appliziert, um zu verhindern, dass Proteinpräzipitate die Geloberfläche blockieren. Die Proteinprobe wurde über der Sephadexschicht aufgetragen und mit 3mm Schutzlösung überschichtet, um den direkten Kontakt der Proteinprobe mit der sauren Elektrodenlösung zu vermeiden. Glasröhren wurden mit der Anodenlösung bis zum oberen Rand aufgefüllt. Das obere mit Probe beladene Ende wurde an die Anode angeschlossen, das untere an die Kathode. Der Lauf erfolgte unter Standardbedingungen für 40cm Gele: 1h bei 100V, 1h bei 300V, 23h bei 1000V, 30min bei 1500V, 10min bei 2000V. Nach dem Lauf wurde das IEF Gel 10 min in SDS- und DTT-haltiger Equilibrierungslösung inkubiert und bei -80°C gelagert.

SDS-PAGE: Die Trennung nach Molekulargewicht wurde mit der SDS-PAGE nach Lämmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Das 40 cm lange IEF Gel wurde in zwei gleiche Teile geteilt, jede Hälfte auf ein SDS-Gel des Formats 1.5mmx23x30 cm), und mit 1 % (w/v) Agaroselösung überschichtet. Der Elektrodenpuffer wird 2h vor Beginn des Laufs in der Gelkammer auf 15°C gekühlt. Eine Gelkammer fasst zwei Gele. Für den Lauf zweier Gele wurde ein konstanter Stromfluss von 65 mA (für 15min) und 85 mA (für ca. 6h) vorgegeben.

Färbetechniken:

Coomassiefärbung: Die Coomassiefärbung wurde folgendermassen durchgeführt: Die Färbung erfolgte in 1 L 50 % Methanol/ 10 % Essigsäure/ 0,05 % Serva Blau R250 über Nacht auf dem Schüttler unter dem Abzug. Entfärbt wurde in 5 % Methanol/ 12,5 % Essigsäure mehrere Stunden unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung. Bis zur massenspektrometrischen Analyse wurden die Gele in 7 % Essigsäure bei 4°C gelagert.

Silberfärbung: Für die Identifizierung von Proteinspots mit MALDI-Massenspektrometrie wurden SDS-Gele (40cm IEF/ 30 cm SDS-PAGE) nach der Färbemethode von Shevchenko gefärbt (Shevchenko et al. 1996b). Im Gegensatz zur Färbung nach Heukeshoven (Heukeshoven und Dernick 1985) wird hier der Vernetzer Glutardialdehyd weggelassen, der die Färbung zwar empfindlicher macht, Proteine jedoch kovalent modifiziert und deshalb ungeeignet für die Massenanalyse mit MS ist. Zur Steigerung der Empfindlichkeit wurde dem Entwickler Natriumthiosulfat zugegeben (Arnott et al. 1998). Für analytische Zwecke wurde die sensitivere Methode mit Glutardialdehyd verwendet und nach Protokoll in Tabelle 2.2.3 verfahren (Heukeshoven und Dernick 1985; Jungblut und Seifert 1990).

Tab.2.2.3 Protokoll für eine sensitive Silberfärbung von 2D-Gelen.

Fixierung	50% Methanol 5% Essigsäure	20-30 min 1L/ Gel
Waschen	50% Methanol	10 min 1L/ Gel
Wässern	A.bidest	10 min 2L/ Gel
Inkubation	0.02% Natriumthiosulfat	1 min 1L/ Gel
Wässern	A.bidest	2 x 1 min 2 x 1L/ Gel
Silberimprägnierung	0.1% Silbernitrat, 4°C	20 min bei 4°C 1L/ Gel
Wässern	A.bidest	2 x 1 min 2 x 1L/ Gel
Spülen	2% Natriumbicarbonat 0.04% Formalin	1 min 1L/ Gel
Entwickeln	2% Natriumbicarbonat 0.04% Formalin 0.001 % Natriumthiosulfat (10mg/l)	ca. 10 min 1L/ Gel
Stoppen	5% Essigsäure	20 min 1L/ Gel
Lagerung	1% Essigsäure	mehrere Tage

Alle Lösungen wurden mit A.bidest. aus einer MilliQ-Anlage bereitet.

Massenspektrometrie:

2D-Elektrophorese: 15 µl der cytosolischen Fraktion des Gehirns von Mäusen der Parentalstämme *Mus spretus* und *Mus musculus* wurde wie für die Analyse der Varianten auf 40 cm langen Isoelektrischen Fokussierungsgelen von 0,9 mm Durchmesser getrennt und jede Hälfte auf ein 0,75 mm dickes SDS-Gel geladen. Die Färbung erfolgte mit der von Shevchenko (Shevchenko et al. 1996b) beschriebenen Silberfärbung (Kap.2.2.3), die in ihrer Empfindlichkeit unter der von uns verwendeten liegt, weil sie ohne den Vernetzer Glutardialdehyd arbeitet, der Proteine kovalent an die Acrylamidmatrix bindet und der nachfolgenden MALDI Analyse entzieht. Für die Massenspektrometrie (MALDI) wurden Spots von 4 Gelen vereinigt.

Probenvorbereitung: Proteinspots wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Um das Gel während des Ausstechens vor Kontamination durch Keratin zu schützen, wurde es in Plastikfolie eingeschweisst. Die Folie lässt sich durchstechen und das Gelstück entnehmen. Die Vorbereitungen für den Peptid-Massenfingerprint bestanden aus Reduktion und Alkylierung der Disulfidbrücken und Trypsinverdau der Proteine in der Acrylamidmatrix mit Schweine-Trypsin von Promega (Promega Corporation, Madison, WI, USA) wie bei Shevchenko beschrieben (Shevchenko et al. 1996b und <http://www.mann.embl-heidelberg.de:8001/Local/Methods/PAGE/InGelDigestion.html>). Der Überstand, der die verdauten, aus dem Gelstück herausdiffundierten Peptide enthält, wurde mit 2,5 % TFA angesäuert und auf eine kleine Säule mit einem Volumen von 200-500 nl aus Poro S R2 (Perkin Elmer, Biosystems, Foster City, CA, USA), einem hydrophoben C16-C18 Material, aufgetragen. Als Säule diente eine 'GELoader' Pipettenspitze von Eppendorf, deren Ende mit einer Pinzette zusammengedrückt wurde und mit Poro S Material, in Isopropanol

aufgeschwemmt, gefüllt wurde. Equilibrierung der Säule und Entfernen der Salze von den säulengebundenen Peptiden wurde mit 0,1 % TFA, die Elution mit 2 ul 60 % Acetonitril/ 0,1 % TFA durchgeführt.

Massenspektrometrische Analyse: 0,5 ul der entsalzten Peptide wurden mit 0,5 ul Matrixlösung auf dem MALDI-Probenhalter ('MALDI-target') gemischt und zur Kristallisation gebracht. Als Matrix wurde alpha Cyan-4-hydroxy-Zimtsäure (Fluka Chemika) eingesetzt. Die massenspektrometrische Analyse wurde von Dr. Christine Gauss, Dr. Eckehardt Nordhoff und seiner technischen Assistentin Christine Lübbert in der Service Abteilung des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik, Berlin an einem Bruker Reflex II - Massenspektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen) durchgeführt.

Weitere Identifizierungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. E. Krauses Arbeitsgruppe am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin, an einem Voyager-DE STR MALDI-TOF Gerät (Perkin Elmer PerSeptive Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt und von Dr. P. Jungblut, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin. Nach Beendigung der meiner Arbeit wurden weitere Identifizierungen vom Labor Prof. J. Klose (Marion Löwe) im Zusammenarbeit mit dem Labor Prof. H. Meyer, Bochum, durchgeführt.

Auswertung der MALDI-Spektren: Zur Identifizierung eines Proteinspots wurden die monoisotopischen Massenwerte aller oder ausgewählter Peaks eines Massenspektrums in das Programm MS-Fit eingegeben (Karl Clauser und Peter Baker, Universität von Californien, San Francisco, unveröffentlicht, <http://prospector.ucsf.edu/mshome3.0.4.htm>). Aus Vergleichen der experimentell ermittelten Peptidmassen mit theoretischen Trypsinfragmenten von Protein- oder translatierten DNA Einträgen der Datenbank nrdb liessen sich Proteine identifizieren. Die Datenbanksuche wurde mit einer Massengenauigkeit von 100-200ppm (Max-Planck-Institut) oder 0,05 D (50 ppm, FMP) durchgeführt.

2.3 Erfassung der genetischen Daten aus 2D-Proteinmustern

Die Proteinmuster, die von Mäusen der P-, F1- und B1-Generation hergestellt wurden, wurden miteinander verglichen. Das Ziel dabei war es, Proteinpolymorphismen zwischen den beiden Spezies *Mus musculus* und *Mus spretus* zu entdecken und die Segregation dieser Polymorphismen in der Rückkreuzungsgeneration zu studieren. Die Segregationsmuster bildeten dann die Grundlage für die genetische Kartierung der polymorphen Proteine im Mausgenom.

Der Vergleich der Proteinmuster wurde im Wesentlichen im Labor der AG Klose durchgeführt. Die Daten wurden mir dann zur Durchführung der Genkartierung zur Verfügung gestellt. Das Vorgehen zur Erfassung dieser Daten wird im Folgenden kurz beschrieben.

Der Vergleich der Proteinmuster der 2DE-Gele erfolgte visuell auf einem Leuchtkasten. Auf den Einsatz von automatischen, computergestützten Auswertesystemen wurde verzichtet, da er kaum Vorteile bietet. Der Aufwand, jedes digitalisierte Computermuster, Spot für Spot mit dem realen Gel zu vergleichen und nachzueditieren, übertrifft den Aufwand der Auswertung per Auge. Für die Erfassung quantitativer Unterschiede eignet sich die eingesetzte Silberfärbung wenig, weil sie Proteinspots in Abhängigkeit von ihrer Aminosäuresequenz in unterschiedlichen Farbtönen anfärbt und starke Proteinspots nicht homogen färbt (helle rote Zentren). Auf jedem Gel wurde eine Plastikfolie befestigt, auf der qualitative und quantitative Veränderungen eines Proteinspots markiert wurden. Methodisch bedingte Unterschiede zwischen Proteinmustern wurden durch wiederholte 2DE-Läufe derselben Probe festgestellt und von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Stammesspezifische Unterschiede: Die Analyse der stammesspezifischen Unterschiede zwischen den Parentalstämmen B6 und M.spret. (siehe 2.1.2) wurde dreimal unabhängig voneinander für folgende Tierpaare durchgeführt: B6 754 fe - M.spret. 899 fe; B6 750 fe - M.spret. 900 fe; B6 751 fe - M.spret. 901 fe. Einzelne Variante Proteinspots wurden zusätzlich in weiteren drei Tierpaaren verifiziert: B6 752 fe - M.spret. 898 fe; B6 753 fe - M.spret. 897 fe; B6 744 fe - M.spret. 903 fe. Varianten, die in allen drei Paaren auftraten, wurden als stammesspezifisch gewertet.

Der Vergleich der Proteinmuster der Parentalstämmen zeigte, dass verschiedene Typen von varianten Proteinspots existieren. Unterschiede zwischen korrespondierenden Spots bezüglich der Proteinmenge wurden

als quantitative Varianten bezeichnet, Unterschiede in der Position im Proteinmuster als qualitative Varianten (siehe Abb.2.3). Quantitative Varianten wurden mit der Abkürzung 'aV' (amount variation) bezeichnet, wenn sie in einem Parentalstamm als schwach silbergefärbter Spot geringer Fläche und im anderen Stamm als stark silbergefärbter, grosser Spot vorlagen und als 'paV' (presence-absence variation), wenn sie in einem Stamm fehlten und im anderen vorhanden waren.

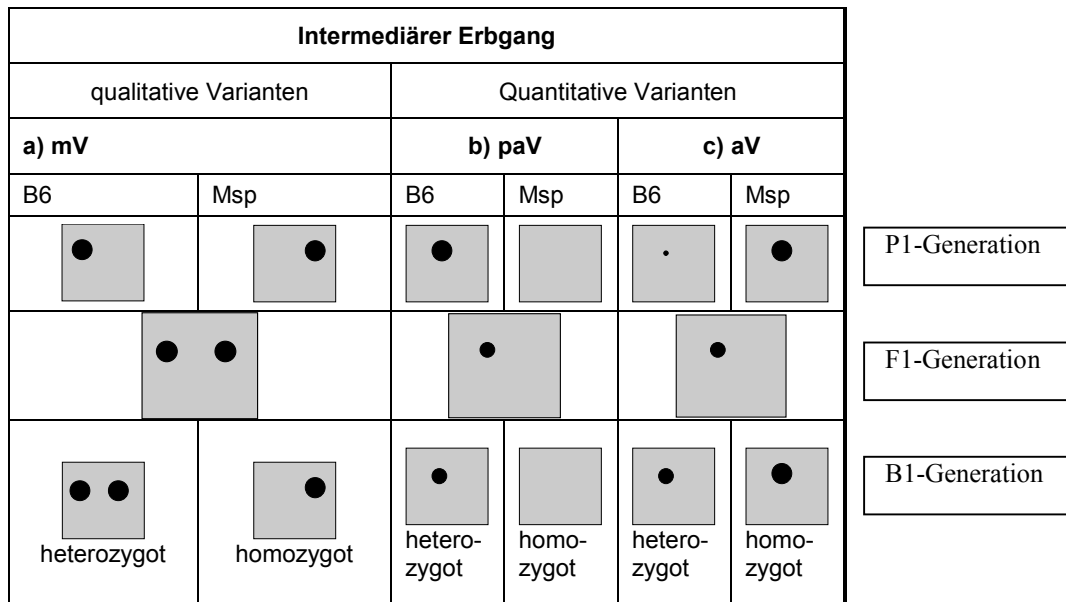
Qualitative Varianten wurden Mobilitätsvarianten genannt ('mV' mobility variation). Diese Spots zeigten entweder einen Unterschied in Molekulargewicht oder Isoelektrischem Punkt, oder in beiden Eigenschaften. Die Frage, ob die Spots, die wir als korrespondierende Spots betrachten, wirklich allelische Varianten desselben Proteins sind, wurde mit der folgenden Vererbungsanalyse der Spots in der F1 und B1-Generation der EUCIB Rückkreuzung untersucht.

Analyse des Erbgangs der Varianten in der Hybridgeneration (F1) und in der Rückkreuzungsgeneration (B1): Der Vererbungsmodus stammesspezifisch varianter Proteinspots wurde an drei F1-Tieren (B6 fe x M.spret. m) untersucht, und zwar an den Tieren 22fe, 2 fe, und 10 fe (siehe 2.1.2). Die 64 Proteinmustern der Rückkreuzungstiere (Kap2.1.2) der Kreuzung F1_♀ x M.spret._♂ wurden auf die parentalen Varianten hin untersucht.

Bei intermediärem Erbgang erwartet man in der F1-Generation für Mobilitätsvarianten (mV) beide parentalen Spots, denn die F1-Hybriden sind für jeden Genort heterozygot. Die Gehirnproteinmuster der Rückkreuzungstiere zeigen entweder ebenfalls beide parentalen Spots oder nur den Spot des *Mus spretus* P1-Elterntieres, d.h. sie sind für den untersuchten Proteinspot entweder hetero- oder homozygot. Die quantitativen Varianten (aV, paV) treten in der F1-Generation in entweder in intermediärem Spotvolumen auf (heterozygot); in der Rückkreuzungsgeneration muss zwischen intermediären heterozygoten und homozygoten *Mus spretus*-Allelen unterschieden werden. Wenn das Produkt des *Mus spretus*-Allels in geringerer Konzentration vorliegt oder fehlt, lassen sich homo- und heterozygote Tiere gut unterscheiden, denn wir verwendeten Tiere, die mit *Mus spretus* rückgekreuzt sind. Es wurde jedoch auch versucht, den umgekehrten Fall auszuwerten, d.h. zwischen heterozygoten Tieren mit einem intermediären Spot und homozygoten Tieren mit einem grossen *Mus spretus* Spot zu unterscheiden, was sehr schwierig und fehlerbehaftet sein kann.

Dominante Vererbung eines quantitativen Allels konnte aus oben genanntem Grund nur ausgewertet werden, wenn das dominante Allel von B6 stammt. In der F1 Generation findet man den Spot von B6, in den Rückkreuzungstieren entweder den dominanten B6 Spot (heterozygot) oder allein den rezessiven *Mus spretus* Spot (homozygote Tiere) (siehe Abb. Varianten).

Abb.2.3 Erbgänge der Protein-Varianten



2.4 Genkartierung

2.4.1 Zusammenstellen der Protein- und DNA-Segregationsdaten in Dateien

Ausgehend von den in Tab.2.1.4 aufgeführten Symbolen, die zur Bezeichnung der Segregationsdaten in verschiedenen Schritten der Auswertung verwendet worden waren, wurden mit Hilfe von Computerprogrammen (geschrieben von Konrad Büssow und Leo Schalkwyk) Datensätze in einem einheitlichen Datenformat (2,1,-) zusammengestellt.

Das Programm namens "mbx" wandelte Primärdaten der DNA-Marker in ein Format (2,1,-) um, das die Kopplungsanalyse mit Ankermarkerdaten der MBx Datenbank des EUCIB Projektes ermöglichte.

Das Programm „tomapmaker.pl“ wurde verwendet, um Protein-, IRS- und Mikrosatelliten-Daten im Format 1,0,- mit Ankermarkerdaten der MBx-Datenbank in ein einheitliches Format (2,1,-) zu schreiben.

	heterozygote Tiere (B6/Msp)	homozygote Tiere (Msp/Msp)	unklare Signale
IRS-PCR Marker: Symbole für die Auswertung auf dem Autoradiogramm	+	-	?
Symbole im Marker- Datenfile	1	0	-
Symbole der Mbx Datenbank (Ankermarker, MSO- Marker)	2	1	-
Proteine: Symbole für die Auswertung auf dem 2- DE Gel	++	+	?
Symbole im Protein- Datenfile	1	0	-

Tab.2.4.1 Zusammenstellen der Protein- und DNA-Segregationsdaten in Dateien. Für jedes der Mauschromosomen 1-19 und X wurde eine eigene Datei erstellt. Jede Datei enthält die chromosomenspezifischen EUCIB Ankermarker, chromosomenspezifische IRS-PCR Marker und Mikrosatellitenmarker und alle 441 Proteindatensets in zwei Versionen. Datenset a. enthielt alle auswertbaren Proteindaten, während in Datenset s. nur 100% sichere Daten enthalten waren. Zusätzlich wurden sekundäre EUCIB Marker ('MSOs' genannt) aufgenommen, und zwar solche mit denen mindestens 10 der 64 zur Proteinkartierung eingesetzten Rückkreuzungstiere genotypisiert worden sind. Die EUCIB-Ankermarker und MSO-Marker wurden von der Internetseite des EUCIB-Projektes (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/MBx>) geladen.

2.4.2 Berechnung der genetischen Karte

Das Programm MAPMAKER/EXP 3.0 (Lander et al. 1987; Lincoln und Lander 1992) wurde verwendet, um aus der Vererbung der Protein- und DNA-Polymorphismen eine genetische Karte zu erstellen. Der Berechnung der genetischen Abstände (in Centi-Morgan; cM) liegt der Haldane'sche Algorithmus zugrunde.

Untersuchung paarweiser Kopplung (two-point linkage):

Im ersten Schritt wurde mit dem 'group' Befehl des Mapmaker Programms nach Kopplungsgruppen gesucht. Mapmaker sucht hierbei nach Paaren von Markern (Marker - Marker, Marker - Protein) die signifikante Kopplung zeigen. Als Grenzwert wurde ein LOD-Wert von 4 gewählt (wie von den Autoren empfohlen). Die Marker- und Proteindaten einer Datei wurden aufgeteilt in eine Kopplungsgruppe, deren Mitglieder mit LOD-Wert 4 an ein anderes Mitglied der Gruppe gekoppelt sind, und restliche ungekoppelte Proteine.

Mehrpunkt-Analyse (multipoint analysis):

Die relative Ordnung der Ankermarker zueinander ist bekannt (Breen et al. 1994). Sie wurde für jedes Chromosom übernommen, auch wenn aufgrund einer Rekombinationsfrequenz von ca. 50% mit dem Mapmakerprogramm bei einigen Chromosomen (Bsp. Chr8) keine Ordnung hätte festgelegt werden können. Mit Hilfe des 'try' Befehls wurden die Positionen von IRS- und Mikrosatellitenmarkern relativ zu den Anker markern ermittelt und die Marker integriert, wenn die wahrscheinlichste Position um den Faktor 1000 (loglikelihood 3) wahrscheinlicher war als die zweitbeste Position.

Die Einordnung von Proteindaten in dieses feinere Markergerüst erfolgte ebenfalls mit dem 'try' Befehl. Alle Proteine, die in dasselbe Intervall fielen, wurden mit 'compare' geordnet, wobei Ordnungen mit einer relativen Wahrscheinlichkeit von 2,5 oder grösser (316-fach grössere Wahrscheinlichkeit für Ordnung 1 im Vergleich zu Ordnung 2) unterstützt wurden. Aus Gruppen von Proteinen, die zwar in die gleiche Region der Karte fielen, sich aufgrund widersprüchlicher Rekombinationen aber nicht gemeinsam in ein Intervall integrieren liessen, wurden zuerst die Proteine mit der höchsten relativen Wahrscheinlichkeit ausgewählt und integriert, wenn sie die Kartenlänge nicht oder nur wenig beeinflussten. Die übrigen Proteine wurden in eine Intervall neben die Karte gezeichnet. Das Intervall erstreckt sich über den Bereich des Chromosoms für den die relative Wahrscheinlichkeit mindestens 2,5 grösser ist als für umliegende Bereiche. Proteine, für die keine Position innerhalb der Intervalle eines Chromosoms bestimmt werden konnte, die aber dennoch signifikante Kopplung ($LOD > 3$) an ein oder mehrere Marker oder Proteine der fertigen Karte zeigten, wurden als gekoppelt unter der Chromosomenkarte vermerkt.

Während der letzten Schritte der Kartierung wurden die MSO-Marker mit einer relativen Wahrscheinlichkeit von $> \log 1$ in die Karte eingeordnet.

Kontrollen:

Als Kontrolle wurden automatisierte Analysen mit Hilfe des 'build' Befehls durchgeführt. Vorgegeben wurde das Gerüst aus Ankermarkern, IRS- und Mikrosatellitenmarkern. 'Build' sucht nacheinander für alle zu integrierenden Proteine die wahrscheinlichste Position. Die Grenze der relativen Wahrscheinlichkeit (log likelihood ratio, LOD Wert) für die Integration kann festgelegt werden. Sie wurde sukzessiv erniedrigt (LOD 7, 5, 3, 2). Die Ergebnisse wurden mit den von Hand gewonnenen verglichen und wie oben beschrieben „per Hand“ mit dem 'try' Befehl nach ihren relativen Wahrscheinlichkeiten und Auswirkungen auf die Intervalllänge bewertet.