

## 2. Material

### 2.1. Humane Zelllinien

Die in Tab. 1 aufgeführten Zelllinien wurden eingesetzt, um die HLA-gekoppelten OR Gene auf ihren Polymorphismusgrad hin zu untersuchen.

Zelllinie	Herkunft	Ethnische Abstammung	MHC-Klasse I Antigene HLA-	Referenz oder Herkunfts-Labor
BM19.7	BL	Schwarzafrikaner	A2, B13, Bw4	(Ziegler et al., 1985)
BM28.7	BL	Schwarzafrikaner	A1, B35, Bw6, Cw4	(Volz et al., 1992)
LG2	B-EBV	Kaukasier	A2, B27, Bw4	(Van-Els et al., 1990)
H2LCL	B-EBV	Kaukasier	A3, B7, Bw6	(Heinrichs et al., 1980)
KR3598	B-EBV	Kaukasier	A2, B44, Bw4	(Heinrichs et al., 1980)
AMAI	B-EBV	Algerier	A68, B53, Bw4	(Harada et al., 1992)
YAR	B-EBV	Jude	A26, B38, Bw4	Sy-Yang
OLGA	B-EBV	Amerik. Indianer	A31, B62, Bw6	Layrisse
SA	B-EBV	Japaner	A24, B7, Bw6	TSUJI
WT51	B-EBV	Kaukasier	A23, B65, Bw6	Ceppellini

Tab. 1: Humane HLA-typisierte Zelllinien. Die Zelllinien wurden für die Polymorphismusanalyse verwendet. Es ist lediglich die Expression der HLA-Klasse I Moleküle aufgeführt. BL: Burkitt Lymphom, B-EBV: EBV-transformierte B-Zelle.

### 2.2. Chemikalien und Materialien

- Acrylamid (research grade)	Serva, Heidelberg
- Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
- Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
- Ampicillin	Sigma, München
- Bacto-Agar	Difco, Detroit
- Bacto-Trypton	Difco, Detroit
- Borsäure	Merck, Darmstadt
- Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
- Denhardt's Solution Powder	Sigma
- Desoxycytidin 5'- [ $\alpha$ - $^{32}P$ ] Triphosphat	Amersham, (Braunschweig)
- Desoxyribonukleotide (dNTP's), Ultrapure	Pharmacia, Uppsala
- Dextransulfate-Na-Salz	Pharmacia, Uppsala
- Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg
- DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, München
- DNase I	Boehringer, Mannheim
- Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva, Heidelberg

- ECL-Kit	Amersham LIFE SCIENCE (Braunschweig)
- Falcon-Röhrchen	Becton Dickinson Labware, USA
- Filterpapier 3MM	Whatman, Maidstone, Kent
- Ficoll 400	Pharmacia, Uppsala
- Filling-In-Buffer	USB
- Fötale Kälberserum (Fetal calf serum, FCS)	Seromed, Berlin
- Formamid	Serva, Heidelberg
- Fotoemulsion, Ilford G5	Ilford
- Glucose	Sigma, München
- Glyzerin	Serva, Heidelberg
- Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Seromed, Berlin
- Harnstoff	Sigma, München
- Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Merck, Darmstadt
- Kanamycinsulfat	Sigma, München
- Lachssperma- und Plazenta-DNA	Sigma, München
- Längenstandard, 1kb	Gibco-BRL, Paisley
- Marathon-Ready™cDNA-Kit	Clontech, Palo Alto (USA)
- mRNA-Hoden	Clontech, Palo Alto (USA)
- Megaprime Labelling Kit, $\alpha$ [ <sup>32</sup> P] dCTP	Amersham LIFE SCIENCE (Braunschweig)
- N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
- Mineralöl (PCR)	Sigma, München
- Mischbettionenaustauscher AG501X8D	BioRad, Richmond
- Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
- rNukleotide (NTP's)	Pharmacia
- Natrium-Pyruvat	Seromed, Berlin
- Nylonmembranen Hybond-™N+	Amersham Pharmacia Biotech
- Nirocellulose-Blättchen (zur Dialyse)	Millipore Corporation, Bedford
- Penicillin/Streptomycin (10mg/ml)	Seromed, Berlin
- peqGOLD TriFast™	PeqLab, Erlangen
- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, München
- Proteinase K	Boehringer, Mannheim
- Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, München
- Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim
	Gibco-BRL
	New England Biolabs, USA
	Pharmacia
	Stratagene
- RNAgents®Total RNA Isolation System	Promega, USA
- RNA Ladder	MBI Fermentas
- RNase A	Boehringer, Mannheim
- RNA-Polymerasen (SP6, T7)	GIBCO-BRL
- RNasin Placental Ribonuklease, RNA-Inhibitor	Promega

- RNase AWAY <sup>TM</sup> (Molecular BioProducts)	Molecular BioProducts
- RPMI 1640 Medium mit Glutamax-I	Gibco BRL
- Sephadex G50	Pharmacia, Uppsala
- Sephacryl 300	Pharmacia, Uppsala Schweden
- Sequenzier-Kit: Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Pharmacia Biotech
- Silikonlösung	Serva
- SuperScript <sup>TM</sup> II Kit (Reverse Transcriptase)	Gibco-BRL, Paisley
- SYBR-Green	Molecular Probes, Niederlande
- AmpliTaq <sup>®</sup> DNA	Perkin Elmer
- Taq – Ex Taq	Takara, Japan
- N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
- Terasaki-Platte	NUNC <sup>TM</sup> Brand Products
- TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen Niederlande
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma, München
- XGAL (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid)	Boehringer, Mannheim
- Xylencyanol	BioRad, USA
- Yeast Extract	Difco, USA
- Yeast tRNA	GIBCO-BRL

Sämtliche anorganischen Salze sowie Alkohole und Säuren wurden von Merck (Darmstadt) bezogen und waren vom Reinheitsgrad „pro analysi“.

### 2.3. Geräte

- Agarosegel-Laufkammern 24 x 19 cm	Gibco BRL
13 x 10 cm	Eigenherstellung
10 x 8 cm	Pharmacia Biotech
- BIO-Link BLX (Cross-Linker)	ITF-Labortechnik, Wasserburg
- Blautisch Flu-O-blu	Biozym, Hess. Oldendorf
- Brutschränke für Zellkultur	EG120IR, Jouan
für Mikroorganismen	BT5042, Heraeus
- Feinpipetten	Eppendorf
- Gene-Pulser für Elektroporation	BioRad
- Feinwaagen	PC440, Mettler
	PC4400, Mettler
- Gelkammern	Höfer Scientific Instruments
- Glasgeräte	Schott
- Heizwasserbad	Analytec, Tübingen
	Julabo Labortechnik, GMBH
- Kippschüttler	Heidolph
- Kühlzentrifuge	Centricon H401, Kontron

- Sequenziergerät (Li-cor Modell 4000)	LI-COR Bioscience GmbH, Bad Homburg
- Lyophilisator	Christ - Gefriertrocknungsanlagen, Osterode
- Magnetrührer	Janke&Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen
- Netzgeräte	Biorad, USA Consort E 554 P24 Biometra Pharmacia Biotech
- Photometer	Uvicon 820, Kontron LP1 (560 nm), Dr. Lange
- PCR-Stripes	Sarstedt, Nümbrecht
- Schüttler	HAT, Infors
- Super Frost */Plus Objektträger	Menzel-Gläser
- Szintillationszähler	1217 Rackbeta, LKB
- Thermocycler	Biometra, Göttingen
- Tischzentrifuge	5414S, Eppendorf
- Ultrazentrifuge	Centricon T-2070
- Vortex	Bender&Hobein AG IKA Works, Wilmington

## 2.4. Medien

Sämtliche Medien wurden vor dem Gebrauch autoklaviert bzw. durch einen 0,2µm Membranfilter sterilfiltriert.

- LB- (Luria-Bertani)-Medium	10 g	Bacto-Trypton
	5 g	Yeast Extrakt
	10 g	NaCl
	0,5 ml	2 M NaOH
	15 g	Bacto-Agar (nur für Platten)
	ad 1 l	ddH <sub>2</sub> O
	falls nötig, wird nach dem Autoklavieren steril zugegeben:	
	40 µg/ ml	Ampicillin
	50 µg/ ml	Kanamycin
- SOB- Medium	20 g	Bacto-Trypton
	5 g	Bacto-Yeast
	0,584 g	NaCl
	0,186 g	KCl
	ad 1 l	ddH <sub>2</sub> O
	Autoklavieren	
- SOC- Medium	1 l	SOB
	10 ml	MgCl <sub>2</sub> (1M), steril
	7,2 ml	Glucose (50%), steril
- Antibiotika:		

Ampicillin (1000x)	100 mg/ml in 50% Ethanol
Kanamycin (300x)	70 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
- IPTG (1000x)	400 mM IPTG in ddH <sub>2</sub> O (für LB-Platten)
	1 M IPTG in ddH <sub>2</sub> O (für PAC-Induktion)
- RPMI mit 10% FCS	500 ml RPMI 1640 mit Glutamax I
	10% FCS (50ml)
	5 ml Natriumpyruvat (100 mM)
	10 ml Penicillin/Streptomycin (10mg/ml)
- Einfriermedium	10 ml DMSO
	90 ml FCS
- X-GAL	20 mg/ ml in DMF

## 2.5. Puffer und Lösungen

Sämtliche Pufferlösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

- Acrylamid Stammlösung 40%	38,6%	Acrylamid (w/v)
	1,4%	N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)

500 ml Lösung wurden mit 3 g Mischbettionenaustauscher (AG501X8D) 1 h bei RT gerührt. Der Mischbettionenaustauscher wird anschließend über einen 0,45 µm Membranfilter abfiltriert. Die fertige Lösung wird lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

- Acrylamid-Lösung 10%	50 ml	TBE 10x
	125 ml	Acrylamid 40%
	325 ml	ddH <sub>2</sub> O
- Ammoniumacetat Lösung 5x	8,5 M	Ammoniumacetat
- APS-Lösung 10%	100mg	Ammoniumpersulfat
		gelöst in 1 ml ddH <sub>2</sub> O
- DEPC-Wasser für RNA-Arbeiten	0,1%	Diethyl Pyrocarbonat
		in ddH <sub>2</sub> O, über Nacht rühren lassen
		nächsten Tag autoklavieren
- Block-Lösung		für die Hybridisierung
	100 ml	TE-Puffer
	500 µg	DNA (aus Lachssperma, E.coli, oder menschlicher Plazenta)
- Denaturierungspuffer 4x		für Southernblotting
	2 M	NaOH
	4 M	NaCl
- 100 x Denhardt's-Lösung	0,2 g	Ficoll 400
	0,2 g	PVP, Polyvinylpyrrolidone
	0,2 g	BSA-Rinderserumalbumin
		in DEPC-Wasser ad 10 ml lösen
		in 1 ml Aliquots bei -20°C lagern
- Depurinierungslösung 1x		für Southernblotting
	250 mM	HCl

- DNase Lösung	50 mg/ml	DNase I aus Rinderpankreas
	150 mM	NaCl
	50%	Glyzerin
	aliquotiert bei -20°C aufbewahren	
- DTT-Lösung 0,1 M	für 20 ml Ansatz	
	309 mg	DTT
	18 ml	DEPC-Wasser
	20 µl	EDTA 0,5 M
	pH 6,0 einstellen und auf 20 ml mit DEPC-Wasser auffüllen	
- EDTA 0,5 M pH9	146 g	EDTA
	mit ddH <sub>2</sub> O auf 1l auffüllen und auf pH 9 einstellen	
- Ethidiumbromidlösung	300 ng/ml in 0,25 x TBE	
- Extraktionspuffer	10 mM	Tris/HCL pH 8,0
	100 mM	EDTA
	0,5%	SDS
	20 µg	RNase aus Rinderpankreas
- Färbelösung	300 ng/ml	Ethidiumbromid in 0,25 x TBE
- Glycin/PBS-Lösung	für 500 ml Ansatz	
	37,5 g	Glycin
	in 500 ml 1 x PBS lösen	
	0,5 ml	DEPC
	autoklavieren, mit NaOH pH 7,4 einstellen	
- Hybridisierungslösung	für radioaktive Markierung	
	nach Church (Church and Gilbert, 1984)	
	0,1 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,2 mM	EDTA
	auf 190 ml mit ddH <sub>2</sub> O lösen	
	mit 0,1 M NaOH auf pH 7,2 einstellen	
	1%	BSA (w/v)
	lösen bei 68°C	
	7%	SDS (w/v)
	lösen bei 68°C	
	die Lösung wird warm durch ein 0,8 µm Membranfilter filtriert	
	und in 50 ml Aliquots bei -20°C eingefroren	
- Hybridisierungslösung	für <i>In-situ</i> -Hybridisierung	
	für 1 ml Ansatz	
	500 µl	Formamid (50%), erst vor Gebrauch zugegeben
	125 µl	10 x Salze
	100 µl	0,1 M DTT
	25 µl	Hefe-tRNA
	250 µl	Dextransulfat (50%)
- Hydrolysepuffer	für Alkalische Hydrolyse ( <i>In-situ</i> -Hybridisierung)	

	100 µl Ansatz	
	8 µl	NaHCO <sub>3</sub> (1 M)
	12 µl	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1 M)
	10 µl	DTT (0,1 M)
	70 µl	DEPC-Wasser (0,1%)
- Ladepuffer	für Acrylamid- und Agarose-Gele 5x	
	6 g	Sacharose
	2 g	Ficoll
	50 mg	Bromphenolblau
	50 mg	Xylencyanol
	auf 20 ml mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen	
- FA-Ladepuffer für RNA-Gele	1 mM	EDTA pH 8
	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol
	50%	Glycerin
- MOPS-Laufpuffer 10 x	0,4 M	MOPS
für RNA-Gele	0,1 M	Natriumacetat
	0,01 M	EDTA
- Natriumacetatlösung 5x	1,5 M	Natriumacetat
- Nukleotidmix für PCR 10x	2 mM	dATP
	2 mM	dCTP
	2 mM	dGTP
	2 mM	dTTP
- Paraformaldehyd 4%	20 g	Paraformaldehyd
	500 ml	1 x PBS
	bei 70°C ca 3-4 h rühren lassen, bis die Lösung klar ist	
	pH 7 einstellen	
- PBS Phosphate Buffered Saline (10 x)	für 1000 ml Ansatz	
	2,76 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O
	14,24 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O
	76 g	NaCl
	1 ml	DEPC, nur bei RNA-Arbeiten, autoklavieren!
	pH 7,2 einstellen (NaOH), mit aqua dest auf 1 Liter auffüllen	
- Plasmidisolierungslösungen (nach Quiagen)		
Puffer 1	50 mM (6,06 g)	TRIS
	13 mM (3,72 g)	EDTA x H <sub>2</sub> O
	in 800 ml H <sub>2</sub> O lösen	
	pH mit HCl einstellen	
	auffüllen auf 1 l	
	100 mg RNase (erst nach pH-Einstellung zugeben)	
	Aufbewahrung bei 4°C	
Puffer 2	200 mM (8 g)	NaOH

	in 900 ml H <sub>2</sub> O lösen
	100 ml            70%ige SDS-Lösung
	auf 1 l mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Puffer 3	3 M (294,5 g)    Kaliumacetat
	in 500 ml H <sub>2</sub> O lösen
	pH 5,5 einstellen
	mit konzentrierter Essigsäure auf 1 l auffüllen
	Aufbewahrung bei 4°C
- PMSF-Lösung (Proteinasehemmer)	10 mM            17,4 mg PMSF in 10 ml Isopropanol
- Posthybridisierungslösung	für <i>In-situ</i> -Hybridisierung
	1 Liter Ansatz
	500 ml            Formamid, erst bei Gebrauch zugeben
	100 ml            10 x Salze
	1,6 g             DTT
	400 ml            deionisiertes Wasser
- Proteinase K Stammlösung	20 mg/ml        Proteinase K
	aliquotiert bei -20°C aufbewahren
- RNAse Stammlösung	10 mg/ml        RNAse A aus Rinderpankreas
	10mM            Tris/HCl pH 7,5
	15 mM            NaCl
	15 min bei 100°C kochen und
	anschließend aliquotieren und bei -20°C aufbewahren
- Puffer H für Restriktionsverdau (10x)	500 mM         Tris/HCl
	100 mM         Magnesiumchlorid
	1 M              NaCl
	10 mM          DTE
	bei 37 °C mit 0,1 M HCl auf pH 7,5 einstellen
- 10 x Salze	200 ml Ansatz
	120 ml          NaCl 5 M
	20 ml            Tris-HCl 1M, pH 7,5
	20 ml            Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,8
	20 ml            EDTA 0,5 M, pH 8,0
	18 ml            DEPC-Wasser
	2 ml             100 x Denhardt's, kurz vor Gebrauch zugeben
- Spermidin Lösung (25x)	100 mM         Spermidin x 3 HCl
	mit 2 M NaCl auf pH 7,0 einstellen
- SDS Puffer	10%             SDS
- SSC Puffer 20x	3 M              NaCl
	0,3 M            Natriumcitrat
	mit 0,1 M HCl auf pH 7,0 einstellen und durch einen 0,45 µm
	Membranfilter filtrieren
- STE Puffer	15 ml            NaCl



für Sephacryl-Waschen	485 ml	1x TE
- Stop-Formamid-Puffer (Sequenz-Reaktion)	95%	Formamid
	10 mM	NaOH
	10 mM	EDTA
	0,25%	Xylencyanol
	0,25%	Bromphenolblau
- Stoppuffer für Alkalische Hydrolyse	100 µl Ansatz	
	6,6 µl	Natriumacetat (3 M)
	1µl	Essigsäure 100%
	82,4 µl	DEPC-Wasser
- TBE- (Tris-Borat-EDTA)-Puffer 10 x	900 mM	Tris
	900 mM	Borsäure
	40 ml	EDTA (0,5 M, pH 9)
- TAE- (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer 10x	400 mM	Tris
	11 ml	Essigsäure (100%)
	20 ml	EDTA (0,5 M, pH 7,5)
- TE- (Tris-EDTA)-Puffer 10x	100 mM	Tris/HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA
- TES-Waschlösung 10 x	für <i>In-situ</i> -Hybridisierung	
	für 1000 ml Ansatz	
	100 ml	Tris-HCl 1M, pH 7,5
	20 ml	EDTA 0,5M
	289 g	NaCl
	auffüllen mit deionisiertem Wasser, pH 7,5	
- Yeast-tRNA	50 mg/ml	Y-tRNA

## 2.6. Vektoren

- Invitrogen: pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO, pCR<sup>®</sup>II-TOPO, pUC18-Kontroll-Vektor, pZErO<sup>™</sup>-2
- GibcoBRL: pSPORT1

## 2.7. Primer und Bedingungen für die Polymerasekettenreaktion

Sämtliche Primer wurden von MWG-Biotech in Ebersberg hergestellt.

### 2.7.1. Oligonukleotide für die Polymorphismus-Analyse

Gen	Primer-Name	Oligo-Sequenz	Temp.: °C	DMSO
hs6M1-1	OR1-4for OR1-615rev	TGTA AACGACGGCCAGTATAAACAAACATTGATTGCT CAGGAAACAGCTATGACCCATGACAACCTTGAGAAGTGC	50	+2%
hs6M1-1	OR1-477for OR1-1064rev	TGTA AACGACGGCCAGTAATTATTGGTTCTGCCTAAG CAGGAAACAGCTATGACCTGAGTTCAAAGGTCATTACC	57	+2%
hs6M1-2P	OR2-77F OR2-764R	TGTA AACGACGGCCAGTTTCTGACCCAGGTTACTGC CAGGAAACAGCTATGACCGAACCCTTTTACCACAGGC	60	
hs6M1-2P	OR2-683F OR2-1231R	TGTA AACGACGGCCAGTACTGCCACATTACAATTGCC CAGGAAACAGCTATGACCTTGCAAGAACATGTAAAGCG	55	
hs6M1-3	OR3-27for OR3-711rev	TGTA AACGACGGCCAGTGTGTGCTGATATTTTTGGAT CAGGAAACAGCTATGACCAATATGGAGCTTGTGATCAT	54	
hs6M1-3	OR3-576for OR3-1127rev	TGTA AACGACGGCCAGTAACTCAGCACTTCATTCTC CAGGAAACAGCTATGACCGTGCTAACAGAGTGCGTGAA	64	
hs6M1-4P	OR4-446f OR4-1274r	TGTA AACGACGGCCAGT TACAGTTCAACTTTACTTTG CAGGAAACAGCTATGACCAGAAACAAATGGTACTAATC	56	
hs6M1-4P	OR4-48 OR4-653	TGTA AACGACGGCCAGTATTGGGATACTTTTTTCTCC CAGGAAACAGCTATGACCGGCGATGTCTACATAGGGGT	61	
hs6M1-5P	OR5-419f OR5-1231r	TGTA AACGACGGCCAGTGGTCAGTCTCTGGGGTGTGG CAGGAAACAGCTATGACCGTTACCAGGATCTCCACGAC	60	
hs6M1-6	OR6-47F OR6-699R	TGTA AACGACGGCCAGTAAAGTGAGCGGTTGACAATGC CAGGAAACAGCTATGACCGGTGAGCTCATTGCGATGGG	64	+2%
hs6M1-6	OR6-621F OR6-1112Rn	TGTA AACGACGGCCAGTTACCCCTTTGTGGACATCGC CAGGAAACAGCTATGACCGGAAACCACCTTTCAAGATGG	60	+2%
hs6M1-7P	OR7-85F OR7-726R	TGTA AACGACGGCCAGTTCATATACCACCCGCTTCC CAGGAAACAGCTATGACCGAGAGCTGAATCAGAGCTGG	60	+2%
hs6M1-7P	OR7-643F OR7-1280R	TGTA AACGACGGCCAGTCCCAGTCTCTGATCCAGTCC CAGGAAACAGCTATGACCTATGAAGAATTAAGGGCCC	67	
hs6M1-10	OL-AE 800 f OL-AE 1525 r	TGTA AACGACGGCCAGTTTTTTCACATTATTAATTGG CAGGAAACAGCTATGACCATGAAGAATAGTTCAGCCTC	52	
hs6M1-10	OL-AE 1446 f OL-AE 2164 r	TGTA AACGACGGCCAGTTGGTCACAAAGAAGTGGATC CAGGAAACAGCTATGACCTGATTTCTGGATCAGAAAGG	52	
hs6-M1-15	OR15-403f OR15-1029r	TGTA AACGACGGCCAGTTCTCCCTCCTCCTTCTCCTC CAGGAAACAGCTATGACCATCCAGAATGTTGTTCCAC	60	
hs6-M1-15	OR15-847f OR15-1708r	TGTA AACGACGGCCAGTCTCAGTTGAGTGCCTTCTCC CAGGAAACAGCTATGACCATTGTGTTTTATTCAAGC	60	
hs6M1-16	OR11-204f OR11-1091r	TGTA AACGACGGCCAGTGATCAGAAGGAACAGGGAAC CAGGAAACAGCTATGACCCCAAAGGCCTTTCTCCATG	58	
hs6M1-16	Fat11 1038 Fat11 B	TGTA AACGACGGCCAGTCACTCTAATTCGACTCTCC CAGGAAACAGCTATGACCGAAATCTATAGGAGTGATGACAG	52	
hs6M1-18	OR18-108-f OR18-756-r	TGTA AACGACGGCCAGTGTGAGGAAGGAATGACAAC CAGGAAACAGCTATGACCCATCTACCACAAATCCAGAG	60	
hs6M1-18	OR18-606f OR18-1368r	TGTA AACGACGGCCAGTGTCTTTATCTTCGGCTCTC CAGGAAACAGCTATGACCTTTCATTTTTAGTATAACTG	53	
hs6M1-24P	OR24-f713 OR24-r1663	TGTA AACGACGGCCAGTGTCAAATTCATGTGGGGC CAGGAAACAGCTATGACCACAGTGCTGGGATTACAGGC	60	

hs6M1-25P	OR25-f222 OR25-r866	TGTA AACACGACGGCCAGTGCCCCACCTGGAAAAGATCC CAGGAAACAGCTATGACCCACATGTCCCCAGGCCTTT	62	
hs6M1-26P	OR26-f53 OR26-r573	TGTA AACACGACGGCCAGTCCATCTGCAAACACTTGAGG CAGGAAACAGCTATGACCATACAAAAGACAAGAAGCC	60	

Tab. 2: Primer für die Polymorphismusanalyse. Für jedes Gen wurden zwei Primer Paare generiert. Sämtliche Oligonukleotide enthalten eine M13for bzw. -rev Sequenz (kursiv geschrieben). DNA: ~ 100 ng isolierte humane genomische DNA; Taq: AmpliTaq®DNA (Perkin Elmer); Reaktionsvolumen: 20 µl; Standardbedingungen: 94°C 5 min, 94°C 30 sec, Annealing Temperatur x°C 30 sec, 72°C 40 sec, 72°C 7 min; 30-35 Zyklen. Je nach Bedarf wurde 2% DMSO zugegeben, um die Spezifität der PCR zu erhöhen.

## 2.7.2. Oligonukleotide für RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

### 2.7.2.1. Äußere genspezifische Primer für die 5' RACE (Pool-PCR)

Gen	Primer-Name	Oligo-Sequenz
hs6M1-1	OR1-73r	TGATATTAACAGGACCACAAAAAGGGGCAT
hs6M1-3	OR3-111r	AACAGGTTTCCTATCAGTGTCAAGTAG
hs6M1-4P	OR4-116r	GGATGATGATGAACAGGTTTCCTATCAGTG
hs6M1-6	OR6-62r	CCACAAAGAGAACTACTTCCAGCTGAGGCC
hs6M1-10	OR10-61r	CATCACAAGGGTGAATCTCTAGCCATGG
hs6M1-12	OR12-58r	GACAACCACGAAGAGAGTCCCTTCCAGCCC
hs6M1-13P	OR13p-310r	ATCACCGTCAGGAGGATGCACTCAGTGGTC
hs6M1-14P	OR14p-309r	GGACGCATTCGGCGGAACCCAG
hs6M1-15	OR15-69r	ATGGCGACAACCTCTGACAGGATCATCTCC
hs6M1-16	C-Test-OR16-45r+Bio	CTTCCAGTGCTGGGTGTTC
hs6M1-17	OR17-65r	TGAGAAAGACAGAGAAGAGCAAGCCCTGGA
hs6M1-18	OR18-53r	AGAAATGCAGTTCAGGGATGTCATAGAAGC
hs6M1-19P	OR19-5'313r	ACAACATGGCCTCTGTGCTGCCAG
hs6M1-20	OR20-58r	GAAAACCACGAAGAGAAAAGGCTGCAGTTC
hs6M1-21	OR21-64r	GAAGATGGTGAATAGTAAAACTGCAATTC
hs6M1-27	OR27-5'316r	TGATAGCCAGTAAATGGCCTCTGTGCTTC
hs7M1-2	hs7-M1-2-60r	AGGACAAACAGGGAGACCCGAGTGTCCAG
hs17M1-20	hs17M1-20-62r	AGAGGATGGGCTGTAGAGCTGCAGTCTCTG
hs19M1-4	hs19M1-4-72r	GACAGAAACAGCCCAAAGAGGAAGGGCTGC

Tab. 3: Äußere genspezifische Primer für die 5' RACE. Als Gegenprimer wurde der folgende Adapterprimer verwendet: AP1: CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC (Clontech). DNA: 5 µl cDNA aus einer Hoden-, Nieren- oder Lungen-Bibliothek (Clontech), Taq: Ex-Taq™ (TaKaRa); Reaktionsvolumen: 50 µl; Standardbedingungen: 94°C 5 min, 94°C 30 sec, Annealing Temperatur 63°C 30 sec, 72°C 40 sec, 72°C 7 min; 30-35 Zyklen.

### 2.7.2.2. Innere genspezifische Primer für die 5' RACE (spezifische PCR)

Gen	Primer-Name	Oligo-Sequenz	Temp.: °C
hs6M1-1	OR1-40rn	TAGCCAAGCCCTATCTGAGAAGCCAAGTAG	66
hs6M1-3	OR3-73rn	GACAACCACAAAGATAACTACTTCCAGATG	64
hs6M1-4P	OR4-60rn	ACAAAGAGAACTACTTCCAGATGAGGCCAG	66
hs6M1-6	OR6-26rn	AAAATCCAAGTAGAATAAAGAAGTCTTCCG	61
hs6M1-10	OR10-22rn	GAAAACCTAACAGAATGAACTCCTGTGGGAC	64
hs6M1-12	OR12-19rn	AGAGAAGCCCAGAAGGAGGAAGCCCGGTGT	70

hs6M1-13P	OR13p-272m	CAGGAAGATGAAGAACTGGACAGAGCAGCC	65
hs6M1-14P	OR14p-276m	CGCACAGCTGGGCCGTGCAGTG	65
hs6M1-15	OR-15-28	GTTAGAGAAGCCAAGCAGAATAAAACCATG	64
hs6M1-16	C-Test-OR16-20r	CAGAAGGAGGAAGCCCATGG	61
hs6M1-17	OR17-30m	GCCAGGTGGGAGAAGCCGAGAAGAAGAAAC	70
hs6M1-18	OR18-17m	GGACAAATTCAGTAATAGTTTCGTTTCCTG	61
hs6M1-19P	OR19-5'279m	TGGAAGAAATGGAGTTGGCTTATGCATCCC	66
hs6M1-20	OR20-24m	ATGTCTGTCACTCCCAAGAGGAGAAATTCG	66
hs6M1-21	OR21-20m	ATCCCAAGATGATGAATTCAGTTATAGCTG	61
hs6M1-27	OR27-5'279m	GTGGAAGAAGTGTAGCTGGGTGATACAGCC	69
hs7M1-2	hs7-M1-2-18m	CCGAGGAGAATAAATTCCTCACCCAAGTC	66
hs17M1-20	hs17M1-20-25m	CAGCAGGACAAACTTGGTCACAACCTGAATC	66
hs19M1-4	hs19M1-4-23m	GTCCCAGAAGAACAAATCTGAAATCCCTG	64

Tab. 4: Innere genspezifische Primer für die 5' RACE. Als Gegenprimer wurde der folgende artifizielle Adapterprimer verwendet: AP2: ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC (Clontech). DNA: 0,5 µl cDNA-PCR-Produkt aus der „5' RACE Pool-PCR“ (s. Tab. 3); Taq: Ex-Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa); Reaktionsvolumen: 30 µl; Standardbedingungen: 94°C 5 min, 94°C 30 sec, Annealing Temperatur x°C 30 sec, 72°C 40 sec, 72°C 7 min; 30-35 Zyklen.

### 2.7.2.3. Äußere genspezifische Primer für die 3' RACE (Pool-PCR)

Gen	Primer-Name	Oligo-Sequenz
hs6M1-1	L-OR1-3'f	ATTCAATAAACAAACATTGATTGCTTTCT
hs6M1-3	T-OR3-3'f	CTGGCTTTTATTTTTATTTCATGTGTGCTG
hs6M1-6	T-OR6-3'f	CTTTTGTCTTCAATCTGTTTGCAAGTGAGC
hs6M1-12	T-OR12-3'f	TGACCTCACAAACACCCAGGCTGAGTTTTG
hs6M1-16	T-OR16-3'f	TGCTGTGACCTCACAAACACCCAGGCTGAG
hs6M1-18	T-OR18-3'f	ATAACGTTAGGCTTGGTATAGAAGATGCAG
hs6M1-20	OR20-59-3'fkor	AGGTTTGGGAAGAAGTACAACAGTACTCTCC
hs6M1-21	T-Or21-3'f	TGCAGCATATGATTTCATTTTTATAATCTGG
hs6M1-27	OR27-1-3'f	AGCAATGGAGAATGTCACTACAATGAATGA
hs7M1-2	T-hs7-3'f(ex2) K-hs7-3'f	AAAAAGGTCAAGGGCTACCTGAAAGACCGG GATCTAAAATACCTGCCTAGGGCTGGCTGG
hs17M1-20	T-hs17-3'f	TTGATGATTGTTATCAACACCTCACCTCTGC

Tab. 5: Äußere genspezifische Primer für die 3' RACE. Als Gegenprimer wurden die folgenden artifiziellen Adapterprimer verwendet: AP1: CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC (Clontech) oder SMART-TAG1: GAAGCAGTGGTAACAACGCAGA (Clontech, modifizierte SMART-Methode) DNA: 5 µl cDNA aus einer Hoden-, Nieren- oder Lungen-Bibliothek (Clontech) oder selbst hergestellte cDNA aus Hoden-Gesamt-RNA (Clontech oder von Prostata-OP); Taq: Ex-Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa); Reaktionsvolumen: 50 µl; Standardbedingungen: 94°C 5 min, 94°C 30 sec, Annealing Temperatur 58°C 30 sec, 72°C 1-10 min, 72°C 7 min; 30-35 Zyklen. Gegebenenfalls wurden zwei Primer für ein Gen generiert, da die Lage der Exons in unterschiedlichen Geweben z.T. verschieden war (T: Testis, K: Niere, L: Lunge).

### 2.7.2.4. Innere genspezifische Primer für die 3' RACE (spezifische PCR)

Gen	Primer-Name	Oligo-Sequenz	Temp.: °C
hs6M1-1	L-OR1-3'n	ACATTTTTTTAGGAGTGCGAAATAAGTGAG	61
hs6M1-3	T-OR3-3'n	TTTTTGGATCATTTGTTTACTCGTTTTTTG	58
hs6M1-6	T-OR6-3'n	GCATGGACAGACTTTGAGTTTATGTGGTTC	65
hs6M1-12	T-OR12-3'n	TGAATCACACTGGGGTGACAGCCTCATCCC	70
hs6M1-16	T-OR16-3'n	GACAGGTTGAATCACACTGGGGTGACAGCC	58,5

hs6M1-18	T-OR18-3'n	ACATGCTAAAATTTCTCCCCAATTATTGC	58,5
hs6M1-20	OR20-45-3'fkor:	AAATTCTGAGCCGGAAGGATTCTGATTGCG	65
hs6M1-21	T-Or21-3'n	TTTGCCCAATTCTGAAAGGAAACCAGGCG	65
hs6M1-27	OR27-3'-fn	ATGGAGAATGTCACTACAATGAATGAGTTT	60
hs7M1-2	T-hs7-3'n(ex2)	CCTCAAAGCATCCAAACCATCCCTATACTC	65
	K-hs7-3'n	GCTTCTGTTTTTTTCTGACTCCCTTCACAG	65
hs17M1-20	T-hs17-3'n	CCACCACCGGCCCATCTAACACTGCTCAG	70

Tab. 6: Innere genspezifische Primer für die 3' RACE. Als Gegenprimer wurde der folgende artifizielle Adapterprimer verwendet: AP2-polyT: TTCTAGAATTCAGCGGCCGCTTTTTTTTTT oder SMART\_TAG\_2: GTGGTAACAACGCAGAGTACTTT. DNA: 0,5 µl cDNA-PCR-Produkt aus der „3' RACE Pool-PCR“ (s. Tab. 5); Taq: Ex-Taq™ (TaKaRa); Reaktionsvolumen: 30 µl; Standardbedingungen: 94°C 5 min, 94°C 30 sec, Annealing Temperatur x°C 30 sec, 72°C 10 min, 72°C 7 min; 30-35 Zyklen. Gegebenenfalls wurden zwei Primer für ein Gen generiert, da die Lage der Exons in unterschiedlichen Geweben z.T. verschieden war (T: Testis, K: Niere, L: Lunge).

### 2.7.2.5. Genspezifische Primer in den letzten beiden Domänen der kodierenden Region von OR Genen (3' UTR Suche)

Gen	Primer-Name	Oligo-Sequenz	Temp.: °C
hs6M1-16 1.PCR	OR16f-cod-874	AACAAGGAGATAAAGCGAGC	56
hs6M1-16 2.PCR	OR16f-cod-888	GCGAGCACTCAGGAGGTTAC	56
hs6M1-21 1.PCR	OR21f-cod-834	CAGTGTGTTACCCCATGC	59
hs6M1-21 2.PCR	OR21f-cod-841	GTTACCCCATGCTAAACCC	58,5
hs6M1-18 1.PCR	OR18-codf-797	TCCATTCCCAGCTCCTCTCC	55
hs6M1-18 2.PCR	OR18-codf-846	CACCCCTCTTCAATCCTG	55
hs6M1-27 1.PCR	OR27-codf-794	CCTCCATGATTCAGGACCGG	55
hs6M1-27 2.PCR	OR27-codf-824	TCATGTATAGCGCCGTCACC	55

Tab. 7: Genspezifische Primer im letzten Drittel der kodierenden Region. Als Gegenprimer wurden die folgenden Primer verwendet: SMART-TAG1: GAAGCAGTGGTAACAACGCAGA für die 1. äußere PCR; SMART\_TAG\_2: GTGGTAACAACGCAGAGTACTTT für die 2. innere PCR. DNA für 1. äußere PCR: 3 µl cDNA (hergestellt aus Hoden-mRNA von Clontech); DNA für 2. innere PCR: 0,5 µl PCR-Produkt aus 1. PCR; Taq: Ex-Taq™ (TaKaRa); Reaktionsvolumen: 30 µl; Standardbedingungen: 94°C 5 min, 94°C 30 sec, Annealing Temperatur x°C 30 sec, 72°C 1-10 min, 72°C 7 min; 30-35 Zyklen.

### 2.7.2.6. Primer für die spezifische PCR (spezifische Primer sind in der 5' und 3' UTR lokalisiert)

Gen	Primer-Name	Oligo-Sequenz	Temp.: °C
hs6M1-16	OR16-3&#8216-ex-r	AGTTCCTCCTTTCTCTGGC	59
	T-OR16-3'f	TGCTGTGACCTCACAAACACCCAGGCTGAG	
hs6M1-27 Äußere PCR	27-3'exk-982r OR27-1-3'f	TTTTTTTTTTTTTTTGGATGGAAATCAGTC AGCAATGGAGAATGTCACTACAATGAATGA	55,5

hs6M1-27 Innere PCR	27-3'exk-959rn OR27-3'-fn	ATCAGTCTTAATAGAAATCAGATATCCCTC ATGGAGAATGTCACACTACAATGAATGAGTTT	60
hs6M1-27 Äußere PCR	27-3'exl-1733r OR27-1-3'f	CAACTGAAACAAAGAGTTTGTACATTGGC AGCAATGGAGAATGTCACACTACAATGAATGA	62,5
hs6M1-27 innere PCR	27-3'exl-1706rn OR27-3'-fn	GGCTTAATGGGTATGAAAATGCAGTTAGAT ATGGAGAATGTCACACTACAATGAATGAGTTT	60
hs6M1-18 Äußere PCR	OR18-3'ex-rne T-OR18-3'f	GGTGCCGAAGTCCAAAATAACATC ATAACGTTAGGCTTGGTATAGAAGATGCAG	62,5
hs6M1-18 innere PCR	OR18-3'ex-r T-OR18-3'n	GAAGAGTCCCCAATGGAGGTGTCCG ACATGCTAAAATTTCTCCCCAATTATTGC	60

Tab. 8: Diese spezifischen Primer sind in der 5' und 3' UTR lokalisiert. DNA-Quelle 1. äußere PCR: 3 µl cDNA (hergestellt aus Hoden-mRNA von Clontech); DNA-Quelle 2. innere PCR: 0,5 µl PCR-Produkt aus 1. äußerer PCR; Taq: Ex-Taq™ (TaKaRa); Reaktionsvolumen: 30 µl; Standardbedingungen: 94°C 5 min, 94°C 30 sec, Annealing Temperatur x°C 30 sec, 72°C 10 min, 72°C 7 min; 30-35 Zyklen.

### 2.7.3. Plasmidspezifische Oligonukleotide (zur Amplifizierung von klonierten Fragmenten)

Vektor	Primer-Name	Oligo-Sequenz	Temp.: °C	DMSO
pCR®2.1-TOPO; pCR®II-TOPO (Invitrogen)	M13AP-for M13AP-rev	GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTG CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCG	60	2%

Tab. 9: Plasmidspezifische Oligonukleotide. DNA: gepickter Klon oder 1 µl Bakterienlysat aus einer 200 µl ÜN-Kultur oder (Mini-)Plasmid-Präparation; Taq: AmpliTaq®DNA (Perkin Elmer); Reaktionsvolumen: 30 µl; Standardbedingungen: 94°C 15 min, 95°C 20 sec, Annealing Temperatur x°C 30 sec, 72°C 1 min, 72°C 7 min; 25 Zyklen.

### 2.7.4. OR-cDNA spezifische Primer (cDNA-Klon vom RZPD)

Primer-Name	Oligo-Sequenz (in <i>Italic</i> die Poly-T-Tag bzw. VecPrim Sequenzen)	Temp.: °C
RZ-cDNATest-T7f RZ-cDNA-pPolyAr	<i>CTGCAGGATATCTGGATCCACCCCTGCCATTTTATACTGAG</i> <i>GTAACCGTTTCGTACGAGAATGCATATTTCTTATTTCTTGA</i>	60
01RZ-800-T-521f 01RZ-700-V-1025r	<i>CTGCAGGATATCTGGATCCACGTAACAGCTTTTAACACTTC</i> <i>GTAACCGTTTCGTACGAGAATACATTGTTCTCTACAGTAAC</i>	60
cDNA-T7-02-T-TAG cDNA-SP6-02-VecPrim	<i>CTGCAGGATATCTGGATCCACAGCCTATATGCATAGTTTTT</i> <i>GTAACCGTTTCGTACGAGAATGGAGTGATAGATTGGTAAGA</i>	58

Tab. 10: OR-cDNA-spezifische Primer. DNA: ~100 ng DNA aus einer (Mini-) Plasmid-Präparation von einem OR-cDNA-Klon aus Hodengewebe (kloniert in pSPORT1; ~3 kb groß; RZPD). Diese Primer waren spezifisch zu unterschiedlichen Sequenzabschnitten der cDNA und besaßen einen T-Tag- bzw. VecPrim-Anhang (in *Italic*), der für das spätere Sequenzieren (s. Tab. 11) benötigt wurde. Taq: AmpliTaq®DNA (Perkin Elmer); Reaktionsvolumen: 20 µl; Standardbedingungen: 94°C 5 min, 94°C 30 sec, Annealing Temperatur x°C 30 sec, 72°C 40 sec, 72°C 7 min; 30-35 Zyklen.

### 2.7.5. Oligonukleotide für die Sequenzreaktion

Primer-Name	Oligo-Sequenz	IRD (nm)	Temp.: °C	DMSO
M13for M13rev	TGTAACCGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGACC	700/800 700/800	56	5%

DNA: PCR-Produkte mit M13-Anhang (s. Tab. 2), PCR-Produkt aus der „M13AP“-PCR (s. Tab. 9), (Mini-) Plasmid-Präparation von TOPO-Klonen

SP6	CGATTTAGGTGACACTATAG	800	56	5%
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	700		
DNA: (Mini-) Plasmid-Präparation von pSPORT1-Klonen (RZPD)				
Poly-T-Tag-800	CTGCAGGATATCTGGATCCAC	800	56	5%
VecPrim-IRD-700	GTAACCGTTCGTACGAGAAT	700		
DNA: PCR-Produkte aus der PCR mit Primern, die einen T-Tag- bzw. VecPrim-Anhang (s. Tab. 10)				

Tab. 11: Sequenzieroligonukleotide. DNA-Menge: ~150 ng DNA pro kb zu sequenzierendes DNA-Material. Standardbedingungen: 95°C 4 min, 95°C 15 sec, x°C 15 sec, 70°C 15 sec, 27 Zyklen).

### 2.7.6. Primer für konstitutiv exprimierte Haushaltsgene (modifiziert nach (Dixon et al., 1998))

Primer-Name	Oligo-Sequenz
Beta-Aktin FW	CGTGGACATCCGTAAAGACC
Beta-Aktin RV	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC
G-3-PDH-FW	CGACCACTTTGTCAAGCTCA
G-3-PDH-RV	AGGGGTCTACATGGCAACTG
RPL5 FW	GAACAGCGTAACTCCAGACATG
RPL5 RV	CCGCTCCTGAGCTCTGAG
EF1 FW	CCAAGAAAGCAACTTGAGCC
EF1 RV	TGCAGAAGACATTTTTTTCTTG

Tab. 12: Primer für konstitutiv exprimierte Haushaltsgene. DNA: 3 µl cDNA (~100-300 ng); Taq: AmpliTaq®DNA (Perkin Elmer); Reaktionsvolumen: 20 µl; Standardbedingungen: 94°C 15 min, 95°C 20 sec, Annealing Temperatur 59°C 30 sec, 72°C 30 sec, 72°C 7 min; 25 Zyklen.

### 2.7.7. Sonstige Primer

Oligo-dT-SMART für cDNA-Synthese (Clontech, modifiziert)	GAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN
OR20-569r für 3' Sonden	CTGAGTAGCCACTGATTAAGCTCAG
OR21-563r für 3' Sonden	CCAACTCATTGACAGAAGTGTTCACAAG
OR13-42-3'f für 3' Sonden	GGGGTGACAGCCTCATCCTTCCAGATACAG
OR19-81-3'f für 3' Sonden	GGCTTGGTAAGAAAATTCTGAGCTGGAAGG
OR14-34-3'f für 3' Sonden	ACCTTCCAAACATTCTGGGAGTTTTCTCC
18-21-27-5' exon im 1. Exon von <i>hs6M1-18</i> ; -21 und -27 lokalisiert	GTGCAAGATGTGACTGGGAC
Fat11A mit M13 Schwanz ( <i>Italic</i> ), liegt in der kodierenden Region von <i>hs6M1-16</i>	TGTA AACGACGGCCAGTCAAGTCTTTGGTCTCTTCTATGC

Tab. 13: Sonstige Primer