

III. Ergebnisse

3.1 Segregationsanalyse von DNA-Polymorphismen

3.1.1 Bedeutung und Häufigkeit von DNA-Polymorphismen und ihre Darstellung mittels genetischer Marker: RFLP-Marker, SSLP-Marker und IRS-PCR-Marker

DNA-Sequenzen, die sich zwischen zwei Mäusestämmen unterscheiden, nennt man polymorph. Sie dienen in der Genkartierung als Marker, d.h. als bekannte, definierte Markierungspunkte im Genom der Maus.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Polymorphismen von DNAs zweier Organismen sichtbar zu machen. Die RFLP-Analyse bedient sich der Restriktionsenzyme: diese werden mit genomischer DNA z.B. zweier Individuen oder zweier Inzuchtmäusestämme inkubiert und verdauen die DNA sequenzspezifisch zu Fragmenten von einigen Kilobasen Länge (Botstein et al. 1980). Diese werden auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine DNA-bindende Membran transferiert und mit einem radioaktiv markierten DNA-Fragment hybridisiert, das polymorphe Fragmente sichtbar macht. Mit dieser Methode wurden 1000de von Genen (cDNAs) kartiert, indem die radioaktiv markierte cDNA gegen Southernblots von DNA der Rückkreuzungstiere hybridisiert wurde (Copeland et al. 1993).

Eine andere Klasse von Markern sind die SSLP- oder Mikrosatellitenmarker (Dietrich et al. 1992): mittels sequenzspezifischer Primer werden repetitive Sequenzen (Dinukleotidwiederholungen, englisch 'tandem repeat', z.B. (CA)_n) von genomischer DNA amplifiziert. Unterscheiden sich die Amplifikate zweier Mäusestämme in ihrer Länge, so kann man die Vererbung dieses Locus in einer Mäusefamilie verfolgen, indem man die PCR-Produktlängen auf einem Agarose- oder Polyacrylamidgel analysiert. Die in dieser Arbeit an zweiter Stellen verwendeten Mikrosatellitenmarker fallen in diese Kategorie. Die Mikrosatellitensequenzen kommen in einer Zahl von etwa 100 000 im Genom der Maus vor. Sie weisen eine Mutationsrate von 10⁻⁴ pro Generation auf und zeigen zwischen *Mus spretus* und *Mus musculus* eine Polymorphismusrate von 90%.

In dieser Arbeit wurden in erster Linie IRS-PCR Marker verwendet. Diese kommen gleichmäßig verstreut (interspersed) im Genom vor. Während Mikrosatellitenmarker durch ein sequenzspezifisches Primerpaar definiert sind, die eine polymorphe Doppelnukleotidsequenz amplifizieren verhält es sich mit IRS-Markern genau umgekehrt. Mit einem einzigen Primer, hier dem B1R-Primer, werden von beliebigen genomischen Sequenzen wie z.B. einer Gesamtpräparation genomischer DNA, YAC- oder BAC-Klonen Sequenzen amplifiziert, sofern die DNA-Vorlagen mehrere der repetitiven B1-Elemente in richtiger Orientierung und im Abstand von weniger als 2000bp enthalten (siehe Abb.3.1.1). Das B1-Element ist mit 130000 – 180000 Kopien das häufigste repetitive Element im Genom der Maus (Krayev et al. 1980). Es kommt gehäuft in (chromosomalen) R-Banden (reversen Banden) vor als in Giemsa-färbbaren G-Banden. GpC-Inseln wurden hauptsächlich in R-Banden des Genoms gefunden, während G-Banden arm an GpC-Inseln sind (Craig und Bickmore 1994; Cross et al. 1997). Da GpC-Inseln in Verbindung mit den 5'-Enden von Genen 50-60% aller Säugetiergene auftreten, folgt daraus,

dass B1-Elemente mit den Gen-reichen Regionen des Genoms assoziiert sind. Eine strikte Assoziation mit R-Banden wie für das repetitive Element B2 wurde für B1 allerdings nicht festgestellt, vielmehr eine diffuse Bandenbildung, die für eine weitverstreute Verteilung des B1-Elements im Genom spricht (Boyle et al. 1990).

Der Polymorphismus kann hier in der Länge oder in der Menge des gebildeten inter-B1-Produktes (IRS-PCR-Produkt) liegen. Das Fehlen oder eine Punktmutation eines B1-Elements in einem Mäusestamm führen dazu, dass das entsprechende IRS-Produkt nicht oder weniger effizient amplifiziert werden kann (Abb.3.1.1). Der Vorteil der IRS-PCR-Marker liegt darin, dass sie eine Genotypisierung von Rückkreuzungstieren mittels Hybridisierungsexperimenten erlauben. Hybridisierungen von klonierten, radioaktiv markierten IRS-PCR-Produkten gegen IRS-PCR-Produkte von Rückkreuzungstieren liefern eine positiv/negativ Antwort über ein IRS-Produkt eines Locus im Genom der Maus. Roger Cox (Cox et al. 1991) zeigte, dass IRS-PCR-Produkte von genomischer DNA zwischen *Mus musculus* und *Mus spretus* eine Polymorphismusrate von >30% aufweisen und daher für die Segregationsanalyse der EUCIB Rückkreuzung als Quelle neuer Marker genutzt werden können. Der hier verwendete 28bp lange Primer B1R (Kap. 2.1.1) bindet an das ca. 130bp lange B1-Element, und zwar in der äussersten Region des 3'-Endes der Sequenz und wurde von L. Schalkwyk entworfen (L. Schalkwyk, persönliche Mitteilung, L. Schalkwyk et al. eingereicht bei Genome Research). Dadurch wird eine Amplifizierung des repetitiven Elements selbst vermieden. Der Primer amplifiziert diejenigen DNA-Sequenzen zwischen benachbart liegenden B1-Elementen, die nicht weiter als 2kb auseinander liegen, denn das entspricht dem Syntheselimit der Taq-Polymerase.

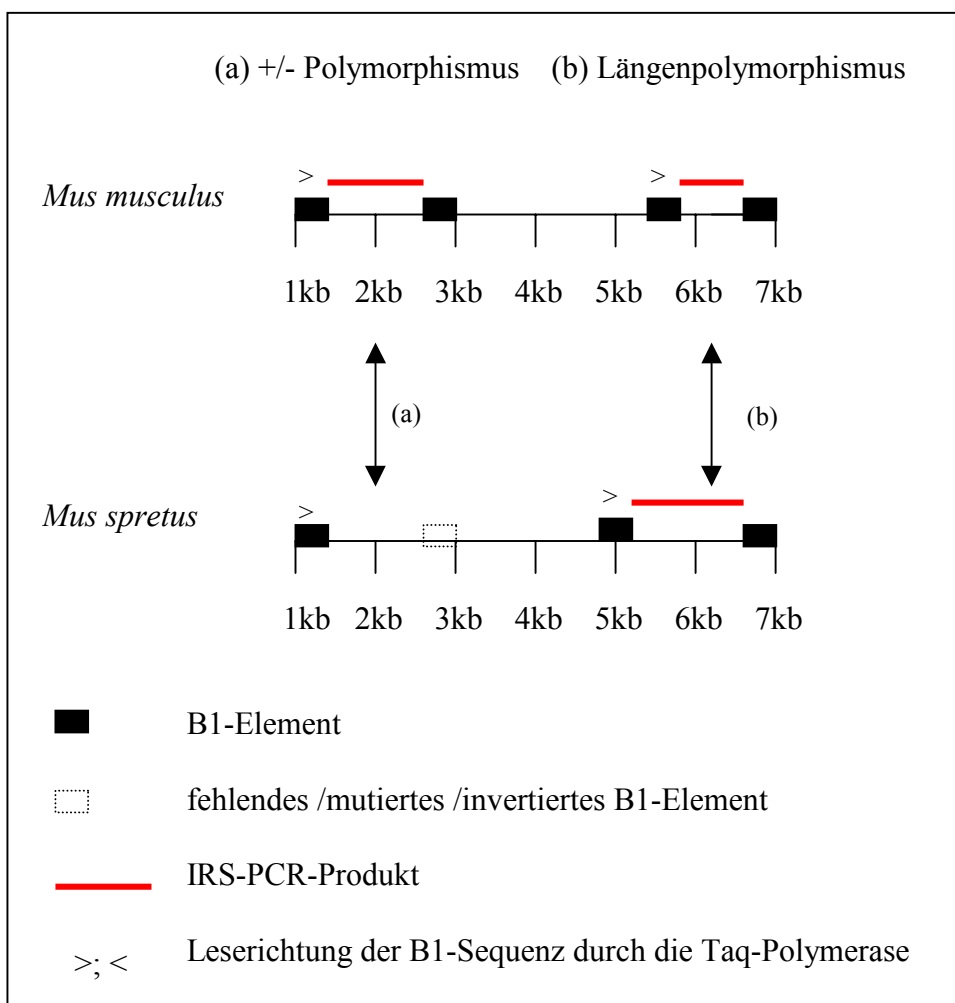


Abb.3.1.1 Die unterschiedliche Verteilung und Orientierung der B1-Elemente im Genom zweier Individuen oder zweier Mauslinien bildet die Grundlage für +/- Polymorphismen und Längenpolymorphismen einer IRS-PCR.

3.1.2 Vorgehensweise bei der Genotypisierung der B1-Mäuse durch IRS-PCR-Marker

Die herkömmliche Vorgehensweise zur Genotypisierung von Tieren mit IRS-PCR Markern stellt sich folgendermassen dar: die genomische DNA der Tiere wird jeweils mit dem B1R-Primer amplifiziert, auf einem Agarosegel über eine kurze Strecke (ca. 4cm) aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen, fixiert und anschliessend mit einem radioaktiv markierten IRS-PCR Marker hybridisiert (McCarthy 1995). Eine direkte Hybridisierung von genomischer DNA der B1-Tiere mit IRS-PCR Markern (Southern-Blot) würde 5µg genomischer DNA pro Blot erfordern. Ausserdem kann ein Längenpolymorphismus, der von einem IRS-PCR Marker in der komplexen Mischung genomischer IRS-PCR Produkte erkannt wird bei der Hybridisierung von restriktionsverdauter, im Agarosegel getrennter DNA als nicht polymorph erscheinen, weil die Bildung von Restriktionsfragmenten aus genomischer DNA von Variationen der für das Restriktionsenzym spezifischen Schneidesequenz abhängt und nicht von der Sequenz des B1-Elements. Die Grundlage für eine erfolgreiche, eindeutige Genotypisierung der B1-Tiere ist daher eine gute IRS-PCR. Das heisst, die Produktpalette der Amplifikation genomischer DNA eines B1-Tiers mit dem B1R-Primer muss in ausreichender Qualität und Quantität vorliegen. Die Qualitätskontrolle der Produktpalette erfolgte auf einem Agarosegel: da die klonierten IRS-PCR Produkte der Klonbanken 173r und H57 zwischen 500 und 2000bp gross sind, muss auch die Produktpalette der IRS-PCR der zu genotypisierenden B1-Tiere von 500 - 2000bp reichen. Die Produktpalette einer erfolgreichen Amplifikation ist in Abb.3.1.2.a) gezeigt.

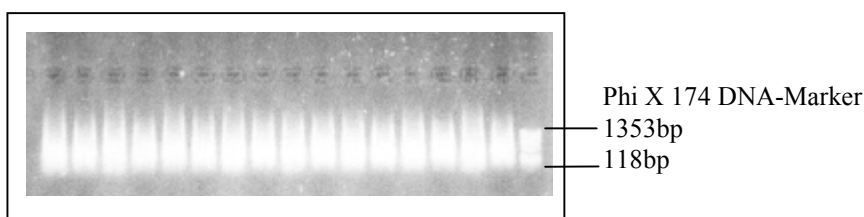


Abb. 3.1.2.a): IRS-PCR Produktpalette von Rückkreuzungstieren. Reihe 1 zeigt 16 Amplifikate und den PhiX174 DNA-Marker.

Was die Quantität der Produktpalette betraf, war es wichtig für alle B1-Tiere ähnliche Produktmengen zu erhalten, da sonst die Hybridisierungsergebnisse aus einer nicht klassifizierbaren Reihe von Graustufen bestehen. Zur Überprüfung der Quantität wurden die komplexe Produktpalette jedes B1-Tiers geblottet und eine Testhybridisierung mit einem IRS-PCR Produkt der Klonbank H57 durchgeführt. Siehe Abb.3.1.2.b)

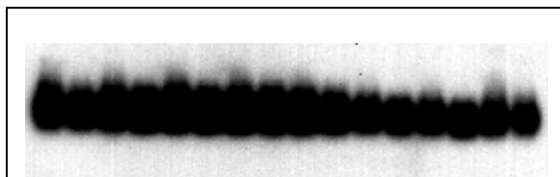


Abb. 3.1.2.b): Hybridisierung eines radioaktiv markierten IRS-PCR-Produkts gegen eine komplexe Mischung genomischer IRS-PCR Produkte. Die in Abb. 3.1.2.a) gezeigten IRS-PCR Produkte wurden auf eine Nylonmembran übertragen und mit einem nicht-polymorphen IRS-PCR Produkt hybridisiert, um zu testen, ob die IRS-PCR Amplifikationen für alle Rückkreuzungstiere gleich ausgefallen sind.

Der Erfolg der PCR-Reaktion hing von der Qualität der genomischen DNA der einzelnen B1-Tiere ab. Mit frisch präparierter DNA aus Leberstücken der Tiere LS558, LS570, LS581, LS689, LS552, LS563, LS564, LS571, LS574, LS575, LS585, LS586, LS589, LS690, LS692, LS693, LS546 und LS547 und DNA-Präparationen aus Maus-Schwanzspitze (Himmelbauer) der Tiere der Mikrotiterplatte E6 (Kap.2.1.2) sowie der Mikrotiterplatte E4 erwies sich die PCR-Reaktion als erfolgreich. Zusätzlich wurden 2 x 96 DNA-Proben von 192 Rückkreuzungstieren der EUCIB-Kreuzung (Mikrotiterplatten E1 und E2, siehe Kap.2.1.2) mit einer Erfolgsrate von 50% amplifiziert.

Da der Polymorphismus der IRS-PCR Marker in der unterschiedlichen Quantität eines IRS-Produktes liegt (Abb.3.1.2) stellte sich die Frage, ob diese quantitativen Unterschiede - die nur im Idealfall als Vorhandensein des Produktes bei *Mus musculus* und völliges Fehlen eines Produktes bei *Mus spretus* auftreten - genau so gut unterscheidbar bleiben, wenn man die komplexe IRS-PCR Produktpalette der B1-Tiere auf Nylonmembranen auftröpfelt, anstatt sie über ein Agarosegel aufzutrennen und den Blot zu hybridisieren ((McCarthy et al. 1995; Hunter et al. 1996). Der Versuch, die komplexen IRS-PCR Produktmischungen mittels Spotting-Roboter (Hoheisel et al. 1991) auf Nylonmembranen aufzubringen, hatte sich als schwierig erwiesen, da mit dicken Nadeln des Spotting-Roboters kein genügend grosses Volumen der komplexen IRS-PCR-Produktmischung aus einer Mikrotiterplatte auf eine Nylonmembran übertragen werden kann (McCarthy 1995) und Himmelbauer, persönliche Mitteilung. Das direkte Aufbringen der Amplifikate auf Membranen würde die Herstellung von Hybridisierungsfiltern jedoch stark abkürzen. Um diese Frage zu klären, wurden 20 Filter mit 114 B1-Tieren per Hand hergestellt, d.h. mit einer 8-Kanalpipette wurden 1-2 µl der komplexen IRS-PCR Produktpalette der B1-Tiere aus einer 96-Loch Mikrotiterplatte auf eine Membran der Grösse 8 x 15 cm aufgebracht (nicht gezeigt). Hybridisierungen mit einzelnen polymorphen IRS-PCR Produkten waren erfolgreich (Tab.3.1.3.a), deshalb wurden weitere Filter mit Hilfe eines Mikrodispensers hergestellt. Da der Mikrodispenser 'Hydra' von Robbins Scientific die Möglichkeit bietet, in 4 verschiedenen Positionen je 96 Proben auf eine Membran der Grösse 7,4 x 11 cm aufzubringen, konnten IRS-PCR Produktpaletten von 4 x 96 B1-Tieren aufgetragen werden.

Wie in Tab.2.1.2 genannt, wurden für die Filterherstellung jedoch nur IRS-PCR-Produkte verwendet, die eine ausreichende Produktpalette gezeigt hatten (Abb.3.1.2.a). Da die DNAs der Rückkreuzungstiere in 96-Loch Mikrotiterplatten aufbewahrt werden, wurde dieses Format für sämtliche Experimente beibehalten (IRS-PCR, Spotting auf Nylonmembranen). Die IRS-PCR-Reaktionen, die nicht die erforderliche IRS-Produktpalette aufwiesen, wurden für die Übertragung der Produkte auf Membranen aus der Mikrotiterplatte entnommen und durch verdünnten Ladepuffer ersetzt.

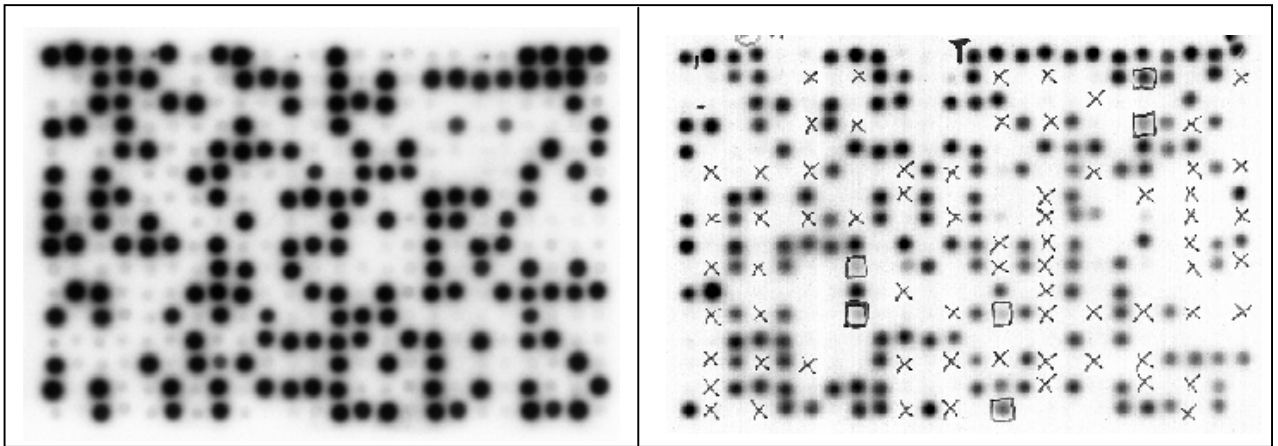


Abb. 3.1.2c) Filter mit IRS-PCR Produkten von 298 Rückkreuzungstieren. Auf den Filtern sind befinden sich IRS-PCR Amplifikate von 298 Rückkreuzungstieren der EUCIB-Kreuzung, 64 davon wurden für die Proteinkartierung eingesetzt. Für die Auswertung wurden nichtauswertbare Tiere, deren IRS-PCR Produktpalette unzureichend war, mit einem Kreuz markiert, mittelmässige IRS-PCR Amplifikate wurden mit einem Kästchen versehen und nur dann in die Auswertung mit einbezogen, wenn das Hybridisierungssignal eindeutig war. Es wurde unterschieden zwischen positiven (schwarzen, +) Signalen der heterozygoten Tiere, negativen (weissen/grauen/helleren, -) Signalen der homozygoten Tiere und nichtauswertbaren Signalen. Die Signale wurden in ein web/internet basierte Vorlage eingegeben, der eine Liste der auf dem Filter aufgetragenen Tiere zugrunde liegt (Software von Markus Kramer, Max-Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin).

3.1.3 Kartierungsdaten der IRS-PCR-Marker

Mit 150 IRS-PCR Markern wurde eine Genotypisierung der Rückkreuzungstiere durchgeführt. Alle Marker waren erwiesenermassen polymorph für *Mus musculus* und *Mus spretus* (Hopp, Himmelbauer unveröffentlicht), wobei bei *Mus musculus* ein Inter-B1-Produkt gebildet wird und bei Msp nicht. Die Vererbung der Markerallele in der F1- und B1-Tieren verläuft wie die in Abb.2.3 für (p)aV-Varianten demonstriert.

Hybridisierungen wurden mit Filtern von 118 oder 300 Tieren durchgeführt. Von 150 IRS-PCR Markern liessen sich 107 auswerten, diese sind in Tab.3.1.3.a) und b) aufgelistet. Das heisst 71% der IRS-PCR Marker, die bei Hybridisierung eines Blots mit B1R-Amplifikaten von 80 Rückkreuzungstieren unterscheidbare Signalklassen 'positiv' und 'negativ' ergeben hatten (Hopp, Himmelbauer unveröffentlicht), ergaben auch auf Nylonmembranen mit aufgetropften B1R-Amplifikaten von Rückkreuzungstieren auswertbare Ergebnisse. Von diesen wurden die 69 fett gedruckten Marker (Tab.3.1.3.a) und b)) zur Erstellung der genetischen Karte herangezogen (Kap.3.3).

Tab. 3.1.3.a): handgespottete Filter mit 118 Rückkreuzungstieren wurden mit den angegebenen Markern hybridisiert. Kopplungsergebnisse sowie der zugehörige LOD-Wert sind einmal für 118 Tiere angegeben, sowie auch für den kombinierten Datensatz aus 118 Tieren + 80 Genotypisierungen, die von M. Hopp und I. Dunkel im Labor von H. Himmelbauer durchgeführt worden waren (unveröffentlicht).

Marker	Chromosom	nahester Ankermarker	LOD-Wert (118 Tiere)	LOD-Wert (198 Tiere)	Tierzahl	% heterozygote
bir52e8	2	D2Mit1	19,32	34.51	194	44,8
bir52b16	3	D3Mit19	11.96	22.28	191	55,5
bir49I3	5	D5Mit385	11,51	18.39	193	56,5
bir47O4	6	D6Mit27	20.09	41.04	113	53,1
bir39O12	7	D7Mit40	25.37	40.62	196	51,0
bir45H3	7	Pkcc	17.27	31.5	193	49,2
bir51h12	9	D9Nds8	30.94	50.5	197	58,4
bir49a19	9	D9Mit24	19.08	38.03	198	57,1
bir39O6	9	D9Nds8	29.36	49.91	117	56,4
bir40A10	9	D9Mit24	14.66	32.57	194	46,9
bir43N4	9	D9Mit24	18.3	37.21	195	54,9
bir51f7	10	D10Mit20	17.25	25.98	115	52,2
bir53o22	11	D11Mit10	22.81	29.12	179	52,0
bir42k5	11	D11Mit10	22.88	31.03	198	54,0
bir51e15	11	D11Mit16	22.63	24.11	196	45,4
bir51c13	12	D12Mit4	28.77	52.08	198	50,5
bir51J9	14	D14Nds7	18.79	36.67	197	42,6
bir39C23	14	D14Nds7	20.98	36.94	198	42,9
bir46I18	14	D14Mit45	23.16	41.38	193	44,0
bir43G22	15	D15Mit11	19.59	35.26	194	51,0
bir51e3	15	D15Mit11	19.32	-	118	47,5
bir42M17	17	D17Mit25	20.39	37.48	198	48,0
bir46O17	17	D17Mit25	20.39	37.48	198	48,0
bir39P17	18	D18Mit8	22.34	38.03	198	52,0
bir51e8	19	Fth	27.01	47.56	195	46,7

Tab. 3.1.3.b): mikrodispenser-gespottete Filter mit 303 Rückkreuzungstieren wurden mit den angegebenen Markern hybridisiert. Kopplungsergebnisse sowie der zugehörige LOD-Wert sind angegeben. Da mit der Hybridisierung dieser Filter 80 Genotypisierungen, die von M. Hopp und I. Dunkel im Labor von H. Himmelbauer durchgeführt worden waren (unveröffentlicht), wiederholt wurden, konnte eine Fehlerrate für Hybridisierung und Auswertung ermittelt werden (siehe Spalte ‚Diskrepanzen‘).

Marker	Chromosom	nahester Ankermarker	LOD-Wert (303 Tiere)	Tierzahl	% heterozygote	Diskrepanzen
bir43a4	1	D1Mit12	45.41	302	59,9	2/63
bir51c6	1	D1Sel11	54.12	289	55,4	2/33
mbacr14k15	1	D1Mit12	49.79	300	54,3	1/26
mbacr23g5	1	D1Mit12	51.08	300	53,0	0/80
mbacr26d4	1	D1Mit12	54.57	302	54,6	1/16
mbacr38m14	1	D1Mit12	4.44	127	52,0	3/55
mbacr7d11	1	D1Mit65	40.88	277	49,1	1/24
bir39j10	2	D2Nds3	20.48	239	51,5	-
mbacr25p12	2	D2Mit11	28	274	60,9	-
mbacr38a17	2	Acra4	49.51	301	47,8	-
mbacr4k13	2	D2Nds3	25.1	246	51,6	2/79
bir51p6	3	D3Mit19	36	290	51,7	2/35

Marker	Chromosom	nahester Ankermarker	LOD-Wert (303 Tiere)	Tierzahl	% heterozygote	Diskrepanzen
bir54114	3	D3Mit19	3.99	69	58,0	1/7
mbacr11j21	3	D3Mit22	23.55	260	50,0	2/19
mbacr12j22	3	D3Mit22	22.28	216	50,9	2/33
mbacr26i21	3	D3Mit19	16.72	295	51,2	4/73
mbacr9f8	3	D3Mit22	21.62	216	48,6	2/25
mbacr12a12	4	D4Nds16	2,04	91	51,6	-
mbacr19c7	4	Tyrp1	19.8	288	45,1	1/57
mbacr21a12	4	D4Nds16	41.57	242	57,0	8/67
mbacr21j14	4	Mos	21,13	302	49,7	0/80
mbacr23i4	4	Mos	34.95	280	50,0	0/73
mbacr27m21	4	D4Mit52	22.15	260	51,9	10/68
bir39m21	5	D5Mit175	36.77	293	57,3	1/76
mbacr11o19	5	D5Mit385	15.47	222	55,4	10/61
mbacr14f5	5	D5Mit385	10.68	300	50,0	0/78
mbacr27d20	5	D5Mit385	31.87	258	52,7	0/80
mbacr27o9	5	D5Nds6	47.12	302	55,3	0/79
mbacr2k17	5	D5Mit175	17.81	279	54,1	3/76
mbacr32a11	5	D5Mit169	47.94	302	51,7	1/80
mbacr3e9	5	D5Mit169	30.05	296	50,3	0/77
bir54117	6	D6Mit24	76.66	294	48,0	4/61
mbacr19h22	6	D6Mit166	17.25	121	50,4	-
mbacr22f5	7	Pkcc	34.58	296	43,9	0/80
mbacr43c14	7	D7Mit40	21.38	300	46,0	1/38
bir38b16	8	D8Mit35	9.37	227	52,9	11/73
mbacr10i4	8	D8Mit35	34.9	245	53,9	2/75
mbacr12c1	8	D8Mit35	6.78	256	56,6	5/58
mbacr26o8	8	D8Mit35	7.29	220	52,3	5/51
bir45b9	9	D9Mit19	42.19	194	52,6	2/13
bir45o14	9	D9Mit24	20.12	208	64,4	3/73
mbacr1k4	9	D9Nds8	19.69	127	59,1	1/24
mbacr4g24	9	D9Mit42	26.08	136	50,7	1/23
mbacr6119	9	D9Nds8	26.67	185	53,5	1/10
mbacr9k13	9	D9Mit42	33,61	194	56,2	0/23
mbacr20i3	10	D10Mit24	43.23	295	50,8	3/37
mbacr25h16	10	D10Mit7	29.86	271	54,6	11/65
mbacr2o6	10	D10Mit20	22.82	277	49,1	1/17
mbacr27i20	11	D11Mit16	30.42	301	46,8	1/40
bir55d15	12	D12Mit4	32.57	195	49,2	3/44
bir55g18	12	D12Mit4	52.47	227	52,9	1/19
mbacr23e8	12	D12Nds2	29.36	201	49,8	1/40
mbacr10n19	13	D13Mit17	14.51	194	61,9	7/44
mbacr19c20	13	D13Mit10	33.56	302	52,0	1/40
mbacr20c8	13	D13Mit10	48.28	277	50,5	-
mbacr23h10	13	D13Mit10	49.28	277	50,5	1/38
mbacr3o11	13	D13Mit47	63.22	299	55,5	0/80
mbacr8a13	13	D13Mit10	33.87	297	51,9	2/79
bir38b10	14	D14Mit38	41.38	194	43,3	0/22
mbacr11b5	14	D14Nds7	34.18	193	45,6	2/23
mbacr13e20	14	D14Mit38	16.31	109	50,5	1/30
mbacr19c16	14	D14Nds1	47.73	202	43,1	1/77
mbacr3m16	14	D14Nds1	39.36	172	47,1	1/64
mbacr9f6	14	D14Mit45	46.73	192	45,3	5/21
bir42m2	15	D15Mit29	22.24	160	50,6	4/53

Marker	Chromosom	nahester Ankermarker	LOD-Wert (303 Tiere)	Tierzahl	% heterozygote	Diskrepanzen
bir46p16	15	D15Mit11	30.29	230	50,9	7/74
mbacr20n16	15	D15Mit29	60.41	299	52,5	11/72
mbacr10p3	16	Prm1 (16)	23.11	235	52,3	1/37
mbacr31d24	16	Prm1 (16)	28.59	193	48,2	3/38
mbacr11g8	17	D17Mit25	9.52	94	54,3	1/14
mbacr23a8	17	D17Mit39	46.81	296	51,7	0/80
173r15g19	17	D17Mit9	21.34	109	48,6	0/15
173r16i7	17	D17Mit9	39.7	286	49,7	2/79
173r9h7	17	D17Mit25	47.32	298	48,0	4/79
bir46e6	18	D18Mit24	36.29	257	53,7	0/78
mbacr11c1	18	D18Mit24	36.19	230	54,8	2/35
mbacr23f8	18	D18Mit24	39.81	296	54,7	0/77
bir53k5	19	D19Mit1	31.53	173	56,6	4/33
bir38i17	X	DXHar2	47,96	293	29,4	2/23
mbacr11p9	X	DXMit54	32.72	151	39,1	1/24

Diskrepanzen aller Marker aus
Tabelle B: 4,84%

**Diskrepanzen der für die
Kartierung verwendeten Marker
(Tabelle B. fett): 3,46%**

Tabellen 3.1.3.a) und 3.1.3.b) listet diejenigen IRS-PCR Marker auf, mit denen auswertbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Dick gedruckte Marker wurden für die Erstellung der genetischen Karte (siehe Anhang Chromosomenkarten) verwendet.

Markerdaten aus Teil A der Tabelle, die auf Filtern mit 118 Tieren erhoben wurden, wurden mit den Daten für 80 weitere Rückkreuzungstiere (Hopp, Himmelbauer unveröffentlicht) vereinigt und gemeinsam für die genetische Kartierung eingesetzt.

Filter mit 300 Tieren enthielten besagte 80 Tiere und wurden mit schon existierenden Daten mit Hilfe eines kleinen Programms abgeglichen (Kap.3.1.4). Zu jedem Marker ist die Zahl der auswertbaren Tiere aufgelistet

3.1.4 Datenqualität

Als Kontrolle für die Qualität der gewonnenen Daten diente das Verhältnis von positiven zu negativen Signalen auf einem Filter. Man erwartet, dass beide Allele eines Genorts der heterozygoten F1-Tiere mit gleicher Wahrscheinlichkeit an die B1-Tiere weitergegeben werden. Das Verhältnis der positiven und negativen Signale aller ausgewerteten Marker liegt für die Experimente mit 118-Tier Filtern bei 49,5 %, für die 300-Tier Filter bei 51,5 %. Für einige Marker traten grosse Ungleichgewichte im Verhältnis von positiven zu negativen Allelen auf. Der Marker bir38i17 zeigt von 293 ausgewerteten Tieren 86 positive Signale und 207 negative und damit ein Verhältnis von ca. 1/3 hetero- zu 2/3 homozygoten Tieren. Er liegt auf dem X-Chromosom. Für Marker mbacr11p9 wurden nur 39,1% statt der erwarteten 50% heterozygote B1-Tiere ermittelt, er und kartiert ebenfalls auf dem X-Chromosom.

Weitere Marker mit einem Überschuss an heterozygoten B1-Genotypen (positive Signale) sind bir45o14 (64,4% hetero-/homozygote B1-Tiere), der auf Chromosom 9 kartiert, mbacr10n19 mit 61,9% (Chromosom 13) und mbacr25p12 mit 60,9% auf Chromosom 2. Mbacr25p12 zeigt allerdings drei Signal-Intensitätsklassen: zur Analyse wurden jedoch nur die eindeutig positiven und eindeutig negativen Signale herangezogen, während die mittlere Intensitätsklasse ignoriert wurde. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein drittes Allel, das von einem heterozygoten Msp-Tier stammt (Rhodes et al. 1998).

Das oben beschriebene Phänomen ist unter dem Namen ‚Segregationsungleichgewicht‘ (segregation distortion) bekannt und beschrieben (Charlesworth 1994; Montagutelli et al. 1996; Schimenti 2000).

Als Gründe für eine Selektion von Msp Allelen (Fundele) gibt Fundele Unverträglichkeit der B6 Loci mit bestimmten Loci von Msp an, so dass nur Tiere mit dem betreffenden homozygoten Genotyp geboren werden. Marker mit einem Überschuss an heterozygoten Genorten, können aus der Region des t-Komplex auf Chr17 stammen, dort existieren mehrere kleine Inversionen, die eine Rekombination nicht zulassen und daher eine Selektion der heterozygoten Genotypen bewirken. Da die hier genannten Marker jedoch von anderen Chromosomen stammen, kann angenommen werden, dass eventuell weitere kleine chromosomale Inversionen die Spezies *Mus musculus* von *Mus spretus* unterscheiden und zur Separation der Spezies beitragen.

Als weitere Kontrolle diente der Abgleich von Daten der 80 Rückkreuzungstiere, die sowohl mittels Hybridisierung der 300-Tier Filter von mir selbst als auch schon vorher von M. Hopp und I. Dunkel der Arbeitsgruppe Himmelbauer (unveröff.) durch Hybridisierung von Blots erhoben worden waren. Übereinstimmende Daten wurden übernommen, widersprüchliche Daten wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Von insgesamt über 3000 Genotypisierungsdaten der Marker aus Tab.3.1.3.b zeigten 4,84% Widersprüche. Die Rate war geringer (3,46%) bei denjenigen Markern, die zur Erstellung der genetischen Karte herangezogen worden waren. Dietrich ermittelt für die Genotypisierung mit Mikrosatellitenmarkern durch wiederholte Typisierung eine Fehlerrate von 0,7% (Dietrich et al. 1992). Da unter den in dieser Arbeit und von Hopp erhobenen widersprüchlichen Daten statistisch gesehen ca. 50% als richtig angenommen werden können – eine dritte Wiederholung der Experimente wurde nicht durchgeführt - halbiert sich die Rate der fehlerhaften Daten auf 1,7 % und liegt damit im Rahmen der Fehlerrate, die für genetischer Daten ermittelt wurde: sie beträgt 0,5 - 3,0% (Boyd 1998).

3.1.5 Einsatzmöglichkeiten der IRS-PCR Marker für andere Mäusekreuzungen

Da auf jedem Hybridisierungsfiter Kontrolltiere aufgetragen worden waren, lassen sich die Einsatzmöglichkeiten der einzelnen IRS-PCR Produkte für genomweite Kopplungsuntersuchungen mit verschiedenen Kreuzungen zusammenstellen. Alle verwendeten Marker geben für B6 ein positives Hybridisierungssignal und sind daher nur für Kreuzungen folgender Art einzusetzen:

(B6 X M) x M, wobei M einer der folgenden Stämme sein kann: LS, Msp, PWB, CAST/Ei.

Tab. 3.1.5.: Einsatzmöglichkeiten der IRS-PCR Marker für andere Mäusekreuzungen

Marker	Chromosom	B6	M.spret.	MSP	PWB	CAST/Ei	A23	SHRSP
bir38l17	X	1	0	0	1	0	0	0
mbacr11p9	X	1	0	0	1	1	0	0
bir43a4	1	1	0	0	1	1	0	0
bir51c6	1	1	0	0	0	0	0	0
mbacr14k15	1	1	0	0	1	1	0	0
mbacr23g5	1	1	0	0	0	1	0	0
mbacr26d4	1	1	0	0	1	1	0	0
mbacr7d11	1	1	0	0	0	1	0	0
bir39j10	2	1	0	0	1	1	0	0
mbacr38a17	2	1	0	0	1	1	0	0
bir51p6	3	1	0	0	0	1	0	0
mbacr11j21	3	1	0	0	1	1	0	0
mbacr12j22	3	1	0	0	1	1	0	0
mbacr9f8	3	1	0	1	1	1	0	0
mbacr26l21	3	1	0	0	1	1	0	0
mbacr12a12	4	1	0	0	1	1	0	0
mbacr19c7	4	1	0	0	1	1	0	0
mbacr21a12	4	1	0	0	1	1	0	0
mbacr21j14	4	1	0	0	1	1	0	0
mbacr23i4	4	1	0	0	1	1	0	0
mbacr27m21	4	1	0	-	1	1	0	0
bir39m21	5	1	0	0	1	1	0	0
mbacr11o19	5	1	0	1	1	1	0	0
mbacr14f5	5	1	0	0	1	1	0	0
mbacr27d20	5	1	0	0	1	1	0	0
mbacr27o9	5	1	0	1	1	1	0	0
mbacr2k17	5	1	0	0	1	1	0	0
mbacr32a11	5	1	0	0	0	1	0	0
mbacr3e9	5	1	0	-	1	1	0	0
bir54l17	6	1	0	0	0	1	0	0
mbacr19h22	6	-	0	0	1	1	0	0
mbacr22f5	7	1	0	0	1	0	0	0
mbacr43c14	7	1	0	0	1	0	0	0
mbacr10i4	8	1	0	0	1	1	-	-
mbacr12c1	8	1	0	0	1	1	0	0
mbacr26o8	8	1	0	0	0	1	0	0
bir45b9	9	1	0	0	0	0	0	0
bir45o14	9	1	0	0	1	1	0	0
mbacr4g24	9	1	0	0	1	0	0	0
mbacr9k13	9	1	0	0	1	0	0	0
mbacr20i3	10	1	0	0	0	1	0	0
mbacr25h16	10	1	0	0	0	0	0	0

Marker	Chromosom	B6	M.spret.	MSP	PWB	CAST/Ei	A23	SHRSP
mbacr2o6	10	1	0	0	1	1	0	0
mbacr27l20	11	1	0	0	0	0	0	0
bir55d15	12	1	0	1	0	0	0	0
bir55g18	12	1	0	0	1	1	0	0
mbacr23e8	12	1	0	0	1	0	0	0
mbacr25p12	12	1	0	1	1	1	0	0
mbacr19c20	13	1	0	0	0	0	0	0
mbacr20c8	13	1	0	0	1	0	0	0
mbacr23h10	13	1	0	0	1	0	0	0
mbacr3o11	13	1	0	1	1	1	0	0
mbacr8a13	13	1	0	-	-	-	0	0
bir38b10	14	1	0	0	1	1	0	0
mbacr13e20	14	1	0	0	1	1	0	0
bir42m2	15	1	0	0	1	1	0	0
mbacr20n16	15	1	0	0	1	1	0	0
mbacr10p3	16	1	0	-	-	-	0	0
mbacr23a8	17	1	0	0	-	1	0	0
173r15g19	17	1	0	0	0	1	0	0
173r16i7	17	1	0	0	0	0	0	0
173r9h7	17	1	0	0	1	1	0	0
bir46e6	18	1	0	0	1	1	0	0
mbacr11c1	18	1	0	0	0	1	0	0
mbacr23f8	18	1	0	0	1	1	0	0
bir53k5	19	1	0	0	-	-	0	0

B6 *Mus musculus domesticus* C57BL/6

M.spret. *Mus spretus* (geschlossene Kolonie SPR, (Breen et al. 1994))

A23 Hamster

SHRSP Ratte

PWB *Mus musculus musculus* (Prag)

CAST *Mus musculus castaneus* CAST/Ei

MSP *Mus spretus* SPRET/Ei (Inzuchtstamm des Jackson Laboratory)

3.1.6 Kartierungsdaten für Mikrosatellitenmarker

Tab. 3.1.6 listet 9 Mikrosatelliten-Marker auf, mit denen eine Genotypisierung der Rückkreuzungs-tiere durchgeführt wurde, um verbliebene Lücken in der genetischen Karte zu schliessen. Wie Abb.3.3.2 zeigt existieren auch nach Einbau aller verfügbaren IRS-PCR-Marker noch Regionen, die nicht mit Markern charakterisiert wurden. Genotypisierungen wurden mit der DNA der 64 zur Proteinkartierung eingesetzten Tiere durchgeführt. Die Ergebnisse wurden zur Erstellung der genetischen Karte herangezogen (siehe Anhang: Chromosomenkarten).

Tab. 3.1.6: Mikrosatellitenmarker (SSLP, Einzelsequenz Längenpolymorphismen). Marker wurden beschrieben von Dietrich (Dietrich et al. 1992; Dietrich et al. 1996). ‚EU‘ steht für Längenangaben der Marker, wie sie in den Parentalstämmen der EUCIB-Rückkreuzung auftreten, WH‘ Markerlängen der Parentalstämmen des Whitehead-Kreuzung.

Regionen geringer Markerdichte	Mikrosatelliten -marker	cM Position (CCR)	LOD-Wert der Kopplung zu Ankermarkern	B6	MSP
Chr 1 D1Mit65 - D1Mit12	D1Mit211	12 cM	D1Mit65 LOD 5.50 D1Mit12 LOD 2.62	146bp (WH)	116bp (WH)
	D1Mit234	25 cM	D1Mit65 LOD 2.72 D1Mit12 LOD 3.77	145bp (WH)	kein Produkt (WH)
Chr 6 D6Nds4 - D6Nds5	D6Mit105	41 cM	D6Mit24 LOD 1.23	239bp (EU)	200bp (EU)
Chr 8 D8Mit59 – D8Mit35	D8Mit261	35 cM	Kopplung zu Chr8, 17 und X	107bp (EU)	114bp (EU)
	D8Mit4	12 cM	D1Mit65 LOD 1.93 Daten wurden mit den MBx-Daten vereinigt	157bp (EU)	172bp (EU)
Chr 16 Prm1 – D16Nds1	D16Mit36	7.9 cM	Prm1 LOD 7.12 D16Nds1 5.02	152bp (EU)	140bp/ 162bp! (EU)
	D16Mit4	15.8 cM	Prm1 LOD 3.01 D16Nds1 LOD 3.49	132bp (WH)	145bp (WH)
Chr 19 D19Ler1 - D19Nds1	D19Mit12	30cM	D19Ler1 LOD 6.48 D19Nds1 LOD 3.56	150bp (WH)	124bp (WH)
Chr X DXMit54 - DXMit8	DXMit81	16 cM	DXMit54 LOD 5.74 DXMit8 LOD 5.45	199bp (WH)	181bp (WH)

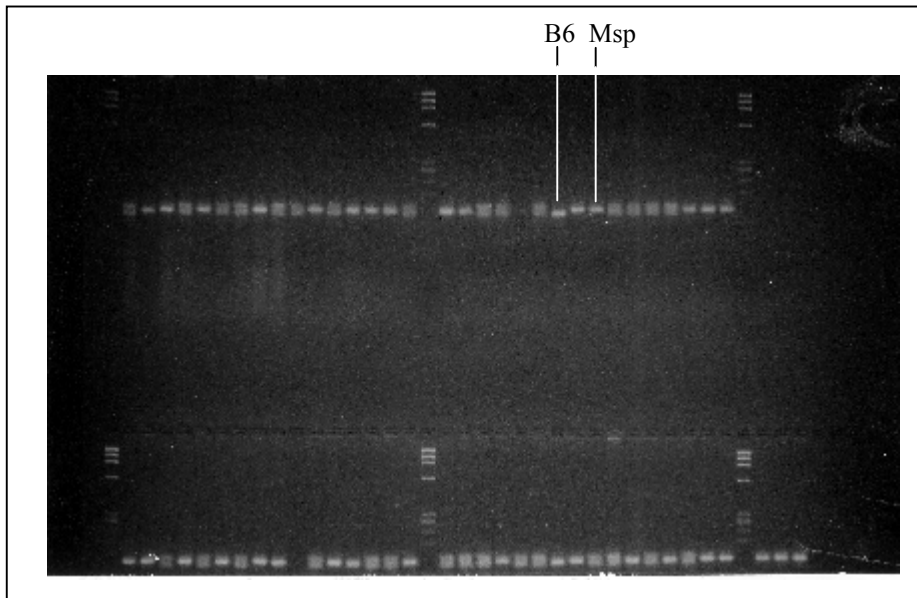


Abb.3.1.6.a) Der Mikrosatellitenmarker D1Mit211 zeigt Allele unterschiedlicher Grösse in B6 und Msp (siehe homozygote Kontrollen). Homozygote Rückkreuzungstiere zeigen eine einzige Bande, die ausschliesslich das Allel von Msp enthält, heterozygote Rückkreuzungstiere zeigen zwei Banden, eine von B6 und eine von Msp.

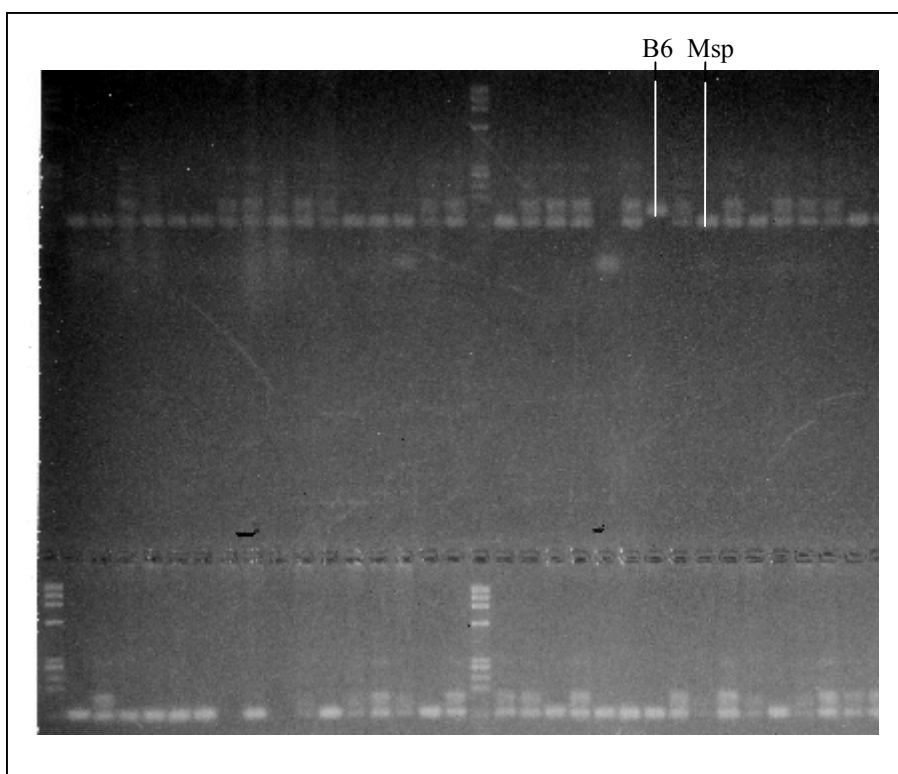


Abb.3.1.6.b): Der Mikrosatellitenmarker D19Mit12 zeigt Allele unterschiedlicher Grösse in B6 und Msp (siehe homozygote Kontrollen). Homozygote Rückkreuzungstiere zeigen eine einzige Bande, die ausschliesslich das Allel von Msp enthält, heterozygote Rückkreuzungstiere zeigen zwei Banden, eine von B6 und eine von Msp