

**Physikalische Kartierung der RT1-C/M-Region des
Haupthistokompatibilitätskomplexes der Ratte**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Sofia Ioannidu
aus Vergina/Griechenland

Göttingen 2000

D7

Referent: Prof. Dr. H.-J. Fritz

Korreferent: Prof. Dr. W. Engel

Tag der mündlichen Prüfung:

I.	Inhaltsverzeichnis	I
II.	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Der Haupthistokompatibilitätskomplex des Menschen (HLA-Komplex)	1
1.2	Der Haupthistokompatibilitätskomplex der Maus (H2-Komplex)	4
1.3	Vergleich des Haupthistokompatibilitätskomplexes zwischen Mensch und Maus; Vorstellung der <i>framework</i> Hypothese	5
1.4	Der Haupthistokompatibilitätskomplex der Ratte (RT1-Komplex)	6
1.5	Struktur und Funktion von MHC-Klasse-I Molekülen	7
1.6	Ziel dieser Arbeit	9
2	Verwendete Materialien	10
2.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	10
2.2	Verwendete Vektoren	10
2.3	Oligonukleotide	13
2.3.1	Oligonukleotide zur Generierung von Hybridisierungsproben	13
2.3.2	Oligonukleotide für PAC-Endsequenzierung	16
2.3.3	Sonstige Primer	16
2.4	Chemikalien	16
2.5	Radiochemikalien	18
2.6	Enzyme	18
2.7	Versuchstiere	19
2.8	Lösungen und Puffer	19
2.9	Zusammensetzung von Nährmedien	22
2.9.1	Nährmedien	22
2.9.2	Zusätze für prokaryotische Nährmedien	22
2.10	Einwegartikel	23
2.11	Verwendete Kits	23
2.12	Geräte	24
2.13	Herstelleradressen	26
2.14	Verwendete Hybridisierungsproben	27
2.15	Verwendete Ressourcen	30
2.16	Verwendete Computerprogramme	31
3	Methoden	32
3.1	Allgemeine Richtlinien zur Arbeit mit DNA	
3.2	Isolierung von DNA	32
3.2.1	Präparation von genomischer DNA aus kleiner Menge Lebergewebe	32
3.2.2	Isolierung und Verarbeitung von Lymphozyten-DNA	32
3.2.3	Gewinnung von Plasmid-DNA mittels Säulenelution	33
3.2.4	Präparation von <i>low-copy</i> Plasmid-DNA (PAC) im größeren Maßstab mittels Nucleobond® AX-Säulen	34

3.2.5	Kleinansatz zur Präparation von PAC-DNA	34
3.2.6	Kleinansatz zur Plasmidisolierung (lange Methode)	35
3.2.7	Minipräparation von Plasmid-DNA	35
3.3	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA	36
3.4	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	36
3.4.1	Partieller Verdau genomischer DNA für Bank-Konstruktion	36
3.5	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	37
3.6	Transfer von DNA aus Agarosegelen (Southernblot)	38
3.7	Radioaktive DNA-Markierung mittels <i>random-priming</i> Reaktion	39
3.8	Radioaktive Endmarkierung synthetischer Oligonukleotide durch γ -[³² P]-dATP	39
3.9	Hybridisierung der Southernblots	40
3.10	Autoradiographie	40
3.11	Bakterien-Kolonie- <i>Screening</i> erstellter Subbanken	41
3.12	Erstellung von DNA <i>dot blots</i>	42
3.13	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen	42
3.13.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels JETQUICK <i>spin columns</i>	42
3.13.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen durch Elektroelution	43
3.14	Dephosphorylierung freier 5'-Enden	43
3.15	Ligation von DNA-Enden	43
3.16	Nukleotidsequenzanalyse doppelsträngiger DNA	44
3.17	Endsequenzierung der PAC-Klone durch inverse PCR	45
3.18	Reverse Transkription	47
3.19	Polymerasekettenreaktion (PCR)	47
3.20	3'RACE (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>)	48
3.21	<i>Long range</i> PCR	49
3.22	Klonierung von PCR-Produkten	49
3.23	<i>Screening</i> einer PAC-Bank	50
3.24	Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen	51
3.25	Elektroporation	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Konstruktion einer genomischen Bank aus der LEW.1W-Ratte (RT1 ^u -Haplotyp)	54
4.2	Etablierung von Hybridisierungsproben	59
4.2.1	Sonden aus klassischen MHC-Klasse-I-Genen	59
4.2.2	Herstellung von Hybridisierungsproben aus MHC-Klasse-Ib-Genen	60
4.2.3	Herstellung von Hybridisierungssonden aus verschiedenen „Anker genen“	61
4.2.4	Herstellung von STS-Markern bei der Ratte und Maus	65
4.3	Klonierung und physikalische Kartierung der <i>RTI-C/M</i> Region anhand einer genomischen Bank aus der BN Ratte (RT1 ⁿ -Haplotyp)	66
4.3.1	Contig 1	68
4.3.1.1	Sequenzierung der Enden einiger PAC-Klone aus dem Contig 1	77
4.3.1.2	11/3R-homologe Gene im Contig 1	78

4.3.1.3 Subklonierung und Teil-Sequenzierung einiger Klasse-I-Gene aus dem Contig 1	78
4.3.2 Beschreibung von Contig 2	82
4.3.2.1 Contig 2, erster Abschnitt	82
4.3.2.1.1 Die <i>grc</i> -Region	88
4.3.2.1.2 <i>RT.BMI</i> -Gene	89
4.3.2.1.3 „Ankerogene“ des Contig 2 im ersten Abschnitt	90
4.3.2.2 Contig 2, zweiter Abschnitt	91
4.3.2.3 Contig 2, dritter Abschnitt	102
4.3.2.4 Endsequenzierung einiger Klone aus dem Contig 2	107
4.3.3 Contig 3 und Contig 4 (<i>RT1-M3</i> -, <i>RT1-M2</i> -positive Klone)	108
5 Diskussion	115
5.1 Contig 1	116
5.2 Contig 2	119
5.3 Contig 3 und 4	122
5.4 Vergleich zwischen der Klasse-I- Regionen des RT1-, H2- und HLA-Komplex	125
5.5 Ausblick	127
6 Zusammenfassung	128
7 Literaturverzeichnis	130
8 Anhang I	145
8.1 Zusammenstellung der insgesamt erhaltenen PAC-Klone aus mehreren Screeningansätzen der Ratten-Bank	145
8.2 Sequenzierungsdaten aus PAC-Endsequenzierung	156
9 Anhang II (Physikalische Karte der RT1-C/M-Region des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Ratte)	

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AC	<i>Accession Number</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
ddNTP	Didesoxynukleotid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	EDTA-Sarcosyl-Puffer
Etbr	Ethidiumbromid
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
grc	<i>growth and reproduction complex</i>
h	Stunde
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
IDDM	<i>Insulin dependent diabetes mellitus</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
LB	Luria-Bertani
M	Molarität
μCi	Mikrocurie
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MMLV reverse Transkriptase	Moloney Mouse Leukemia Virus reverse Transkriptase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NC	<i>non-coding</i>

OD	optische Dichte
PAC	<i>P1 artificial chromosome</i>
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHR	<i>spontaneously hypertensive rat</i>
SOB	Hefe-Peptide-Salz-Medium
SOC	glukosehaltiges SOB-Medium
ssDNA	einzelsträngige DNA
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
STS	<i>sequence-tagged sites</i>
Tab	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit
utr	untranslatierter Bereich
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galactosid
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i>

1 Einleitung

1.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex des Menschen (HLA, *human leukocyte antigen*)

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) ist eine besonders gut untersuchte Region des menschlichen Genoms. Die in dieser Region kodierten Klasse-I- und Klasse-II-Proteine kontrollieren die Immunreaktionen des Organismus. Die Klasse-I- und Klasse-II-Gene sind die polymorphsten humanen Gene; einige sind mit über 250 Allelen repräsentiert. Die Bezeichnung Haupthistokompatibilitätskomplex beruht auf der Erkennung polymorpher Klasse-I- bzw. Klasse-II-Moleküle bei der Transplantat-Abstoßung. Die meisten autoimmunen Krankheiten, wie z.B. Rheumatoide Arthritis, Insulin-abhängiger Diabetes Mellitus und Multiple Sklerose (Thomson, 1995), aber auch andere Erkrankungen wie Narkolepsie (Gruen *et al.*, 1997) und Dyslexie (Fisher *et al.*, 1998) sind MHC-assoziiert.

Aus diesen Gründen ist der MHC eine der am intensivsten untersuchten Regionen des menschlichen Genoms. Der MHC wurde vor über 60 Jahren entdeckt als eine einer Gruppe von Histokompatibilitätsgenen. Die physiologische Funktion und Natur der Genprodukte des MHC wurde jedoch erst in den letzten zwei Dekaden bekannt. Der HLA ist auf dem Chromosom 6p21.31 lokalisiert, umfaßt 3,6 Mb und ist inzwischen komplett sequenziert (*The MHC sequencing consortium*, 1999). Die MHC-Region hat, unter den bis jetzt sequenzierten Regionen des humanen Genoms die größte Dichte an Genen. Von den 224 identifizierten Genen könnten 128 exprimierbar sein. Es wurde geschätzt, daß 40% der exprimierten Gene eine Funktion im Immunsystem haben. Mehrere Gene, u.a. aus der Klasse-II- und Klasse-III-Region (Abbildung 1), können aufgrund der Sequenzähnlichkeit und Syntenie bis zu 700 Millionen Jahre zurückverfolgt werden.

Der Haupthistokompatibilitätskomplex des Menschen wird HLA (*human leukocyte antigen*) genannt. Ein Schema der genomischen Organisation ist der Abbildung 1 zu entnehmen. Die unterhalb der Linie grau gezeichneten Gene sind in der Immunantwort involviert, oberhalb der Linie sind schwarz Gene gezeichnet, die keine Funktion im Immunsystem haben (Forbes und Trowsdale, 1999). Der HLA-Komplex ist in drei Regionen unterteilt, Klasse-I-, Klasse-II-

und Klasse-III-Region. Die Klasse-II-Region hat eine Länge von ca. 800 kb und kodiert für Gene, die für die Antigen-Prozessierung (LMP2, LMP7, TAP1, TAP und TAPBP) und -Präsentation (DP, DQ, DR, DM, DO) fungieren. Die auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen Klasse-II-Moleküle präsentieren aus exogen aufgenommenen Proteine gewonnene Peptide den T-Helferzellen. Es werden aber auch Peptide aus intrazellulären Krankheitserregern wie Leishmanien und Mykobakterien, welche Lepra und Tuberkulose verursachen und sich in intrazellulären Vesikeln von Makrophagen vermehren, den T-Helferzellen präsentiert.

In der Klasse-III-Region, deren Länge ca. 800 kb beträgt, sind u.a. Gene lokalisiert, die für Komplement-Faktoren (C2, C4, Bf), Hitzeschockproteine (HSP70-Familie) sowie Zytokine (TNF α) kodieren.

Die Klasse-I-Region erstreckt sich über eine Länge von 1800 kb. Die Gene HLA-A, HLA-B und HLA-C kodieren für klassische Klasse-I-Moleküle, während es sich bei HLA-E, HLA-F und HLA-G um nicht-klassische Klasse-I-Gene handelt. Es finden sich in dieser Region ferner zwei Klasse-I-verwandte Gene, MICA und MICB. Weiterhin enthält die Klasse-I-Region auch eine Reihe von Klasse-I-Pseudogenen und Genfragmenten (HLA-17, -X, -30, -L/92, -80, -21, -K/70, -16, -H/54, -90 und -75), sowie vier MIC-Pseudogene (MICC, MICD, MICE, MICE) (Shiina *et al.*, 1999). Die Funktion der Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche besteht darin, Peptide den zytotoxischen T-Lymphozyten zu präsentieren. Dazu werden zytoplasmatische Proteine im Proteasom unter Beteiligung der MHC-kodierten Proteasomuntereinheiten LMP2 und LMP7 zu Peptiden abgebaut, die über den MHC-kodierten Transporter (TAP1 und TAP2) in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert werden. Im ER erfolgt mit Hilfe des ebenfalls im MHC kodierten Moleküls Tapasin (TAPBP) eine Beladung des MHC-Klasse-I-Moleküls mit 8-10 Aminosäuren langen Peptiden. Unter einer Infektion mit Viren oder interzellulären Bakterien werden dann auch Peptide dieser Infektionserregern prozessiert und den zytotoxischen T-Zellen präsentiert.

Von medizinischer Bedeutung ist, daß einige Krankheiten, z. B. Morbus Behçet, ankylosierende Spondylitis, Psoriasis vulgaris sowie einige infektiöse Krankheiten jeweils mit bestimmten Klasse-I-Allelen assoziiert sind. Aus diesem Grund ist die Suche nach polymorphen Markern wie z.B. Mikrosatelliten von großer Wichtigkeit für die Kartierung von Regionen, die für die Suszeptibilität gegenüber bestimmten Krankheiten verantwortlich sind und zur Identifizierung von entsprechenden Kandidaten-Genen führen können.

1.2 MHC der Maus (H2-Komplex)

Schon die ersten Versuche zur Gewebsunverträglichkeit (Jensen, 1903) wurden an Mäusen durchgeführt. Sie bieten ein optimales experimentelles Tiermodell für Transplantationsversuche sowie für MHC-assoziierte Krankheiten. Es ist in relativ kurzer Zeit möglich, Inzuchtsstämme zu züchten und so genetisch identische Individuen zu erzeugen, eine für Transplantations-Versuche wichtige Voraussetzung. Durch Anwendung congener Stämme (es handelt sich um Tiere, die im genetischen Hintergrund identisch sind und sich nur in einer bestimmten Region unterscheiden, hier den MHC) konnte Snell (1948) für die Transplantatabstossung verantwortliche Gene identifizieren. Durch die weitere Analyse solcher MHC-congener Stämme konnte ermittelt werden, daß ein Komplex enggekoppelter Gene in besonderem Maße für die Gewebsunverträglichkeit verantwortlich ist, welcher dann als „*major histocompatibility complex*“ bezeichnet wurde.

Aufgrund der von Gorer bereits 1936 beschriebenen Antigene, die mit der Transplantatabstoßung und Tumorsuszeptibilität korreliert sind, und Antigen II hiessen, erhielt der MHC der Maus die Bezeichnung H2-Komplex (Snell, 1948).

Aufgrund der Anwendbarkeit der Maus als experimentelles Tiermodell ist der H2-Komplex neben dem HLA-System sehr gut untersucht. Der H2-Komplex ist auf dem Chromosom 17 lokalisiert und umfasst ebenfalls ca. 4 Mb (Klein, 1986).

Die genomische Organisation des H2-Komplexes ist in der Abbildung 1 dargestellt. Gegenüber der genomischen Organisation des HLA-Komplexes besteht die Besonderheit, daß centromerwärts der Klasse-II-Region eine weitere Klasse-I-Region zu finden ist. In dieser Klasse-I-Region werden zwei Klasse-I-Gene codiert (Steinmetz *et al.*, 1982a; Weiss *et al.*, 1984). Es handelt sich um das klassische Klasse-I-Gen H2-K und das Pseudogen H2-K2. Die strukturelle Organisation des H2-Komplexes, speziell in den telomeren Klasse-I-Regionen D, Q, T und M, kann von Haplotyp zu Haplotyp variieren. In den H2^b- und H2^k-Haplotypen und vermutlich auch bei anderen beinhaltet die D-Region nur ein Klasse-I-Gen, nämlich H2-D (Weiss *et al.*, 1984; Stephan *et al.*, 1986). Im Gegensatz dazu enthalten die Haplotypen H2^d, H2^q und vermutlich H2^v in der D-Region fünf Klasse-I-Gene, die als H2-D, -D2, -D3, -D4 und H2-L bezeichnet werden (Stephan *et al.*, 1986; Duran *et al.*, 1987; Rubocki *et al.*, 1990).

Das am Ende der Klasse-III-Region lokalisierte *Tnf*-Gen und das *Bat1*-Gen (Wroblewski *et al.*, 1990) werden durch ein Intervall von 40 kb getrennt. Eine ähnliche Distanz findet man auch beim Menschen. Im Gegensatz dazu ist der Abstand zwischen dem *Bat1*-Gen und dem nächsten Klasse-I-Gen im H2^b-Haplotyp 10 kb, während beim Menschen dieses Intervall 170 kb beträgt. Bei den Haplotypen H2^d (Müller *et al.*, 1987) und H2^b (Wroblewski *et al.*, 1990)

der Maus sind Längen-Unterschiede im Interval zwischen *Bat1* und dem nächsten Klasse-I-Gen zu beobachten. Es zeigt sich also eine gewisse Variabilität. Im H2^d-Haplotyp wurde gezeigt, daß eine weitere Kopie des *Bat1*-Gens zwischen dem D4^d-Gen und dem L^d-Gen (Wroblewski *et al.*, 1994) existiert. So könnten die fünf H2-D-Gene in der H2-D^d-Region durch ein ungleiches *crossing over*-Ereignis (Stephan *et al.*, 1986; Rubocki *et al.*, 1990) und die H2-D- und H2-L-Gene durch Duplikation entstanden sein (Wroblewski *et al.*, 1994).

Die H2-Q-Gene und die H2-T-Gene (Abbildung 1) sind durch Sequenzvergleiche in Familien gruppiert worden. Die Expansion von Klasse-I-Genen in dieser Region ist wahrscheinlich durch Tandem-Duplikation und ungleiches *crossing over* entstanden. Differenzen in der Zahl enggekoppelter homologer Gene zwischen unterschiedlichen Stämmen führen die Rekombinationsereignissen zu Duplikationen, Deletionen oder Genfusionen, wie die Q8/Q9-Fusion in der BALB/c Maus zeigt (Fischer Lindahl *et al.*, 1997). Auf ähnliche Weise sind wahrscheinlich die H2-M1- und H2-M10-Familien entstanden, welche im proximalen Teil der H2-M-Region lokalisiert sind. Bis heute sind keine anderen Gene als Klasse-I-Gene innerhalb der H2-Q- und H2-T-Region identifiziert worden. Durch Arbeiten mit bestimmten Stämmen, die teilweise eine Deletion dieser Klasse-I-Gene aufweisen, konnte gezeigt werden, daß diese Gene, auch wenn sie exprimierbar sind, nicht essentiell für das Überleben des Organismus sind (Klein und Figueroa, 1986). Am telomeren Ende des H2-Komplexes befinden sich die H2-M2, -M3, -M4, -M5 und -M6 Klasse-I-Gene (Amadou *et al.*, 1999; Brorson *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1998)

1.3 Vergleich des Haupthistokompatibilitätskomplexes zwischen Mensch und Maus; Vorstellung der *framework* Hypothese (Amadou 1999)

Beim Vergleich des HLA- und des H2-Komplexes sind sowohl Konserviertheit als auch Variabilität zu beobachten. Die Klasse-II- und Klasse-III-Regionen tragen in beiden Spezies die gleichen Gene in der selben Anordnung, die Gene sind ortholog (Beck *et al.*, 1996; Trowsdale, 1995). Wahrscheinlich existierten die Bereiche in ähnlicher Organisation in einem gemeinsamen Vorfahren von Mensch und Maus. Orthologe Gene sind per Definition der *Comparative Genome Organisation* 1996, homologe Gene in unterschiedlichen Spezies, welche aus demselben Gen des nächsten Vorfahren abstammen.

Im Gegensatz zu den Klasse-II- und Klasse-III-Genen sind die Klasse-I-Gene von Mensch und Maus paralog und waren mehrfachen Reorganisationen unterworfen. Paraloge Gene sind

Gene innerhalb derselben Spezies, welche aus einem Vorläufer-Gen durch Duplikation und weitere Entwicklung im Laufe der Evolution entstanden sind.

Wenn in den Klasse-I-Regionen zwischen Mensch und Maus nur die Klasse-I-Gene betrachtet werden, ist es schwierig, einen direkten Vergleich durchzuführen. Werden jedoch die Nicht-Klasse-I-Gene (Ankerogene) in einer komparativen Karte betrachtet, ist ersichtlich, daß nicht nur die Ankerogene zwischen Mensch und Maus ortholog sind, sondern daß sich auch die verschiedenen Klasse-I-Subregionen an orthologer Position befinden

Die im Laufe der Evolution konservierten Ankerogene des MHC bilden einen Rahmen (*framework*). Zwischen Ankerogenen Bereiche der Klasse-I-Region kam es an bestimmten Positionen zu Expansion oder Deletion von Klasse-I-Genen. Dieses Konzept wird auch als *framework Hypothese* bezeichnet (Amadou 1999; Amadou *et al.*, 1999).

1.4 Der MHC der Ratte (RT1-Komplex)

Der Haupthistokompatibilitätskomplex der Ratte ist auf dem Chromosom 20p12 lokalisiert (Helou *et al.*, 1996) und wird als RT1-System bezeichnet. Die Ratte wird, wie die Maus, als Versuchstier eingesetzt. Eine Reihe MHC-assoziiierter-Krankheiten sind in der Ratte untersucht, wie der im BB-Rattenstamm spontan auftretende Insulinabhängige Diabetes mellitus (IDDM) (Cole *et al.*, 1986; Günther *et al.*, 1991), sowie verschiedene experimentell induzierbare Autoimmunkrankheiten, wie experimentelle Encephalomyelitis, experimentelle Arthritis und experimentelle Nephritis (Günther, 1990). Auch für Organtransplantation (Günther, 1985) findet die Ratte als experimentelles Tiermodell breite Anwendung.

Die allgemeine Organisation des RT1-Komplexes ist der des MHC der Maus ähnlich (Günther, 1996; Gill *et al.*, 1997). Sowohl in der Maus als auch in der Ratte existiert eine Klasse-I-Region centromerwärts der Klasse-II-Region. Diese *RT1-A* genannte Region kodiert für klassische Klasse-I-Moleküle, die an der Oberfläche fast aller Zellen exprimiert und polymorph sind.

Telomerwärts der RT1-A-Region schließt sich die RT1-B/D genannte Klasse-II-Region an. Anhand von intra-MHC-rekombinanten Ratten-Stämmen (Stark *et al.*, 1977; Butcher and Howard, 1997) sowie Cosmid Klonen der Klasse-II-Region (Diamond *et al.*, 1989) konnte gezeigt werden, daß die Gene der Klasse-II-Region der Ratte ortholog zu denen der Klasse-II-Regionen von Maus und Mensch sind.

Der Klasse-II-Region schließt sich wie bei Maus und Mensch die Klasse-III-Region an. Die meisten Klasse-III-Gene, die bei Maus und Mensch identifiziert sind, wurden auch bei der Ratte beschrieben. Auch hier finden sich die Komplement-Gene *C2*, *C4*, *Bf* (Wurst *et al.*, 1988; Cortese Hassett *et al.*, 1989), die Gene der Hitzeschockprotein-Familie *Hsp70* (Walter *et al.*, 1994a) die Tumor-Nekrose-Faktor-Gene (*Tnfa*, *Tnfb*) (Kirisitis *et al.*, 1994a; Kwon *et al.* 1993) und das Gen für eine nukleäre RNA Helikase (*Bat1*) (Nair *et al.*, 1992).

Die sich telomerwärts anschließende Klasse-I-Region wird in der Ratte als *RT1-C*- (Kohoutova *et al.*, 1980) bzw. neuerdings *RT1-C-M*-Region bezeichnet und entspricht der *H2-D/Q/T/M*-Region der Maus. Für diese Region existieren auch weitere Bezeichnungen wie *E/C-grc* oder *grc-G/C*. In diesem Abschnitt des Ratten-MHC sind ca. 60 Klasse-I-Gene oder Genfragmente zu erwarten (Jameson *et al.*, 1992). Die bislang analysierten Klasse-I-Gene dieser Region sind nicht-klassische Klasse-I-Gene, deren Genprodukte durch geringe Expression auf der Zelloberfläche, Gewebsspezifische Expression und niedrigen Polymorphismus charakterisiert sind.

Es gibt bis jetzt nur vereinzelte Kartierungsdaten des Ratten-MHC. Es existieren kleine Cosmid-Contigs aus vereinzelt Abschnitten des MHC: *RT1-A* (Walter *et al.*, 1996), *RT1-B/D* (Diamond *et al.*, 1989; Arimura *et al.*, 1995a,b) und *RT1-C/M* (Jameson *et al.*, 1992; Yuan *et al.*, 1996; Salgar *et al.*, 1998). Ein YAC-Contig aus der *RT1-M*-Region wurde ebenfalls publiziert (Lambracht-Washington *et al.*, 1999).

Eine physikalische Karte und die detaillierte genomische Analyse des RT1-Komplexes würde von großer Wichtigkeit für die Verwendung der Ratte als Tiermodell bei der Erforschung von MHC-assozierten Krankheiten sein und zum Verständniss der MHC-Evolution beitragen.

1.5 Struktur und Funktion von MHC-Klasse-I-Molekülen

Die MHC-Klasse-I-Genprodukte sind Glykoproteine, die auf der Zelloberfläche fast aller kernhaltiger Körperzellen vorkommen. Die tertiäre Struktur der MHC-Klasse-I-Moleküle wurde durch Röntgenstrukturanalyse (Bjorkman *et al.*, 1987a) aufgeklärt. Die Moleküle bestehen aus zwei Polypeptidketten: einer α - oder schweren Kette, die im MHC codiert ist, und einer kleineren, nicht kovalent gebundenen Kette, dem β_2 -Mikroglobulin, die nicht im MHC codiert ist. Die α -Kette enthält drei extrazelluläre Domänen, eine transmembranöse und eine cytoplasmatische Region. Die Faltung der extrazellulären Domänen (α_1 , α_2 und α_3) der α -Kette und des β_2 -Mikroglobulin ist in der Abbildung 2 dargestellt. Die α_3 Domäne und das

β_2 -Mikroglobulin zeigen jeweils eine β -Faltblatt-Struktur, die einer Immunglobulin-Domäne ähnelt. Die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen bilden eine grubenähnliche Struktur aus β -Faltblatt und α -Helix. In der Grube befindet sich die Bindungsstelle für Peptide, die aus dem Cytosol der Zelle kommen und nach einer Infektion auch von Viren oder intrazellulären Bakterien stammen. Der Peptid-Klasse-I-Komplex wird auf die Zelloberfläche gebracht und den cytotoxischen T-Zellen präsentiert, die nach Erkennung dieses Komplexes die infizierte Zelle abtöten können.

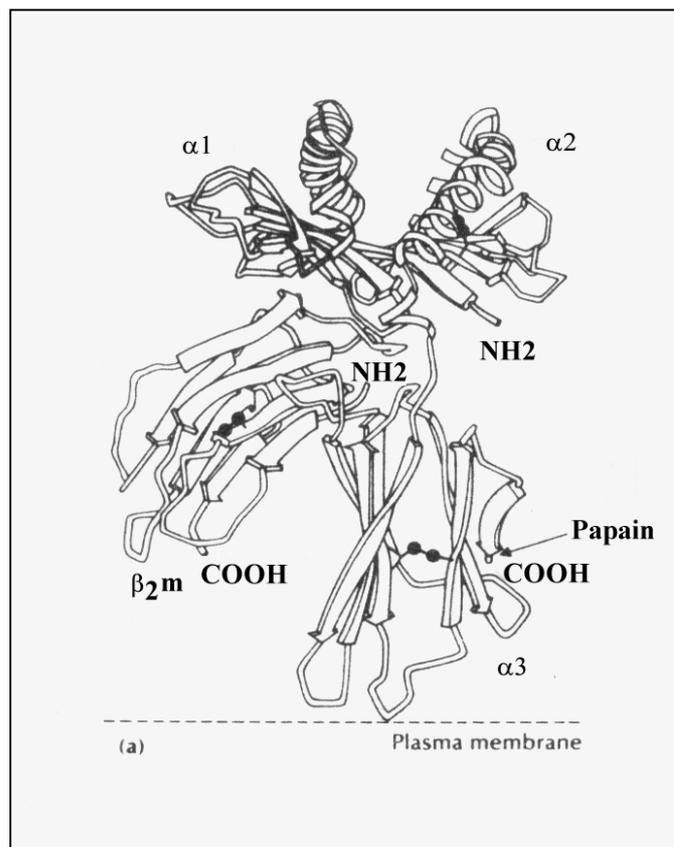


Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur eines Klasse-I-Moleküls. Die Transmembranöse und intrazelluläre Domäne wurden durch Papain abgespalten. Gezeigt ist der extrazelluläre Abschnitt des Moleküls ($\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, und $\alpha 3$ -Domäne), assoziiert mit dem $\beta 2$ -Mikroglobulin. Aus: Klein 1990.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Klonierung und strukturelle Analyse der RT1.C/M Region des Ratten-MHC. Im Rahmen dieses Projekts sollte zunächst im Rahmen dieses Projekts eine genomische Bank in künstlichen Bakterienchromosom (BAC) hergestellt werden. Bei den bis jetzt einsetzbaren genomischen Banken der Ratte, handelt es sich um YAC-Banken, die trotz erwünschten langen Inserts schwer handzuhaben sind und häufigen Chimerismus aufweisen. Für die strukturelle Analyse dieser Region, deren Länge ca. 2 Mb beträgt, ist die Verwendung einer genomischen Bank mit langen Inserts notwendig. Der Umfang der zu konstruierenden BAC-Bank sollte ca. zehn Genomäquivalente betragen, und eine Insert Länge von >100 kb aufweisen.

In einem weiteren Schritt sollen durch das *Screening* der Bank mit MHC-Proben, Contigs etabliert werden, welche die RT1.C/M-Region umfassen. Die Klasse-I-tragenden Bereiche dieser Region sollten im Vordergrund stehen und je nach Möglichkeit kontinuierliches Contig der gesamten Region von ca. 2 Mb erstellt werden.

2. Verwendete Materialien

2.1. *Escherichia coli* Stämme

DH10B

Genotyp: F[']-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74**deoR**recA1* *endA1*
araD139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK l-rpsL nupG*

Top10F[']

F[']{*lacI^q* Tn10(Tet^R)}*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR recA1*
araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*

2.2 Verwendete Vektoren

Für die Subklonierungen wurden die Vektoren pUC19, pBR322, pBluescript KS+ und pBeloBAC11 verwendet.

Der Vektor pBeloBAC11 wurde zusätzlich für die Konstruktion einer genomischen Bank aus dem Inzuchtstamm LEW.1W/Gun (RT1^u-Haplotyp) verwendet. Die *Bam*HI-Schnittstelle wurde als Klonierungsstelle der mit dem Restriktionsenzym *Mbo*I gespaltenen genomischen DNA benutzt.

Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die physikalische Karte des Vektors pBeloBAC11 bzw. des Vektors pPAC4.

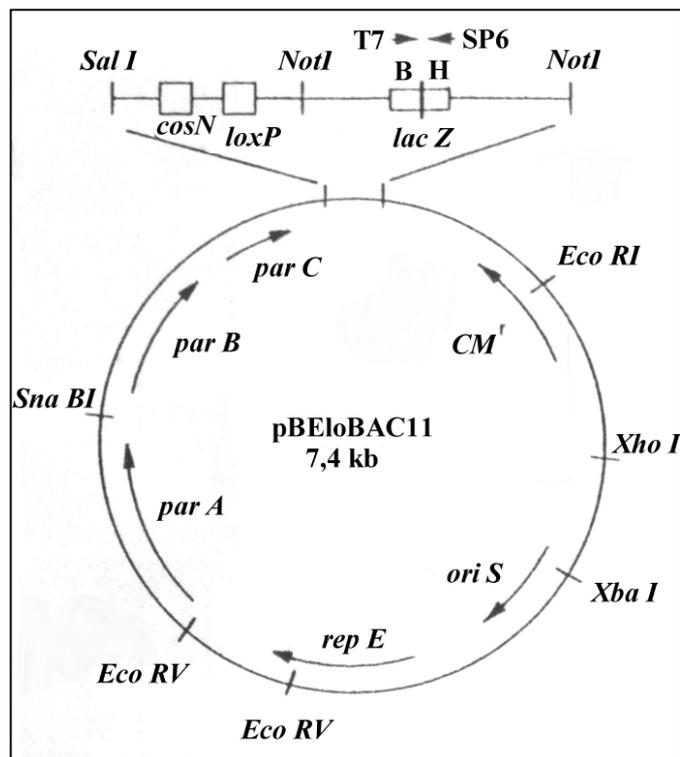


Abb. 3: pBELOBAC11 (Bacterial Artificial Chromosome) Vektor. Dieser Vektor wurde für die Konstruktion einer Bank aus dem Genom der LEW.1W-Ratte verwendet. Ausführliche Beschreibung des Vektors im Text. Aus: http://www.rzpd.de/general/html/glossary/vectors/pbelobac_pic.shtml.

Für die Konstruktion einer genomischen Bank ist die strukturelle Stabilität der inserierten langen Fragmente von großer Wichtigkeit. Viele der verwendeten bakteriellen Vektoren, die in hoher oder mittlerer Zahl repliziert werden, zeigen Instabilität, indem es zu partiellen Deletionen oder Rearrangements der klonierten DNA kommt, speziell bei Inserts aus eukaryotischen Organismen, die repetitive Sequenzen enthalten. Ein geeigneter Vektor, um solche Vorgänge zu vermeiden, ist der BAC-Vektor (Shizuya *et al.*, 1992). Dieser kodiert nicht nur für Gene, die essentiell für die Regulation der eigenen Replikation sind, sondern trägt auch Gene, die die Anzahl der Replicons kontrollieren. Zu den regulatorischen Genen auf dem BAC-Vektor gehören *oriS*, *repE*, *parA* und *parB*. Die *oriS* und *repE* Gene vermitteln unidirektionale Replikation des F-Faktors, während *parA* und *parB* die Kopienzahl auf ein bis zwei Kopien pro *E.coli* Zelle regulieren. Weiterhin enthält der BAC-Vektor einen Chloramphenicol-Resistenz-Marker sowie ein Klonierungssegment. Das Klonierungssegment enthält die Bakteriophagen-Stellen λ *cos N* und *PI loxP*. *CosN* ist für die spezifische Spaltung durch die λ -Terminase notwendig. *LoxP* ist eine spezifische Spaltungsstelle für das P1 Cre-Protein.

Das Klonierungssegment enthält zwei Klonierungsstellen, *Bam*HI und *Hind*III, sowie mehrere C+G-reiche Restriktionsstellen (*Not*I, *Eag*I, *Xma*I, *Bgl*II, *Sfi*I) für die potentielle Excision des Inserts. Die Klonierungsstelle ist durch die T7- und SP6- Promotoren flankiert. Dies ist nützlich für das Ansequenzieren des Inserts vom Vektor aus und für das Generieren von RNA Proben für *chromosomal walking*.

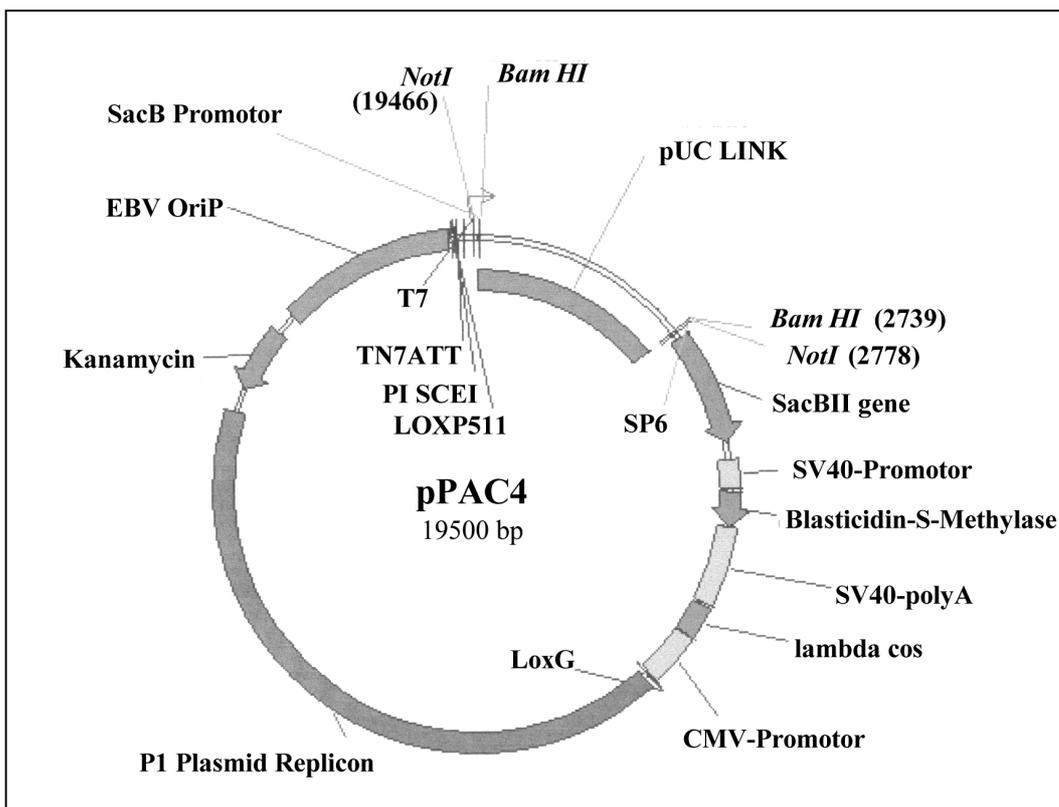


Abb. 4: Physikalische Karte des Vektors pPAC4. Dieser Vektor wurde zur Konstruktion der genomischen Bank der BN-Ratte (Woon *et al.*, 1998) verwendet, die zur Analyse der RT1-C/M-Region eingesetzt wurde.

Der PAC-Vektor (Fregen *et al.*, 1996; <http://128.205.166.214/cgi-bin/vector-query?Vector=pPAC4&Choice=G>) ist wie der oben erwähnte BAC-Vektor ein *low copy*-Plasmid, basiert aber auf dem Bakteriophagen P1 und kann ebenfalls stabil fremde klonierte DNA in *E.coli* vermehren. Die *Bam*HI-Klonierungsstelle ist flankiert von den T7- und SP6-Promotor-Sequenzen. Bei der Klonierung wird das 2,7 kb umfassende *Bam*HI-Fragment durch das neue Insert ersetzt. Eine *Not*I-Restriktions-Schnittstelle flankiert direkt das T7-*Bam*HI-SP6-Segment. Der Vektor trägt ein Kanamycin-Resistenz-Gen. Eine aus dem Hefe-Intron kodierte Nuklease-Erkennungs-Stelle (PI-SceI) erlaubt das Linearisieren aller

rekombinanten Klone unabhängig von der Länge und dem Inhalt. Dieses ist nützlich für optimale Kartierungs-Prozeduren.

Ein weiteres Element diesen Vektors ist das Epstein-Barr-Virus-Replikon (EBV oriP) für die Replikation in humanen Zellen.

Die 43 bp große spezifische Rekombinations-Stelle loxG rekombiniert *in vivo* mit komplementären lox-Stellen des Säuger-Genoms und erlaubt die Aktivierung der G418-Resistenz unter der Kontrolle des CMV-Promoters und des ATG-Startcodon.

Das Blastocidin-S-Methylase-Gen unter der Kontrolle des SV40-Promoters verleiht Blastocidin-Resistenz in Säugerzell-Kulturen.

2.3 Oligonukleotide

2.3.1 Oligonukleotide zur Generierung von Hybridisierungsproben

Die folgenden Oligonukleotide wurden eingesetzt, um Proben aus verschiedenen *framework*-Genen zu erstellen. Weiterhin dienten sie zur Etablierung von STS-Markern, die für die Hybridisierung der PACs verwendet worden sind, aber auch für Sequenzierungen.

Die Oligonukleotide wurden von der Firma NAPS in Göttingen synthetisiert.

RT1.A3'	5'-CTC ACA CTC GCT GCG GTA TT-3'	(20mer)
RT1.A7	5'-ACC GYC CTC GCT CTG GTT GTA GTA G-3'	(25mer)
alpha 3	5'-AGC CAC TTT CCC AGA GAT GG-3'	(20mer)
TM-1	5'-TGT CCT TTC CTA CCT GTG TTT C-3'	(22mer)
5/1-5'	5'-CTG AGA TAA GAC CTA ACA GAG-3'	(21mer)
5/1-3'	5'-AGA CTT CAG GGA GTT AAC TCC-3'	(21mer)
Pou-1 (mouse)	5'-CAA CGA GAA GAG TAT GAG GCT-3'	(21mer)
Pou-2 (mouse)	5'-GTT TGA ATG CAT GGG AGA GCC-3'	(21mer)
S-1 (human)	5'-AGC AAT GGT GGC CTT CCA GGC AA-3'	(23mer)
S-2 (human)	5'-GAA TGC AAT GGC CGA GGA AGC TG-3'	(23mer)

TCF19-5'	5'-GAC TTT GCT GCC ATT ACC ATC-3'	(21mer)
TCF19-3'	5'-GCT CAC TCT CAT CAT CCA GT-3'	(20mer)
RFB30-5'	5'-GCT CAG TTC TCC TCA AAA TGG-3'	(21mer)
RFB30-3'	5'-GCC CAA AGA AGG GAA TGA CC-3'	(20mer)
Mog-5'	5'-GGA CAG TTC AGA GTG ATA GG-3'	(20mer)
Mog-3'	5'-GAA CCT CAC GTT CTG GAT CCT-3'	(21mer)
grc-5'	5'-GCT GCA TCT AAT CAG TCT GTG-3'	(21mer)
grc-3'	5'-GCA GAA TGC AGT AGT GGG CAT-3'	(21mer)
255D16-5' (mouse)	5'-GTG CAG TGT GCT TTC AAA TTC-3'	(21mer)
255D16-3' (mouse)	5'-CCA AGT TCT TCC CTG CTG CT-3'	(20mer)
261A5-5' (mouse)	5'-GTT GAC CTA GAA TTG CCA CC-3'	(20mer)
261A5-3' (mouse)	5'-CAT ATT ACT CTG GGT GGA CC-3'	(20mer)
ZNF173-5' (human)	5'-CAC GGA AGA AGT TCT GGG TT-3'	(20mer)
ZNF173-3' (human)	5'-ACT TCC ACT TCC CAG TAG AC-3'	(20mer)
BM1-5'	5'-GCA AGG CTT TCC AGA TCT CT-3'	(20mer)
BM1-3'	5'-GAC CAT AAG AGG AAT GGT GGA-3'	(21mer)
M4-5'	5'-GCT GTG ATT ACC CTC ACT GG-3'	(20mer)
M4-3'	5'-AGC TCC CGT ACT AGA GTG TG-3'	(20mer)
5'-repeat	5'-GCG ATG TGA GGA AGT CGT TA-3'	(20mer)
3'-repeat	5'-CTT ATC TAT TTC CTG GTC CTG-3'	(21mer)
H12587ano-5'	5'-TGT CCC TCT GAC AAA GCA GA-3'	(20mer)
H12587ano-3'	5'-CCA AAG AAG TCT CAG CCT GA-3'	(20mer)
H12587ORF2-5'	5'-ATG GAA AAC CAT CAA TGT GAT-3'	(21mer)
H12587ORF2-3'	5'-GGC ATT TGC TGT GTT TAG GTA-3'	(21mer)
I16223R1-5'	5'-GTA CAG GAG ACA ACT GTG AC-3'	(20mer)
I16223R1-3'	5'-GGC TTG CAA CAG TCC ACA AC-3'	(20mer)
A22434TCF-5'	5'-GGA CCT ATT CAA AGT CCT GGA-3'	(21mer)
A22434TCF-3'	5'-GTC ATG AGA GCA GGA GAA CT-3'	(20mer)
PRG1-5'	5'-GCT CTA CCC TCG AGT GGT GA-3'	(20mer)
PRG1-3'	5'-GTA ATG GGC GCA GAG ATG GG-3'	(20mer)
RT1.M3-5'	5'-GTT CTC ACA TCC TGC AGT GG-3'	(20mer)
RT1.M3-3'	5'-GCA GGA ATC TAT GGA GCA GC-3'	(20mer)
H2-M2-5'-3'	5'-GAT CCC ACT CCT TGC GGT AC-3'	(20mer)

H2-M2-3'	5'-GTT CTG GCT CTG GTT GTA GT-3'	(20mer)
86E23-5'	5'-GGC TGT ACT TGA ATT TCC CTC-3'	(21mer)
86E23-3'	5'-GTC TGT GCC ACC ATC CAA AC-3'	(20mer)
261A5S-5'	5'-GTC AAT ATC CTA GTC CTG TCT-3'	(21mer)
261A5S-3'	5'-GGT CTG ATA TCC TGT AGA TCC-3'	(21mer)
573K1S-5'	5'-GCT TCT GTT CTG TGT GTG CC-3'	(20mer)
573K1S-3'	5'-GAC TGT ATC GGT TGC TGG AA-3'	(20mer)
P08462-5'	5'-GGA TCA AGG ACT AAG TAC CAC-3'	(21mer)
P08264-3'	5'-GGA ACA CGT GGA GCT CAG AC-3'	(20mer)
rBAT1-5'	5'-TCT CAC CTG CTC TGG GAC TC-3'	(20mer)
rBAT1-3'	5'-TGC CCA GTA ACT GGC TCC AG-3'	(20mer)
rBAT1.3	5'-TGG ACT GTG GCA GTC TGT GTA GAA-3'	(24mer)
rBAT1.3-neu	5'-GTC ACC ACC ACT CCT AAA CC-3'	(20mer)
PNUTS-5'	5'-GCA GCA TCG CCT GGA GCA-3'	(18mer)
PNUTS-3'	5'-GCC TGT GAA GAA GAA CTC CA-3'	(20mer)
H10232-5'	5'-GCT GGT CTG ACA ATA ACC CA-3'	(20mer)
H10232-3'	5'-CAT GCA AAT TTT ATG GTG GAA C-3'	(22mer)
F05479-5'	5'-GAG ATA TGG GAA GTA TAC TTC A-3'	(22mer)
F05479-3'	5'-CTG TAG TCC ATT GAT CAC CAT-3'	(21mer)
TC4-5'	5'-GTC CAG TTC AAA CTT GTA TTG G-3'	(22mer)
TC4-3'	5'-CAC AGG TCA TCA TCC TCA TC-3'	(20mer)
CAK-5'	5'-GCA GGA TGA CCC TCT CTG C-3'	(19mer)
CAK-3'	5'-GAT ACA CTC CCA GGC CAT C-3'	(19mer)
GTF2H-5'	5'-GAA ATG TCC CGA TGT GTA AAC-3'	(21mer)
GTF2H-3'	5'-GTG GAC TTT GAA TTG CTG CTG-3'	(21mer)
alpha1-5'	5'-GCT CAC ACT CGC TGC GGT A-3'	(19mer)
(Anfang Exon 2)		
alpha1-3'	5'-GCC CTC GCT CTG GTT GTA G-3'	(19mer)
(Ende Exon 2)		

D20Wox5-1	5'-GAA AAA TAC TTC CAC ACA CTA ATG-3'	(24mer)
D20Wox5-2	5'-AAA GTC AAG CCC TGG AGT G-3'	(19mer)
D20Arb2-1	5'-CAG GAG GAT TAA GAG AGG TGC C-3'	(22mer)
D20Arb2-2	5'-CTG GCT TCA GAG ATT CAA CTG C-3'	(22mer)
D20Mgh3-1	5'-AAC TTC CTG GTC CAG CCT G-3'	(19mer)
D20Mgh3-2	5'-CTC AGT GTG GAA GTG AGG AGC-3'	(21mer)
Bat-si242	5'-GTG GCT GTG GGT GGT GAA-3'	(18mer)
Bat-cod.	5'-GTG TCA GAC GAG AAC GAT G-3'	(19mer)

2.3.2 Oligonukleotide für PAC-Endsequenzierung

pPAC4-3	5'-GTT TCG ATC CTC CCG AAT TG-3'	(20mer)
pPAC4-4	5'-CAT ACA GAA GGA GAC ATG AAC-3'	(20mer)
pPAC4-5	5'-CGC TAA TAC GAC TCA CTA TA-3'	(20mer)
pPAC4-6	5'-CAA TAT AGT CCT ACA ATG TC-3'	(21mer)

2.3.3 Sonstige Primer

Adaptor-Primer	5'-GAC TCG AGT CGA CAT CG-3'	(18mer)
ID-rat	5'-CCA CTG AGC TAA ATC CCC AAC CCC-3'	(24mer)

2.4 Chemikalien

Agar	GIBCO BRL GmbH
Agarose, genetic technology grade	ICN Biomedicals
Agarose, low melting point	ICN Biomedicals
AmpTabs™	Stratagene GmbH
Bacto-Hefe-Extrakt	GIBCO BRL GmbH
Bacto-Pepton	GIBCO BRL GmbH
Biophenol, trisstabilisiert, pH7,8-8,0	Biomol Feinchemikalien GmbH
Borsäure, p.A.	Merck KGaA
Bromphenolblau	Merck KGaA

5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galaktosid (X-Gal)	Biomol Feinbiochemikalien GmbH
1-Butanol, p.A.	Merck KGaA
Calciumchlorid-2-hydrat, p.A.	Merck KGaA
Chloroform, p.A.	Merck KGaA
Dextransulfat	Pharmacia Biosystems GmbH
Dinatriummethylen-dinitrilotetraessigsäure Dihydrat (EDTA), p.A.	Merck KGaA
Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei, p.A.	Merck KGaA
Entwickler LX 24	Kodak
Essigsäure 100 %, p.A.	Merck KGaA
Ethanol 99,9%, vergällt	Zentralapotheke, Klinikum Göttingen
Ethidiumbromid, kristallin	Merck KGaA
Ficoll 400	Pharmacia Biosystems GmbH
Fixierer AL 4	Kodak
Formamid	PE Applied biosystems
Glucose, p.A.	Merck KGaA
Glycerin	Merck KgaA Roth GmbH
Heringsspermien-DNA	Boehringer Mannheim GmbH
Isoamylalkohol, p.A.	Merck KGaA
Isopropanol, p.A.	Merck KGaA
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	Biomol Feinbiochemikalien GmbH
Kaliumacetat, p.A	Merck KGaA
Kaliumchlorid, p.A.	Merck KGaA
Kanamycin Monosulfat	Sigma-Aldrich GmbH
Lambda-DNA (λ -DNA)	MBI Fermentas GmbH
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.A.	Merck KGaA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, p.A.	Merck KGaA
N-Lauroylsarcosin	Merck KGaA
Natriumacetat-Trihydrat, p.A.	Merck KGaA
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich GmbH
Natriumchlorid, p.A.	Sigma-Aldrich GmbH

Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, p.A	Merck KGaA
Natriumdodecylsulfat, p.A.	Merck KGaA
Tri-Natriumcitrat (Dihydrat), p.A.	Merck KGaA
Natriumhydrogencarbonat, p.A.	Merck KGaA
Natriumhydroxid, p.A.	Merck KGaA
Nucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Boehringer Mannheim GmbH
ortho-Phosphorsäure, 85%, p.A.	Merck KGaA
Paraffin	Merck KGaA
Phenol, p.A.	Merck KGaA
PMSF (Phenylmethansulfonyl-Fluorid)	Fluka Feinchemikalien GmbH
Polyvinylpyrrolidon	Merck KGaA
RNase-Inhibitor (RNasin)	Amersham Buchler GmbH
Salzsäure, rauchend, p.A.	Merck KGaA
Spermidin	Merck KGaA
Spermin	Merck KGaA
Template Supression Reagent	PE Applied Biosystems
Xylencyanol FF	Bio-Rad Laboratories GmbH

2.5 Radiochemikalien

α -[³² P]-dCTP	Amersham Buchler GmbH
γ -[³² P]-dATP	Amersham Buchler GmbH

2.6 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim GmbH
Lysozym	Sigma-Aldrich GmbH
MMLV reverse Transkriptase	Amersham Buchler GmbH
Proteinase K	Merck KGaA
Restriktionsenzyme	Amersham Buchler GmbH
	Boehringer Mannheim GmbH
Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V	Biomol Feinbiochemikalien GmbH

RNase A	Boehringer Mannheim GmbH
T4-DNA-Ligase	Boehringer Mannheim GmbH
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer Mannheim GmbH

2.7 Versuchstiere

Zur Konstruktion einer genomischen Bank wurde die Spezies *Rattus norvegicus*, Stamm LEW.1W/Gun, der als Inzuchtstamm in der Abteilung Immungenetik gehalten wird, benutzt. Dem Tier wurden zur Isolierung der DNA (Methode 3.2.2) die Milz und die Lymphknoten entnommen.

2.8 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit Milli-Q-Wasser (Milli-Q-Water-System, Millipore) angesetzt. Je nach Verwendungszweck wurde anschließend 30 Minuten bei 121°C und 1,1 bar im Dampfautoklaven autoklaviert oder bei hitzeempfindlichen Lösungen sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm).

Auftrags-Puffer (DNA)	0,25 % Bromphenolblau 0,25 %, Xylencyanol 25 % Ficoll 400 50 mM EDTA pH 8,0
Denaturierungslösung (Alkalizer)	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Denhardt-Lösung (50x)	1 % Ficoll 400 1 % Polyvinylpyrrolidon 1 % BSA (Fraktion V)
ESP-Lösung	0,5 M EDTA 1% N-Lauroylsarcosin 0,05% Proteinase K

Hybridisierungslösung	6 x SSC 5 x Denhardt-Lösung 10% Dextransulfat 0,5% SDS
Hybridisierungslösung für PAC-Klone	0,5 M Natriumphosphat pH 7,2 1 mM EDTA 7% SDS
Lysis-Lösung I	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0
Lysis-Lösung II	0,2 N NaOH 1% SDS
Neutralisierungslösung	3 M Natriumacetat pH 5,5
P1-Lösung	50 mM Tris pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 100 µg/ml RNase A
P2-Lösung	200 mM NaOH 1% SDS
P3-Lösung	2,55 M Kaliumacetat pH 4,8
100 x PA Stocklösung	Spermidin 75 mM (0,109 g/10 ml) Spermin 30 mM (0,06 g/10 ml)
PBS	1% NaCl 0,025% KCl 0,0143% Na ₂ HPO ₄ 0,0025% KH ₂ PO ₄

Puffer S1	50 mM Tris/HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A pH 8,0 mit HCl
Puffer S2	200 mM NaOH 1% SDS
Puffer S3	2,80 M Kaliumacetat pH 5,1
SSC (20x)	3M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0 mit HCl eingestellt
TBE-Puffer (10x)	0,5 M Tris-Borat pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0
TE-Puffer (10x)	100 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0
Tris-Phosphat-Puffer(20x)	1,75 M Tris 40 mM EDTA pH 7,8 mit Phosphorsäure eingestellt
TOP-Agar	1% Bacto-Pepton 0,5%Bacto-Hefe-Extrakt 1% NaCl 0,75% Agar

2.9 Zusammensetzung von Nährmedien

2.9.1 Nährmedien

LB (Luria-Bertani)-Medium 10% NaCl

	10% Bacto-Pepton 5% Bacto-Hefe-Extrakt (15% Agar für Platten)
SOB-Medium	2% Bacto-Pepton 0,5% Bacto-Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄
SOC-Medium	SOB-Medium 20 mM Glucose

2.9.2 Zusätze für prokaryotische Nährmedien

Ampicillin-Tabs (25 mg/Tab)	2 Tabletten pro Liter Medium bzw. Agar
Kanamycin-Stammlösung (50 mg/ml)	50 mg sterilfiltriertes Kanamycin pro Liter Medium bzw. Agar
2 M MgSO ₄	5 ml sterilfiltriertes MgSO ₄ pro Liter LB-Medium (Endkonzentration 10 mM)

2.10 Einwegartikel

Dialyseschlauch, 6/32, 27 mm	Serva Feinbiochemika GmbH & Co. KG
Whatman Gel-Blotting-Papier GB003	Schleicher & Schuell
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt GmbH + Co.
Reagiergefäß 2,0 ml	Sarstedt GmbH + Co.
Faltenfilter 595 ½, Ø 185 mm	Schleicher & Schuell

Parafilm PM-992 Laboratoryfilm	über Schütt Labortechnik
Petrischalen, Ø 9 cm	Sarstedt GmbH + Co.
Pipettenspitzen	Sarstedt GmbH + Co.
Polaroidfilme 667	(über die Klinikumsapotheke Göttingen)
Röntgenfilme, Hyperfilm MP	Amersham Buchler GmbH
50 ml-Röhrchen	Sarstedt GmbH + Co.
Sterilfilter, 0,2 µm Porengröße	Sarstedt GmbH + Co.
Steril Filtertips	Sarstedt GmbH + Co.

2.11 Verwendete Kits

ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit	PE Applied Biosystems
Expand™ Long Template PCR System	Boehringer Mannheim GmbH
Jetquick Gel Extraction Spin Kit	Genomed GmbH
Jetstar Plasmid Kit	Genomed GmbH
Megaprime™ labelling systems	Amersham Buchler GmbH
Nucleobond AX	Macherey-Nagel
Original TA Cloning Kit	Invitrogen

2.12 Geräte

Autoklaven:

Hochdruck-Dampfsterilisator Typ C
und Typ A40 (Tischautoklav)

Webeco

Autoradiographiekassetten,
Cronex-Cassetten

Du Pont de Nemours GmbH

Brutschränke, CO₂-begast

Heraeus GmbH

Digital pH-Meter 646

Knick Elektronische Meßgeräte GmbH &
Co

Elektrophoresekammern:

Agagel Mini

Biometra GmbH

Modelle H1, H3 und S2

Gibco BRL GmbH

Modell V16

Gibco BRL GmbH

Elektroporations-Impulsgenerator EPI 2500

Dr. Fischer- Intergen

Handmonitor, Typ LB 1210 B

Laboratorium

Prof. Dr. Berthold

Heizblock, Liebisch, Typ S-12-140

Gebr. Liebisch Bielefeld über Schütt
Labortechnik GmbH

Hybridisierungsofen, Typ 430

Bachofer GmbH

Kryostat-Wasserbad, Multi-Temp II

Pharmacia Biosystems GmbH

Minishaker, Typ MS1 IKA

über Krannich GmbH & Co. KG

Netzteile:

Fröbel Laborgeräte

Consort Electrophoresis Power Supply 2197 Power Supply	Pharmacia Biosystems GmbH
Photometer, Ultrospec II	Pharmacia Biosystems GmbH
Polaroid-Kamera CU-5	Polaroid GmbH
Rundschüttler, IRC-1-U Clim-O-Shake	Adolf Kühner AG Apparatebau
Sequenziergerät ABI 310 Genetic Analyzer	PE Applied Biosystems
Thermocycler, Biometra Uno-Thermoblock	Biometra GmbH
Trilux 1450 MicroBeta, liquid scintillation and luminescence counter	Wallac
UV-Durchleuchter, Fluo-link TYP CL1	Biometra GmbH
UV-Handlampe	Vetter GmbH
Vakuumanlage: Pumpe VP 200, SpeedVac SC 110 Kühlfalle RVT 100	Savant, über Schütt Labortechnik GmbH
Vakuumofen, Heraeus Typ VTR 5022	Heraeus GmbH
Waagen: Typ 1574 MP 8 Typ 414/13	Sartorius GmbH Sauter
Wasserbäder: Schüttel-Wasserbad Wasserbad Köttermann	über Schütt Labortechnik GmbH
Zentrifugen	

Hettich MikroliterTyp 2025 und 2042	Andreas Hettich
Heraeus Christ Labofuge GL	Heraeus Sepatech GmbH
Minifuge GL, Typ 4400	Heraeus Sepatech GmbH
Sigma 3K30 Tischkühlzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH
Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Rotoren SS-34 und GSA	DuPont de Nemours GmbH
Varifuge 3.2 RS	Heraeus Sepatech GmbH

2.13 Herstelleradressen

PE Applied Biosystems	Brunnenweg 13, 64331 Weiterstadt
Amersham Buchler GmbH	Gieselweg 1, 38110 Braunschweig
Andreas Hettich	78532 Tuttlingen
Biometra GmbH	Rudolf-Wissell-Str. 30, 37079 Göttingen
Biomol Feinchemikalien GmbH	Waidmannstr.35, 22769 Hamburg
Boehringer Mannheim GmbH	Sandhofer Str.116, 68305 Mannheim
Dr. Fischer-Intergen	Schneidmühlstr.9, 69115 Heidelberg
Du Pont de Nemours GmbH	Opernplatz 2, Postfach 2607, 60313 Frankfurt
	Dieselstr. 18, 61231 Bad Nauheim
Fluka	Sigma-Aldrich-GmbH
	Grünwalder Weg 30, 82041 Deisenhofen
Fröbel Laborgeräte	Alwindstr. 4, 88131 Lindau
Genomed GmbH	Wielandstr. 28 a, 32545 Bad Oeynhausen
GIBCO BRL Life Technologies	Dieselstr.5, 76344 Eggenstein
Heraeus GmbH	Postfach 1553, 63457 Hanau
Heraeus Sepatech GmbH	Postfach 1220, 37520 Osterode
Intas	Florenz-Sartorius-Str.14, 37079 Göttingen
Invitrogen BV	De Schelp 12, 9351 NV Leek, Niederlande
Knick Elektronische Meßgeräte GmbH & Co	Beuckestr. 22, 14163 Berlin
Krannich GmbH & Co. KG	Elliehäuser Weg 17, 37079 Göttingen
Laboratorium Prof. Dr. Berthold	Siemensstr. 4, 30173 Hannover
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Postfach 101352, 52313 Düren
Merck KGaA	Postfach, 64271 Darmstadt

NAPS Göttingen GmbH	Rudolf-Wissel-Str. 28, 37079 Göttingen
Pharmacia Biotech AB	Munzingerstr. 9, 79111 Freiburg
Polaroid GmbH	Sprendlinger Landstr. 109, 63069 Offenbach
Sarstedt GmbH + Co	51582 Nümbrecht
Sartorius GmbH	Weender Landstr. 94-108, 37079 Göttingen
Sauter	Ringstr. 134, 70839 Gerlingen
Schleicher & Schuell	Postfach 4, 37582 Dassel, über Krannich GmbH & Co. KG
Schütt Labortechnik GmbH	Rudolf-Wissell-Str. 11, 37079 Göttingen
Serva Feinbiochemica GmbH & Co. KG	Carl-Benz-Straße 7, 69115 Heidelberg
Sigma Laborzentrifugen GmbH	An der unteren Söse 50, 37520 Osterode
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Postfach, 82039 Deisenhofen
Wallac	EG & G Berthold, Laboratorium Prof. Dr. Berthold GmbH & Co. KG Postfach 100163, 75312 Bad Wildbad
Webeco	Webecke & Co., 23611 Bad Schwartau

2.14 Verwendete Hybridisierungsproben

Bezeichnung	Literaturquelle	Probe	Spezies
$\alpha 1$ -Probe*	Walter <i>et al.</i> (1995)	700 bp <i>NotI/PstI</i>	<i>R.norvegicus</i>
$\alpha 3$ -Probe*	Walter <i>et al.</i> (1995)	289 bp <i>PstI/PstI</i>	<i>R.norvegicus</i>
Bat1: Nukleäre RNA Helikase	Nair <i>et al.</i> (1992)	400 bp PCR Produkt an cDNA	<i>R.norvegicus</i>
BM1: MHC-Klasse-I, 3'utr (NC1-Region)	Parker <i>et al.</i> (1990)	1 kb PCR-Produkt	<i>R.norvegicus</i>
Cyto-Poly-A-Probe*	Walter <i>et al.</i> (1995)	731 bp <i>PstI/PstI</i>	<i>R.norvegicus</i>

(GAAA)n: repeat	PAC Endsequenzierung, Klon J2298	200 bp PCR- Produkt	<i>R.norvegicus</i>
Gna-rs1(R1): GTP-binding protein	Vernet <i>et al.</i> (1994)	359 bp <i>EcoRI</i> - Fragment	<i>M.musculus</i>
pGrc1.4: growth and reproduction complex	Salgar <i>et al.</i> (1997)	500 bp PCR-Prod.	<i>R.norvegicus</i>
H12587	PAC-Endsequenzierung (kommt mehrfach in der gesamten Region von Contig 2a und 2b vor)		<i>R.norvegicus</i>
I162T: STS-Marker	PAC-Endsequenzierung	230 bp PCR- Produkt	<i>R.norvegicus</i>
M2: MHC-Klasse-Ib Exon 2	Brorson <i>et al.</i> (1989)	270 bp PCR- Produkt	<i>M.musculus</i>
M3: MHC-Klasse-Ib Exon 3	Wang <i>et al.</i> (1995)	250 bp PCR- Produkt	<i>R.norvegicus</i>
M4: MHC-Klasse-Ib (polymorpher Mikro- satelliten- Marker)	Lambracht-Washington <i>et al.</i> (1998)	129 bp PCR- Produkt	<i>R. norvegicus</i> Stamm BN
Mog: Myelin/ oligodendrocyte glycoprotein	Pham-Dinh <i>et al</i> (1993)	270 bp PCR- Produkt	<i>R.norvegicus</i>
PNUTS: Phosphatase I nuclear targeting subunit	PAC-Endsequenzierung Klon E16374 Allen <i>et al.</i> (1998)	100 bp	<i>R.norvegicus</i>

Pou5f1: Oct-4 Transkriptionsfaktor	Rosner <i>et al.</i> (1990)	170 bp PCR- Produkt	<i>M.musculus</i>
PRG1: <i>early response gene</i>	Schäfer <i>et al.</i> (1996)	300 bp PCR- Produkt	<i>R.norvegicus</i>
Promotor -Probe aus einem Klasse-Ia- Gen*	Walter <i>et al.</i> (1995)	1300 bp <i>PstI/NotI</i>	<i>R.norvegicus</i>
RFB30: <i>Ring finger protein</i>	Henry <i>et al.</i> (1997)	420 bp PCR- Produkt	<i>H.sapiens</i>
S: <i>Skin expressed gene</i>	Shiina <i>et al.</i> (1998)	288 bp PCR- Produkt	<i>H.sapiens</i>
TCF19: Transkriptionsfaktor	Krisnan <i>et al.</i> (1995)	330 bp PCR- Produkt	<i>H.sapiens</i>
Tctex5: t-complex Testis expressed	Yeom <i>et al.</i> (1992)	500 bp <i>EcoRI</i> - Fragment	<i>M.musculus</i>
Tnf: Tumor Nekrose Faktor	Kirisitis <i>et al.</i> (1994)	PCR Produkt	<i>M.musculus</i>
Tu42: Olfaktorisches Rezeptor Gen	Erhalten von Dr. P. Pontarotti, Marseille	1,9 kb <i>EcoRI/BamHI</i> - Fragment	<i>M.musculus</i>
ZNF173: <i>Zinc finger protein 173</i>	Chu <i>et al.</i> (1995)	320 bp PCR- Produkt	<i>H.sapiens</i>
255D1: STS-Marker	Jones <i>et al.</i> (1999).	260 bp PCR- Produkt.	<i>M.musculus</i>

261A5: STS-Marker	Jones <i>et al.</i> (1999)	360 bp PCR-Produkt	<i>M.musculus</i>
261A5S: STS-Marker	Jones <i>et al.</i> (1999)	330 bp PCR-Produkt	<i>M.musculus</i>

*Eine Schematische Darstellung dieser Hybridisierungs-Proben ist in der Abbildung 5 zu sehen. Die Erläuterung folgt im Text.

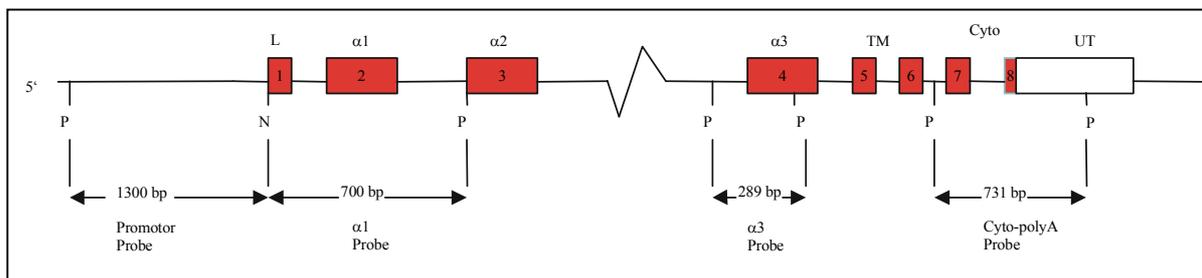


Abb. 5: Schematische Darstellung der Exon-Intron-Organisation eines Klasse-I-Gens und der davon abgeleiteten Hybridisierungssonden. Beschreibung siehe Text.

Aus Subklonen des Klons 9b1 (Walter *et al.*, 1995), der ein funktionelles MHC-Klasse-I-Gen mit der in Abb. 5 gezeigten, typischen Exon-Intron Organisation für MHC-Klasse-I-Gene trägt und in die *RT1-A*-(RT1^u-Haplotyp) Region kartiert, wurden vier Hybridisierungsproben erstellt. Diese wurden durch Restriktionsspaltung mit *Pst*I und *Pst*I/*Not*I erhalten. Die Promotor-Probe enthält noch einen Teil der Exon-1-Sequenz, während die alpha-1-Probe den anderen Teil des Exons 1, das Intron 1, die gesamte Exon 2-Sequenz sowie das Intron 2 in einer Länge von 700 bp umfasst. Die alpha 3-Probe besteht aus einem Teil des Introns 3 und aus einem Teil des Exons 4 mit einer Gesamtlänge von 289 bp. Die Cyto-polyA-Probe besteht aus dem Exon 7, Exon 8, einem Teil des Introns 6, Intron 7 und einem Teil der 3'-untranslatierten Region.

2.15 Verwendete Ressourcen

Eine PAC-Bank aus genomischer DNA des Inzuchtstammes BN (Woon *et al.*, 1998) wurde als "gridded library" (library Nummer 712) vom Ressourcen-Zentrum im Deutschen Humangenomprojekt (RZPD) Heubnerweg 6, 14059 Berlin zur Verfügung gestellt. Die Bank

repräsentiert 10,7 Genomäquivalente, wobei die durchschnittliche Insertlänge 147,3 kb beträgt. Die zur Konstruktion der Bank verwendete genomische DNA entstammt dem Gehirn einer weiblichen Ratte des Inzuchtstammes BN/ssNHsd (Brown Norway). Nach partieller *Mbo*I-Spaltung wurden die Restriktionsfragmente in den Vektor pPAC4 ligiert und zur Transformation von *E.coli*-Zellen des Stammes DH10B eingesetzt.

Tab. 1: Übersicht der verwendeten PAC-Filter

	Library-No	Bezeichnung
Filter # 1	Library-No. 712, Part 1	110-1-116
Filter # 2	Library-No. 712, Part 2	110-2-127
Filter # 3	Library-No. 712, Part 3	110-3-110
Filter # 4	Library-No. 712, Part 4	110-4-122
Filter # 5	Library-No. 712, Part 5	110-5-134
Filter # 6	Library-No. 712, Part 6	110-6-116
Filter # 7	Library-No. 712, Part 7	110-7-161
Filter # 8	Library-No. 712, Part 8	110-8-158
Filter # 9	Library-No. 712, Part 9	110-9-122

2.16 Verwendete Computerprogramme

Die Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mit dem Programm „*Sequencing Analysis*“ der Firma PE Applied Biosystems.

Die Suche nach homologen Sequenzen erfolgte im Internet mit den Programmen BCM Search Launcher (<http://kiwi.imgen.bcm.tmc.edu>) sowie BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit den Programmen ALIGN und LALIGN (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu>) verglichen.

3. Methoden

3.1 Allgemeine Angaben zur Arbeit mit DNA

Die im Umgang mit Nukleinsäuren erforderliche Sterilität der Geräte und Lösungen wurde durch das Autoklavieren der Glasgeräte und Edelstahlbestecke bei 134°C und 2,1 bar für 10 Minuten bzw. der Plastikartikel bei 121°C und 1,1 bar für 20 min im Dampfdruckautoklaven erreicht. Die thermostabilen Lösungen wurden 20 Minuten bei 121°C und 1,1 bar autoklaviert, thermolabile Lösungen dagegen sterilfiltriert (Porengröße der Filter 0,2 µm).

3.2 Isolierung von DNA

3.2.1 Präparation von genomischer DNA aus kleiner Menge Lebergewebe

Eins bis zwei kleine Organstücke (aus eingefrorenem Material) wurden über Nacht in 700 µl Lysepuffer und 35 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Extraktion mit 700 µl Phenol und Zentrifugation (Tischzentrifuge, 15000 rpm, 3 Minuten) entfernt. Der Überstand wurde mit 700 µl Chloroform gewaschen und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die DNA präzipitierte durch den Zusatz von 70 µl 3 M Natriumacetat pH 6,0 und 700 µl eiskaltem absoluten Ethanol. Nach der 10-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 15000 rpm wurde das DNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 x TE-Puffer gelöst.

3.2.2 Die Isolierung und Verarbeitung von Lymphozyten-DNA

Die Lymphknoten wurden aus der mit CO₂ getöteten Ratte präpariert und direkt in kalten PBS-Puffer (1% NaCl, 0,025% KCl, 0,0143% Na₂HPO₄, 0,0025% KH₂PO₄) gelegt. Die in einer Petrischale mit einem Skalpell zerkleinerten Lymphknoten wurden in einem Falcon-Röhrchen in 50 ml PBS resuspendiert. Die Inkubation des Röhrchens für 5 min auf Eis bewirkte, daß grobe Gewebe Bestandteile sedimentierten. Der in ein neues Falcon-Röhrchen transferierte Überstand zentrifugierte für 10 min bei 600 x g und 4°C. Das Pellet wurde in

weiteren 50 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl mikroskopisch bestimmt. Die Endkonzentration von 4×10^7 Zellen/ml wurde durch erneute Zentrifugation und Aufnahme in einer berechneten Menge PBS eingestellt. Diese Zellsuspension wurde mit einem äquivalenten Volumen 1,5% *low-melting-point*-Agarose (gekocht in PBS, abgekühlt auf 37°C) gemischt, so daß eine 0,75%ige Agarose-Lösung resultierte. Durch das Gießen der noch warmen Agarose/Zell-Lösung in entsprechende autoklavierte Einsätze erhielt man Blöckchen, die nach Abkühlen, in ESP-Lösung äquilibriert und für 48h bei 50°C unter schnellem Schütteln inkubiert wurden. Anschließend erfolgte ein 30-minütiger Waschschrift der Blöckchen mit 1xTE-Puffer, pH 8 bei 50°C und die Überführung in 1xTE-Puffer, welcher 1 mM PMSF enthielt sowie die erneute Inkubation bei 50°C für 30 min. Zuletzt wurden die Blöckchen in 1xTE bei Raumtemperatur gewaschen. Aufbewahrt wurden die Blöckchen in 0,5 M EDTA bei 4°C und vor der weiteren Verwendung in 1xTE äquilibriert.

3.2.3 Gewinnung von Plasmid-DNA mittels Säulenelution

Für die Plasmidisolierung im präparativen Maßstab wurden Anionenaustauschersäulen der Firma Genomed verwendet. 100 ml einer frischen Übernachtskultur der Plasmid-tragenden *E. coli*-Transfektante wurden abzentrifugiert (Hettich Rotanta, 4000 rpm, 10 min), der Überstand vollständig verworfen und das Pellet in 10 ml E1-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 ml des alkalischen Lysepuffers E2. Während der Inkubationszeit von 5 min bei RT denaturierten die zellulären Proteine unter dem Einfluß des enthaltenen SDS und die alkalischen Bedingungen bewirkten die Denaturierung der chromosomalen- und Plasmid-DNA. Die Zugabe von 10 ml E3- Puffer bewirkte die gemeinsame Präzipitation von chromosomaler DNA, denaturierten Proteinen und Zelltrümmern. Die kleinere Plasmid-DNA liegt nach der sich anschließenden Zentrifugation (15000 g, 10 min, RT) renaturiert im Überstand vor, welcher, filtriert durch eine doppelte Zellstoff-Lage, auf eine mit 30 ml E4-Puffer äquilibrierte Maxi-Jetstarsäule aufgetragen wurde. Nach dem Waschen mit 60 ml E5-Puffer wurde die Säulenmatrix-gebundene DNA mit 15 ml des Hochsalzpuffers E6 eluiert und durch den Zusatz von 0,7 Vol% Isopropanol gefällt. Nach einer 20minütigen Inkubation bei RT folgte eine 30minütige Zentrifugation (15000 g, 4°C). Das DNA-Pellet wurde sodann mit 0,5 ml 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

3.2.4 Präparation von low-copy Plasmid-DNA (PAC) im größeren Maßstab mittels Nucleobond® AX Säulen

Nucleobond® AX ist ein Anionenaustauscher auf Silikat-Basis. Die Aufreinigungen wurden in wässrigen Puffern, welche teilweise Ethanol enthielten, durchgeführt. Die Bindung der Nukleinsäuren an den großporigen Anionenaustauscher erfolgte bei niedrigen Salzkonzentrationen. In den nachfolgenden Waschschrritten stieg der Salzgehalt kontinuierlich an; die Elution der dsDNA fand bei Salzkonzentrationen zwischen 1,35 M bis 1,5 M KCl in 100 mM Tris-Phosphat statt.

Es wurden 100 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht inkubiert (160 rpm, 37°C). Die Ernte der Bakterien erfolgte durch eine 10minütige Zentrifugation (4000 rpm, Raumtemperatur). Das erhaltene Zellpellet wurde nach der Resuspension in 8 ml S1-Puffer mit 8 ml Puffer S2 versetzt und durch vorsichtiges inverses Schwenken der Röhre gemischt. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte der behutsame Zusatz 8 ml Puffer S3. Das erhaltene Lysat inkubierte vor der Zentrifugation (15000 x g, 25 Minuten, 4°C) 5 Minuten auf Eis. Während der Zentrifugation wurde die Säule mit 2 ml Puffer N2 äquilibriert. Der klare Überstand wurde auf die Säule gegeben und diese nach dem Durchlauf dreimal mit 4 ml Puffer N3 gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit zweimal 2 ml Puffer N5 von der Säule eluiert. Die DNA präzipitierte durch den Zusatz von 1,4 ml Isopropanol während der anschließenden 45minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation bei 15000 x g für 10 min und 4°C wurde das Pellet getrocknet (RT) und in einer adäquaten Menge bidest. Wasser aufgenommen.

3.2.5 Kleinansatz zur Präparation von PAC-DNA

Der Überstand einer frischen 20 ml-Übernachtskultur wurde nach der Zentrifugation (4000 rpm, 4°C) dekantiert und das erhaltene Zellpellet in 400 µl RNaseA-haltiger P1-Lösung resuspendiert und für 5 min auf Eis gestellt. Nach dem Zusatz von 800 µl P2-Lösung und der Inkubation für 5 min bei RT wurden 600 µl P3-Lösung dazugegeben, durchmischt und der Ansatz zentrifugiert (15000 x g, 4°C, 15 min). Der Überstand zuerst mit 0,5 Vol Phenol/Chloroform und dann mit 1 Vol Chloroform extrahiert. Die DNA wurde aus dem Überstand durch den Zusatz von 2,5 Vol Ethanol p.a und 1/10 Vol 7 M Ammoniumacetatlg. während der Inkubation bei 4°C (1 h) gefällt. Nach der Zentrifugation (15000 x g, 15 min,

4°C) wurde das Pellet mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 30 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.2.6 Kleinansatz zur Plasmidisolierung (lange Methode)

Zwanzig ml selektives LB-Medium wurde mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht inkubiert (37°C, 160 rpm). Nach der Ernte der Bakterien durch Zentrifugation bei 4000 x g für 10 Minuten wurde das Zellpellet in 320 µl Lysis-Lösung I resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurden 480 µl Lysis-Lösung II zugegeben und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dem Zusatz von 360 µl 3 M Natriumacetat und erneuter Inkubation (5 Minuten, auf Eis), wurden Proteine während einer 10minütigen Zentrifugation (15000 x g, 4°C) pelletiert. Die Nukleinsäuren präzipitierten durch den Zusatz von 600 µl Isopropanol zu 900 µl des Überstand und der sich anschließenden 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Das Nukleinsäurepellet wurde durch Zentrifugation (15000 x g, 20 Minuten) erhalten, getrocknet, in 200 µl TE-Puffer gelöst, mit 6 µl 5 M NaCl und 10 µl RNase A (20 mg/ml) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die restlichen Proteine wurden durch Extraktion mit 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) sowie mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernt. Die DNA präzipitierte durch den Zusatz von 2,5 Vol Ethanol p.a. und 1/10 Vol 3 M Natriumacetat, Inkubation bei -80°C für 10 Minuten und anschließender Zentrifugation (15000 x g, 20 Minuten). Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 30 µl 1 x TE-Puffer aufgenommen.

3.2.7 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Nach dem Animpfen von drei ml LB-Medium, welche ein entsprechendes Antibiotikum enthielten, mit einer einzelnen Bakterienkolonie und Inkubation über Nacht (37 °C, 160 rpm) wurden die Bakterien bei 15000 x g geerntet. Die Resuspension des Zellpellets erfolgte in 150 µl P1-Lösung. Anschließend wurden 150 µl P2-Lösung zugegeben und 5 Minuten bei Raumtempertatur inkubiert. Nach dem Zusatz von 150 µl P3-Lösung wurde für 20 Minuten zentrifugiert (15000 x g, RT). 400 µl des Überstandes wurden abgenommen und die enthaltene Plasmid-DNA durch den Zusatz von 2,5 Vol Ethanol und 1/10 Vol 7M Ammoniumacetat präzipitiert. Nach 30minutige Inkubation bei -20 °C, oder 5 min bei -80 °C wurde die DNA durch Zentrifugation pelletiert (15000 x g, 20 Minuten). Der Niederschlag

wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 x TE oder bidestilliertem Wasser aufgenommen.

3.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Fünf µl der zu messenden DNA-Lösung wurden in 1 ml H₂O aufgenommen und die Konzentration durch Messung der OD₂₆₀ im Spektralphotometer (Quarzküvette, Schichtdicke 1 cm) bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml und bei einzelsträngiger DNA 40 µg/µl. Aus dieser Beziehung ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der Konzentration:

$$C = E \times (50 \mu\text{g/ml}) \div F$$

C = Konzentration (µg/µl)

E = Extinktion (gemessene OD₂₆₀ nach Referenzabgleich)

F = eingesetzte DNA-Lösung (5µl/ml)

Ein Maß für die Reinheit der DNA ist der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀, welcher bei allen Proben zusätzlich bestimmt wurde. Für proteinfreie DNA-Lösungen liegt der Wert zwischen 1,8 und 2,0; ein geringerer Wert deutet auf Verunreinigungen hin.

Geringe DNA-Mengen, z.B. PCR-Produkte wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel über ihre Fluoreszenz-Intensität unter UV-Licht durch Vergleich mit einem DNA-Standard (z.B. λ/*Hind*III) bekannter Konzentration quantifiziert (densitometrische Konzentrationsbestimmung)

3.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Doppelsträngige DNA wird von Restriktionsendonukleasen an sequenzspezifischen Erkennungsstellen geschnitten. Die Restriktion erfolgte unter den vom jeweiligen Lieferanten empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen. pro μg DNA wurde im allgemeinen mit 1,5 Einheiten des Enzymes für 3 h inkubiert.

3.4.1 Partieller Verdau genomischer DNA für Bank-Konstruktion

Wie im Abschnitt 3.2.2 beschrieben, wurde die isolierte genomische DNA in Agarose-Blöckchen verarbeitet, die dann in 0,5 M EDTA-Lösung bei 4°C aufbewahrt wurden. Vor dem partiellen Verdau der genomischen DNA wurde diese in einem Vorlauf durch Pulsfeldgelelektrophorese 5 sec, 120° Rotationswinkel, 80 V bei 11°C, für 10h aufgetrennt wobei die kurzen, durch Scherkräfte entstandenen DNA-Moleküle aus den Blöckchen entfernt werden sollten.

Nach diesem Vorlauf wurden die DNA-Blöckchen wieder aus den Geltaschen herausgelöst und erneut bis zur anschließenden Anwendung in 0,5 M EDTA-Lösung aufbewahrt.

Am Tag der Anwendung wurden die DNA-Blöckchen 3 x in 1xTE-Puffer bei 4°C je 30 min und anschließend 1 x in destilliertem Wasser für 10 min gewaschen, um das enthaltene EDTA, welches die anschließende Restriktionsspaltung hemmen würde, zu entfernen. Für den partiellen Verdau durch die Restriktionsenzyme *Bam*HI oder *Mbo*I wurden zunächst die Blöckchen in dem Restriktionspuffer für 1 h auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Zusatz unterschiedlicher Mengen Enzym: 0,56, 0,5, 0,4, 0,3, 0,1, 0 (Units/ μg DNA). Nach einer Inkubation auf Eis für 45 min wurde die Spaltungsreaktion für 30 min bei 37°C durchgeführt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 200 mM EDTA.

Die auf diese Art behandelte genomische DNA wurde unter geeigneten Bedingungen mittels Pulsfeldelektrophorese in einem Agarose-Gel aufgetrennt, der Bereich der gewünschten Länge aus dem Gel ausgeschnitten und die gespaltene DNA durch Elektroelution (Methode 3.14.2) aus dem Gel isoliert. Die erhaltene DNA-Lösung diente zur Ligation in den BAC-Vektor.

3.5 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren unterschiedlicher Länge sind aufgrund ihrer Größenunterschiede mittels Elektrophorese trennbar. Dies beruht auf der Tatsache, daß sich gelöste Moleküle in einem elektrischen Feld mit einer Geschwindigkeit bewegen, die vom Ladungs/Masse-Verhältnis der Moleküle abhängig ist.

Die Porengröße der Gele bestimmt die Lauf-Geschwindigkeit der aufzutrennenden Moleküle. Nukleinsäuren mit einem identischen Ladungs/Masse-Quotienten werden in Abhängigkeit von ihrer Kettenlänge getrennt, wobei kürzere Moleküle schneller durch die Gelporen wandern.

Die aufgetrennten Banden wurden mit Ethidiumbromid, welches zwischen den Basen der Nukleinsäuren interkaliert, angefärbt: sie erschienen im UV-Licht weiß fluoreszierend. Bei Agarosegelen wurde das Ethidiumbromid zumeist vor dem Gießen zugefügt (0,1 µg/ml), es war auch möglich, das Gel nach der Elektrophorese in einem Ethidiumbromidbad (500 µg/500 ml bidest. Wasser) zu färben.

Die Dokumentation der gefärbten Gele erfolgte auf den UV-Transilluminator mit einer Polaroidkamera.

3.6 Agarose Gelelektrophorese

3.6.1 Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA erfolgte in unterschiedlichen horizontalen Systemen, welche sich in der Gelgröße und somit in der Auftrennlänge unterschieden. Zur Auftrennung von PAC-DNA und genomische DNA dienten Gele der Größe 20 x 25 cm in Tris-Phosphat-Puffer. PCR-Produkte, Plasmid-Restriktionsspaltungen und für präparative Zwecke wurden Gele der Größe 10 x 10 cm und 7 x 10 cm sowie TBE-Puffer eingesetzt. Die angelegte Spannung betrug je nach Bedarf 30 bis 120 Volt, Elektrophoresen genomischer Spaltungen liefen bei 30 bis 40 Volt über Nacht. Vor dem Gelauftrag wurden die Proben mit 1/6 des Volumens Auftrag-Puffer versetzt.

Als Längenstandard dienten drei verschiedene Marker: 1 kb Leiter (MBI Fermentas), 100 bp Leiter (MBI Fermentas) und *Hind*III-geschnittene λ -DNA.

3.7 Transfer von DNA aus Agarosegelen (Southernblot)

Die Übertragung der mit Restriktionsenzymen gespaltenen und auf einem Agarosegel aufgetrennten DNA, auf einen Nitrocellulosefilter geschieht in einem Kapillarblot: mittels kapillarer Saugspannung wird aus einem unter dem Gel befindlichen Vorratsgefäß 20 x SSC nach oben durch das Gel und die darauf liegende Membran in die Blottingpapiere, auf denen zusätzlich noch ein Papierhandtuchstapel ruht, gezogen. Bei diesem Vorgang bleiben die Nukleinsäuren auf der Nitrocellulose-Membran hängen und können dort fixiert werden (Southern, 1975).

Konkret wurden die Gele nach der Elektrophorese passend geschnitten, die Längenstandards markiert und das Gel photographiert. Die DNA wurde depuriniert während das Gel für 20 Minuten in 250 mM HCl inkubiert. Diesem Schritt folgte die Denaturierung in Alkalisierungslösung (25 Minuten) und abschließend die Neutralisierung in Neutralisierungslösung (30 Minuten und länger). Über das Transferpuffergefäß wurde eine Glasplatte so gelegt, das ein darauf ruhendes, mit 20 x SSC befeuchtetes Blottingpapier beiderseits einheitlich in das Reservoir eintauchte und so eine Brücke bildete. Das Gel wurde aus dem Neutralisierungspuffer luftblasenfrei auf das Papier gelegt und die nicht abgedeckten Bereiche der Brücke mit Haushaltsfolie isoliert, so daß der Kapillarsog nur durch das Gel erfolgen konnte, welches nacheinander mit einer in bidest. Wasser getränkten Nitrocellulose-Membran und drei feuchten Blottingpapieren luftblasenfrei bedeckt wurde. Zur Erhöhung der Kapillarkraft wurden zwei Stapel Papierhandtücher zuoberst gelegt und mit 500 g beschwert. Die Dauer des Transfers betrug mindestens 12 Stunden. Nach dem Transfer wurden der Längenstandard sowie die Lage der Geltaschen markiert. Verbleibende Agarosereste entfernte eine kurze Spülung der Nitrocellulose-Membran in 2 x SSC, die im Anschluß luftgetrocknet sodann bei 80°C im Vakuumofen gebacken wurde.

3.8 Radioaktive DNA-Markierung mittels *Random-priming* Reaktion

In dieser Methode finden Nonamernukleotid-Zufallssequenzen Anwendung, welche an verschiedenen Stellen der denaturierten *template*-DNA anlagern und somit die DNA-Synthese initiieren können. Der entstandene Primer-*template*-Komplex bildet das Substrat des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I. Die Markierung der neusynthetisierten DNA geschieht durch den Einbau eines radioaktiv markierten Nukleotid-Äquivalentes, welches sich zu einem bestimmten Prozentsatz im Ansatz befindet (Feinberg und Vogelstein, 1983).

Der verwendete Kit enthielt die benötigten Puffer und Lösungen. Für die Reaktionen werden 25-50 ng *template*-DNA in 30 µl bidest. Wasser und 5 µl Primer-Lösung angesetzt. Nach der Denaturierung (95°C, 5 Minuten), kurzem Anzentrifugieren und Abkühlen auf Eis wurden 10 µl Labelling-Puffer, 3 µl (entspricht 30 µCi) [γ -³²P]-dCTP und 2 µl Klenow-Polymerase zugegeben. Die DNA-Synthese erfolgte durch Inkubation bei 37°C für 15 bis 30 Minuten. Durch den Zusatz von 5 µl 0,2 M EDTA pH 8,0 wurde die Reaktion abgebrochen. Die radioaktiv markierte Sonde wurde vor dem Gebrauch denaturiert (5 Minuten, 100°C).

3.9 Radioaktive Endmarkierung synthetischer Oligonukleotiden durch [γ -³²P]dATP

Die Endmarkierung eines synthetischen Oligonukleotids am 5'-Ende erfolgte durch das Enzym T4-Polynukleotid-Kinase. Das 5'-Ende des Oligonukleotids wurde mit der radioaktiv markierte Phosphatgruppe des [γ -³²P]dATP phosphoryliert.

Reaktionsansatz:

Oligonukleotid	25-50 ng
10x Polynukleotid-Kinase-Puffer:	1/10 Volumen
[γ - ³² P]dATP	50 µCi
T4-Polynukleotid-Kinase	10 U
Bidestilliertes Wasser:	ad 20 µl

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Vor dem Gebrauch wurde das radioaktiv markierte Oligonukleotid für 5 min bei 100 °C denaturiert.

3.10 Hybridisierung der Southernblots

Die unter dem Punkt 3.7 erstellten Filter inkubierten vor der Hybridisierung in 2 x SSC. Die feuchte Membran wurde, mit der Nukleinsäureseite nach innen orientiert, luftblasenfrei in einen Hybridisierungsroller überführt und dort mit 10 ml 65°C warmer Hybridisierungslösung und 500 µl denaturierter Heringsspermien-DNA versetzt. Die Prähybridisierungszeit im Rollerschrank betrug mindestens drei Stunden bei 55-65°C und 10 rpm. Die unter 3.8 vorbereitete, radioaktiv markierte Probe wurde nach der Denaturierung zugesetzt. Die Hybridisierung vollzog sich über Nacht (mindestens 10 Stunden) unter den selben Bedingungen wie die Prähybridisierung. Nach der Hybridisierung wurde der radioaktive Hybridisierungspuffer ausgegossen, die Membran in 2 x SSC mit 0,1% SDS bei Hybridisierungstemperatur im Schüttelbad gewaschen. Dieser Waschschrift wurde zwei bis dreimal wiederholt bis im Waschpuffer keine Aktivität nachweisbar war. Eine Erhöhung der Stringenz war durch abnehmende Salzkonzentration im Waschpuffer bis auf 0,1 x SSC oder Erhöhung der Waschtemperatur möglich. Die feuchte Membran wurde in Haushaltsfolie eingeschlagen und autoradiographiert.

Dehybridisierung der Southernblots erfolgte in 0,1%ige SDS-Lösung, welche aufgekocht und auf die Blots gegeben wurde. Inkubation wurde im Schüttelbad bei 60 bis 70 °C und der Vorgang wurde wiederholt bis keine Radioaktivität mehr auf dem Blot mit dem Handmonitor zu messen war.

3.11 Autoradiographie

Die im vorhergehenden Schritt in Haushaltsfolie eingeschlagenen Membrane wurden, in der Dunkelkammer unter Rotlicht in eine Autoradiographiekassette mit zwei Verstärkerfolien gelegt und mit einem Röntgenfilm bedeckt. In Abhängigkeit von der Strahlungsintensität exponierte die Probe für einige Stunden bis zu zwei Wochen bei -70°C. Die Filme wurden zur Entwicklung bis zur erkennbaren Schwärzung des Röntgenfilmes in Entwickler getaucht und

sodann fixiert. Im Anschluß wurde der Film im fließenden Leitungswasser gespült und getrocknet.

3.12 Bakterien-Kolonie-Screening erstellter Subbanken

Von einigen PAC-Klonen, an denen besonderes Interesse bestand, wurden durch Subklonierung der *Bam*HI-Restriktionsfragmente kleine Subbanken erstellt. Die Suche nach bestimmten Subklonen wurde auf der Basis des Bakterien-Kolonie-screenings durchgeführt. Die Bakterien-Suspension wurde auf mehrere Platten (welche das benötigte Antibiotikum enthielten) ausplattiert, wobei der Titer so gewählt wurde, das ca. 2000 Kolonien pro Platte wachsen sollten. Die Kolonie-tragenden Platten wurden erst für mindestens 1 h bei 4 °C abgekühlt, anschließend luftblasenfrei für 1 min mit einem sterilen runden Nitrocellulosefilter von ca. 8 cm Durchmesser bedeckt und Filter sowie Platte asymmetrisch markiert. Ein zweiter Filter (*Replica-Filter*), der zur Überprüfung der positiven Signale eingesetzt wurde, inkubierte für 2 min auf der Bakterienplatte. Die Filter wurden vorsichtig abgenommen und mit der Abdruck-Seite nach oben luftgetrocknet. Die Platten wurden sodann für 5-7 h bei 37 °C inkubiert um das Nachwachsen der Bakterien-Kolonien zu beschleunigen.

Die erhaltenen Filter wurden zunächst, mit der Bakterienseite nach oben, für 3 min auf 10% SDS-getränktem Whatman-Papier inkubiert. Diese Behandlung reduzierte die Diffusion der Plasmid-DNA während der folgenden Denaturierung und Neutralisierung und resultierte in einem schärferen Hybridisierungs-Signal. Anschließend wurden die Filter für 5 min auf denaturierungslösungsgetränktes Whatman-Papier und dann nochmals 5 min auf neutralisierungslösungsgetränktes Whatman-Papier gelegt. Zuletzt wurden die Nitrocellulosefilter 5 min in 2 x SSC gewaschen, wobei noch vorhandene Bakterien-Reste mit weichem Papier von dem Filter abgewischt wurden, da diese bei der Hybridisierung einen starken Hintergrund ergeben könnten. Die Hybridisierung der Filter zur Identifizierung der gesuchten positiven Klone wurde wie unter 3.10 und 3.11 beschrieben durchgeführt. Die Signale auf dem Röntgenfilm, die sich während der Hybridisierung ergaben, wurden anhand der asymmetrischen Markierung der Platte und des Filters der positiven Kolonie zugeordnet. Derart als positiv identifizierte Klone wurden von der Platte gepickt und zur Gewinnung weiteren Materials in LB-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum hochgezogen.

3.13 Erstellung von DNA *dot blots*

Durch das *Screening* der genomischen Bank mit einer bestimmten Hybridisierungsprobe wurden positive Klone erhalten. Um ein schnelles Vorscreening dieser Klone zu ermöglichen, vor der Durchführung der aufwendigeren *Southern-Blotanalyse* wurden DNA *dot blots* erstellt.

Dazu wurden Nitrocellulosestreifen ausgeschnitten und entsprechend beschriftet und im Anschluß in separat markierten Kästchen 1-2 µl (ca. 30-50 ng) DNA aus einer *low copy-Plasmid-Präparation* aufgetropft. Nach dem Trocknen der Nitrocellulose wurden die Filter wie unter 3.12 beschrieben behandelt.

3.14. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen

3.14.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mittels JETQUICK *spin columns*

Im UV-Durchlicht wurde die zu isolierende Bande mit einem sauberen Skalpell möglichst knapp ausgeschnitten und in einem E-cup ausgewogen. Die Isolierung der DNA aus dem Agarose-Stück wurde nach dem empfohlenen Protokoll durchgeführt. Hierzu wurde die Agarose durch den Zusatz von 3 Vol (w/v) L1-Puffer und Inkubation bei 50 °C (ca. 15 min) aufgelöst und auf eine Extraktionssäule gegeben. Nach der Abzentrifugation des Durchlaufs (1 min, 14000 g) wurde die Säule mit 0,7 ml L2-Puffer gefüllt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert (1 min, 14000 g). Nach dem Verwerfen des Durchlaufes folgte eine erneute Zentrifugation (1 min, 14000 g) um den ethanolhaltigen Waschpuffer vollständig zu entfernen. Die DNA eluierte durch den Auftrag von 30 µl Bidest-Wasser, das vor der abschließenden Zentrifugation (2 min, 14000 g) eine Minute auf der Säule stand. Die Ausbeute konnte durch die Verwendung von bidest. Wasser, welches auf 65-70°C erhitzt war, gesteigert werden.

3.14.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen durch Elektroelution

Die gewünschte DNA Bande wurde aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in einen, an einem Ende mit einer Klammer abgedichteten Dialyseschlauch eingeführt und darin mit 1 bis 2 ml TE-Puffer versetzt, worauf der Schlauch mit einer zweiten Klammer vorsichtig luftblasenfrei verschlossen wurde. Er wurde in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gelegt; durch die angelegte Spannung wurden die DANN-Moleküle aus dem Agarosestück eluiert. Nach ca. 2ständigem Lauf wurde der TBE-Puffer, welcher nun die DNA enthielt, vorsichtig dem Schlauch entommen.

3.15 Dephosphorylierung freier 5'-Enden

Die Phosphatgruppe an dem 5'-Ende linearisierter dsDNA kann durch das Enzym alkalische Phosphatase entfernt werden. Linearisierte Plasmide werden so zur Erhöhung der Effizienz anschließender Ligationen dephosphoryliert, da dadurch das Religieren des Vektors ohne Aufnahme des zu inserierenden DNA-Fragmentes vermieden werden kann.

Der linearisierte Vektor wurde mit 2,5 Volumen 99% Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, und das getrocknete Pellet wurde in 1 x TE aufgenommen. 2 U alkalische Phosphatase und 1/10 Volumen Reaktionspuffer wurden dazu pipettiert und der Ansatz bei 37°C für 30 min inkubiert. Nach der Dephosphorylierungsreaktion wurde der Ansatz in ein präparatives Agarosegel geladen, nach dem Lauf die DNA-Bande, die der Länge des linearisierten Vektors entsprach, ausgeschnitten und nach einer der erwähnten Geextraktionsmethoden aus dem Gel eluiert.

3.16 Ligation von DNA Enden

Die aus dem Agarosegel eluierten DNA-Fragmente wurden in den BAC-Vektor ligiert. Die zu klonierenden Fragmente wurden in einem drei- bis fünffachen molaren Überschuß zum Vektorfragment gegeben. Zur Ligrationsreaktion wurden 1 U T4-DNA Ligase und

Reaktionspuffer hinzugefügt. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 14°C über Nacht durchgeführt.

Bei dem Ligationsansatz zur Bank-Konstruktion wurden Vektor und Insert in einem molaren Verhältnis von 10:1 eingesetzt. Es wurden generell Ansätze mit verschiedenen Mengen an eingesetzter DNA hergestellt, um die benötigte Konzentration Insert-DNA für optimale Ligationsergebnisse zu bestimmen. Zusätzlich wurde dem Ligationsansatz 1/60 Volumen 10 x PA-Lösung (Mischung aus Spermin und Spermidin) zugegeben. Das Gesamtvolumen variierte zwischen 50 und 120 µl. Die Ligationsreaktion wurde bei 16°C über Nacht durchgeführt. Es folgte eine Mikrodialyse des Ligationsansatzes in 0,5 x TE, 1 x PA für 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend folgte eine Elektroporation des dialysierten Ligationsansatzes in den *E.coli*-Stamm DH10B.

3.17 Nukleotidsequenzanalyse doppelsträngiger DNA

Nukleotidsequenzanalysen wurden nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Die hier verwendete Methode war die Cycle-Sequenzierung, eine Variante der enzymatischen Sanger-Sequenzierung, bei der eine hitzestabile Polymerase verwendet wurde, um das eingesetzte DNA-Template in wiederholten Zyklen von Denaturierung, Primerannealing und Elongation mehrfach zu nutzen.

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA wurde mit dem BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit durchgeführt und zur Analyse der Genetic Analyser der Firma PE Applied Biosystems, Modell 310 eingesetzt. Das Sequenzierungs-Kit enthielt außer den mit verschiedenartigen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs auch dNTPs, MgCl₂ sowie ein AmpliTaq DNA Polymerase/thermostabile Pyrophosphatase-Gemisch. Die am Ende der Reaktion vorliegenden DNA-Stränge waren am 3'-Ende basenspezifisch Farbstoffmarkiert und wurden im genetic Analyser in einer Glaskapillare aufgetrennt. Die durch Laserstrahlung angeregten Fluoreszenzfarbstoffe emittierten Licht einer für jeden Farbstoff spezifischen Wellenlänge welche vom Gerät detektiert und ausgewertet wurde.

Für eine Sequenzierung wurden 0,5 bis 1,0 µg DNA, 5 pmol Primer, 4 bis 8 µl Terminations-Mix mit bidest. Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und in einem PCR-Gefäß pipettiert mit Paraffinöl überschichtet. Die Reaktion fand nach dem im folgenden aufgeführten Programm statt: Denaturierung bei 96 °C für 30 sec, Annealing bei 50 °C für 15

Sekunden, Elongation bei 60 °C für vier Minuten bei einer Zyklenzahl von 24. Bei Sequenzierung von Plasmid DNA wurde der erste Denaturierungsschritt auf 3 bis 5 min verlängert. Die DNA wurde aus der fertigen Reaktion mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 2,5 Volumen 100% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl Template Suppression Reagent (TSR) oder 13 µl Formamid aufgenommen. Nach einer Denaturierung (5 Minuten, 95 °C) und schnellen Abkühlung auf Eis konnten die Proben in speziellen Gefäßen überführt und auf den ABI 310 Genetic Analyser geladen werden.

3.18. End-Sequenzierung der PAC-Klone durch inverse PCR

Die Bestimmung der End-Sequenz des inserierten Fragments eines PAC-Klones wurde zur Erstellung von *walking*-Proben benötigt, welche die vollständigen Kartierung lückenhafter Regionen ermöglichten. Ca. 150 ng einer Mini-DNA-Präparation des PAC-Klones wurden mit dem Enzym *PstI* gespalten. Der Klonierungs-Vektor enthielt 5 *PstI* Schnittstellen, deren genaue Position der Abbildung 6 zu entnehmen ist. Da die *PstI*-Schnittstelle im eukaryotischen Genom häufig vorkommt wird auch die inserierte DNA mehrfach gespalten. Durch diese Restriktionsspaltung entsteht also eine große Zahl an *PstI*-Fragmenten. Diese sind entweder nur Vektor-Fragmente oder Fragmente, die aus der Insert-DNA hervorgegangen sind oder gemischte Fragmente, die einen kleinen Teil des Vektors mit den jeweiligen Ende der inserierten DNA. An den flankierenden *PstI*-Fragmenten des Vektors (Abb. 6) wurden folgende Primer-Paare definiert: Das Primer-Paar pPAC4-3, pPAC4-4 (auf der Abbildung mit 3,4 abgekürzt) sowie das Primer-Paar pPAC4-5, pPAC4-6 (mit 5,6 abgekürzt). Für die Religation über Nacht die in einem Gesamtvolumen von 40 µl stattfand, wurde der gesamte Spaltungsansatz (10 µl) verwendet. Nach Ablauf dieser Reaktion wurde mit jeweils 5µl des Religationsansatzes eine PCR durchgeführt, in welcher entweder das Primer-Paar 3, 4 oder das Primer-Paar 5, 6 eingesetzt wurde. Die Elongationszeit betrug 4 min. Die Ansätze wurden auf ein Gel aufgetragen und ein evtl. entstandenes PCR-Produkt aus diesem extrahiert und zur Sequenzierung eingesetzt.

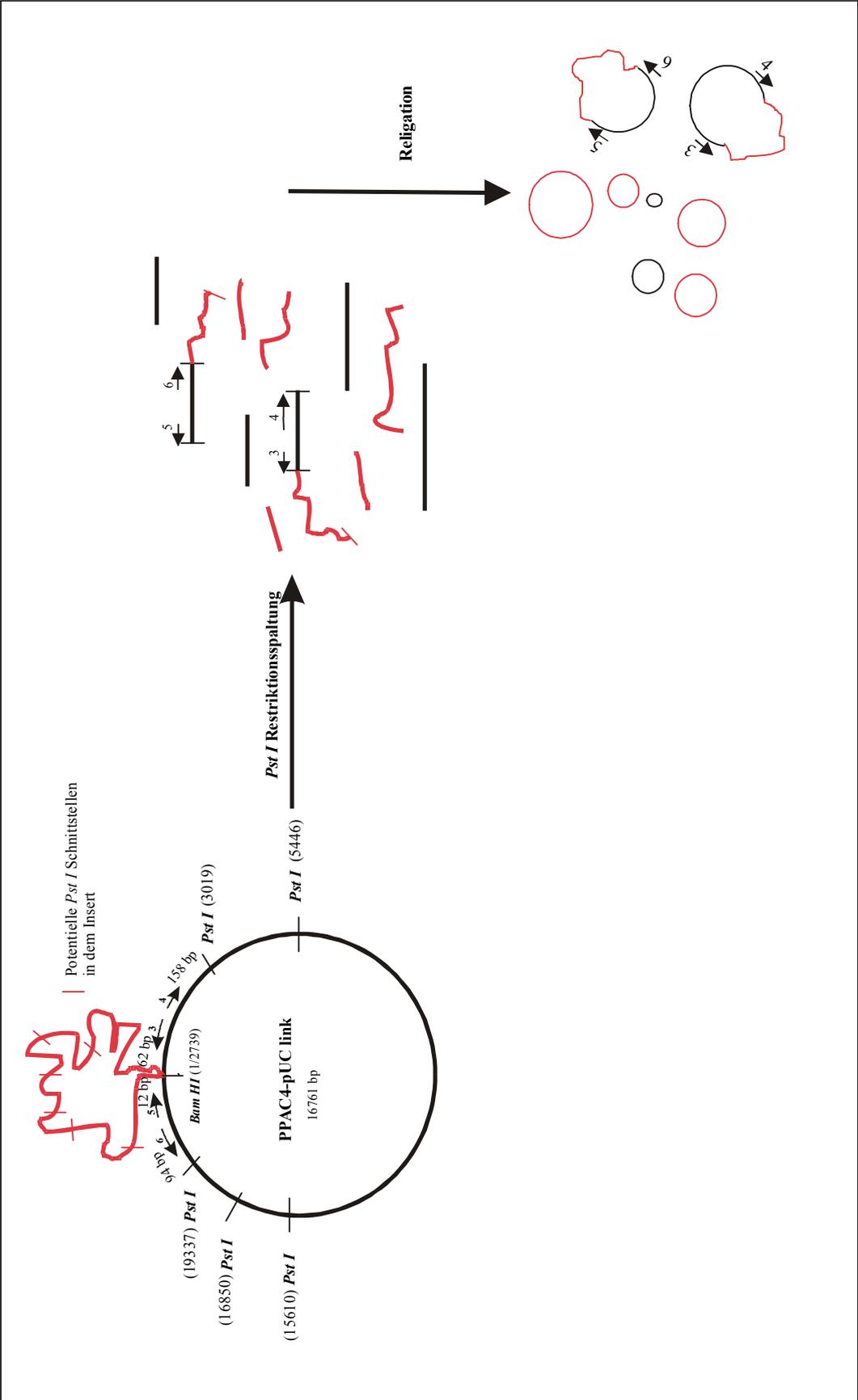


Abb. 6: Schematische Darstellung des Vorgehens zur End-Sequenzierung der PAC-Klone. Nach *Pst I*-Spaltung wurden die erhaltenen Fragmente religiert. Die Religationsprodukte, die die Enden des inserierten Fragmentes tragen, wurden per PCR identifiziert und die PCR-Produkte mit den Vektor-Primern ansequenziert.

3.19 Reverse Transkription (RT)

Als reverse Transkription wird die enzymatische Synthese von cDNA mit RNA als *template* bezeichnet. Angewandt wurde die „*oligo (dT)-primed*“ reverse Transkription mit einem Oligo(dT)-Primer, welcher sich Poly(A)⁺mRNA anlagert und deren reversen Transkription ermöglicht.

Für einen Reaktionsansatz der „*oligo(dT)-primed*“ reversen Transkription wurden 5 µg totale RNA, 10 µl 5 x Erststrangpuffer (im Kit enthalten), 25 pmol Oligo(dT)-Primer, 1 µl 10 mM dNTP, 10 U RNasin (inhibiert RNasen) mit bidest. Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt und vor der Zugabe von 200 U MMLV Reverser Transkriptase zur Denaturierung der RNA-Sekundärstrukturen und zur Ausbildung des Primer/*template*-Komplexes fünf Minuten im Wasserbad bei 65°C inkubiert und im Eisbad abgekühlt. Die reverse Transkription erfolgte bei 37°C im Verlauf von 2 Stunden. Anschließend wurde die reverse Transkriptase durch 5minütige Inkubation bei 70°C hitzeinaktiviert. 2 µl dieses Reaktionsansatzes wurden nachfolgend in einer PCR (Vol 50 µl) eingesetzt.

3.20 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die *in vitro*-Amplifikation von DNA-Sequenzen. Die Amplifikation der DNA vollzieht sich in mehreren Reaktionszyklen, welche aus drei Schritten bestehen. Im ersten werden die DNA-Doppelstränge durch Erhitzen voneinander getrennt (Denaturierung). Anschließend erfolgt die Abkühlung auf eine Temperatur von 50 °C bis 65 °C, bei der sich die den 5'- und 3'- Enden der cDNA komplementären Oligonukleotide spezifisch ihrer Zielsequenz anlagern (Annealing). Im dritten Schritt erfolgt die Verlängerung der hybridisierten Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase bei 72°C (Elongation).

Die Annealing-Temperatur von Primern, deren Länge 17 -25 bp beträgt, ergibt sich aus der Schmelztemperatur, die anhand folgender Formel berechnet wird:

$$T_m = (C + G) \times 4 + (A + T) \times 2$$

Die Elongationszeit ist von der Länge der zu amplifizierenden DNA abhängig und beträgt zumeist eine Minute pro 1000 bp.

Die Reaktion wurde im allgemeinen mit 50 - 500 ng der zu amplifizierenden DNA und jeweils 25 pmol an PCR-Primern, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 5 µl Taq-Polymerasepuffer, und 1 U Taq-DNA-Polymerase in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Der Ansatz wurde mit Paraffinöl überschichtet, um Verdunstung zu vermeiden. Die PCR-Produkte wurden zur Reinigung einer Gelelektrophorese mit sich anschließender DNA-Präparation unterzogen.

3.21 3'RACE (rapid amplification of cDNA ends)

Die 3'RACE dient der Generierung von cDNA mittels reverser Transkription, die Amplifikation spezifischer Bereiche erfolgt in den sich anschließenden PCR-Reaktionen. Es können Sektionen amplifiziert werden, die sich zwischen einem bekannten Abschnitt einer mRNA und deren 3'Ende befinden. Die Transkription durch die reverse Transkriptase erfolgt nach dem Annealing eines Oligo(dT)-Adaptor-Primers. In der darauf folgenden PCR verwendet wird ein Adaptor-Primer und ein spezifischer Primer (*seminested* PCR) verwendet. Zur Erhöhung der Spezifität wird in einer zweiten Amplifikation ein dem 3'-Ende näher gelegener (*nested*), spezifischer Primer und ebenfalls der Adaptor-Primer verwendet (Frohman *et al.*, 1988).

Die reverse Transkription wurde wie unter 3.19 beschrieben durchgeführt. Dieser cDNA wurden 2 µl entommen und in die erste PCR der 3'RACE eingesetzt, die außerdem 5 µl 10 x PCR-Puffer inklusiv MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP, 25 pmol Adaptor-Primer, 25 pmol des spezifischen Primers, 1 U Taq-DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielt. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis angesetzt, mit Paraffinöl überschichtet und im Thermocycler unter spezifischen Bedingungen inkubiert. 2 µl des ersten PCR-Produkt dienten als *template* in einer zweiten PCR, die sich nur in der Verwendung des *nested* gelegenen Primer von der ersten unterschied.

3.22 Long range-PCR

Das „Expand™ Long Template“-PCR-System, das einen Enzym-Mix enthält, der sich aus den thermostabilen DNA-Polymerasen Taq und Pwo zusammensetzt, wird zur Herstellung sehr langer Amplifikate eingesetzt. Das System ist mit drei verschiedenen Puffersystemen erhältlich, die in Abhängigkeit von der zu amplifizierenden Länge angewandt werden. Zur Amplifikation genomischer Sequenzen an PAC-Klonen, der Größenordnung nicht abschätzbar war, wurde das Puffersystem 3, mit dem die Generierung von 15 kb messenden PCR-Produkten gelingt, verwendet.

Der PCR-Ansatz wurde zunächst als Pool 1 + 2 in getrennten PCR-Gefäßen auf Eis angesetzt. Pool 1 enthielt 2,5 µl 10 mM dNTP, 25 pmol 3'-Primer, 25 pmol 5'-Primer sowie 10 ng PAC-DNA in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Pool 2 bestand aus 5 µl Puffer 3 und 0,75 µl Enzym-Mix und in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Die vereinigten und gut durchmischten Pools wurden mit Paraffinöl überschichtet und sofort dem folgenden PCR-Protokoll unterworfen:

Anzahl	Zeit	Temperatur	Schritt
1 x	2 min	94°C	Denaturierung
10 x	10 sec	94°C	Denaturierung
	30 sec	65°C	Annealing
	8 min	68°C	Elongation
20 x	10 sec	94°C	Denaturierung
	30 sec	65°C	Annealing
	8min	68°C	Elongation
	+ 20 sec Verlängerung pro Zyklus		
1 x	7 min	68°C	Elongation

3.23 Klonierung von PCR-Produkten

Der TA-Cloning® Kit erlaubt die schnelle 1-Schritt-Klonierung von PCR-Produkten in einen Plasmid-Vektor. Diese Methode nutzt den Effekt, daß die Taq-DNA-Polymerase einzelne

Desoxyadenosine an die 3'-Enden der entstandenen PCR-Produkte anhängt. Der im Kit enthaltene linearisierte Vektor pCR2.1 weist an den 3'-Enden einzelne Desoxythymidin-Reste auf, welche eine effiziente Ligation des Inserts gestatten.

Der Ligationsansatz setzte sich aus 2 µl frisch hergestelltem PCR-Produkt, 1 µl 10 x Ligationspuffer, 2 µl pCR2.1 Vektor (50 ng), 1 µl T4-DNA-Ligase (4 Weiss Units) und bidest. Wasser mit einem Gesamtvolumen von 10 µl zusammen und wurde über Nacht bei 14°C im Wasserbad inkubiert. Die im Kit enthaltenen kompetenten Zellen wurden zur Transformation genutzt, indem sie auf Eis aufgetaut, mit 2 µl β-Mercaptoethanol und 2 µl Ligationsansatz versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Nach dem Hitzeschock (42°C, 30 Sekunden) und 2minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 450 µl SOC-Medium versetzt. Die anschließende Inkubation für eine Stunde bei 37°C und 75 rpm diente der Expression der Plasmid-kodierten Antibiotikaresistenz. Es wurden jeweils pro Transformationsansatz 100 und 400 µl auf selektive Platten ausgestrichen. Die Insertion in die *multi cloning site* zerstört das Leseraster der β-Galaktosidase, die ein blau/weiß-assay ermöglichte. Dieses Enzym setzt das in den Platten enthaltene X-Gal, welches farblos ist, in einen blauen Farbstoff um: eine erfolgte Insertion gibt sich demnach durch eine farblose Kolonie zu erkennen.

3.24 Screening einer PAC-Bank

Die im Abschnitt 2.15 beschriebene, vom Ressourcen Zentrum des Deutschen Humangenomprojekt (RZPD) zur Verfügung gestellte Ratten-PAC-Bank wurde mit mehreren spezifischen Proben gescreent.

Die Nylon-Membranen wurden, wie in Kapitel 3.10 beschrieben, unter Verwendung eines speziellen Hybridisierungspuffer bei 65°C hybridisiert. Im Anschluß an die Hybridisierung wurde der Filter in 40 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2, welcher 0,1% SDS enthielt, zweimal bei 65°C für jeweils 30 Minuten gewaschen. Die Filter wurden in Haushaltsfolie eingewickelt und eine Autoradiographie (Kapitel 3.11) über 24 h durchgeführt.

Die Klone waren als Duplikate auf dem Filter aufgetragen, so dass die Auswertung der Filter folgendermaßen geschah: Zunächst wurden die x-y-Koordinaten jedes Blocks mit positiven Signalen lokalisiert, sodann wurde gemäß eines vom RZPD mitgelieferten Schemas die Position des positiven Signals innerhalb des Blocks bestimmt, wobei nur bestimmte Hybridisierungsmuster auftreten konnten. Die exakte Position der positiven Klone innerhalb des Blocks wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\begin{aligned}x &= 5(X - 1) + x' \\y &= 5(Y - 1) + y'\end{aligned}$$

- 5 = 5 x 5 Block
X, Y = Koordinaten des Blocks auf dem Filter
x', y' = Koordinaten von jedem Klon innerhalb des Blocks
x, y = Endkoordinaten des Klons

Die Koordinaten wurden dann dem RZPD übermittelt, das die positiven Klone zuschickte.

3.25 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen

Elektrokompetente Zellen des Stammes DH10B wurden zum einen für die Generierung einer genomischen Bank der Ratte hergestellt, sie dienten aber auch für alle weiteren Transformationen. Sechs 500 ml Flaschen sowie eine 1 l Flasche wurden mit bidest. Wasser autoklaviert, wonach das Wasser vollständig ausgegossen wurde. Diese Vorbehandlung diente dem Entfernen von Ionen, welche möglicherweise an den Wänden der Glasgefäße hafteten. In die 500-ml-Flaschen wurden jeweils 100 ml SOB-Medium ohne Mg^{2+} gegeben, in der 1 l Flasche wurde 10% Glycerin angesetzt und anschließend autoklaviert. In einem 50-ml-Falconröhrchen, welches 5 ml LB-Medium ohne Antibiotikum enthielt, wurde eine Vorkultur der DH10B-Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 160 rpm geschüttelt. Aus dieser Vorkultur wurden am nächsten Morgen die vorbereiteten Medien mit jeweils 100 µl (1:1000 Verdünnung) angeimpft. Nach 3 bis 4 h Wachstum bei 37°C wurde die OD bei 550 nm bestimmt und das Wachstum überwacht, bis die optische Dichte in jeder einzelnen Kultur

eine von OD_{550} von 0,7 bis 0,75 erreicht hatte. Auf keinen Fall durfte die $OD_{550} > 0,8$ sein. Nach dem Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurden die Zellen auf Eis gestellt und im folgenden ausschließlich auf Eiswasser gearbeitet. Nach dem Verteilen der Kulturen auf 50-ml-Falcon Röhren folgte die Ernte der Zellen durch Zentrifugation bei 4000 rpm, 4°C für 10 min. Nach dem Abgiessen des Überstandes wurde in jedes Röhren 1 ml der 10%-Glycerinlösung gegeben, darin das Pellet resuspendiert und anschließend jeweils bis 30 ml mit 10% Glycerin aufgefüllt. Nach dem Zentrifugieren (4000 rpm, 4°C, 10 min) wurde der Waschvorgang mit 25 bis 30 ml 10% Glycerin noch zwei mal wiederholt. Nach dem letzten Waschen wurde der Überstand dekantiert, das Pellet in dem Rest Glycerin resuspendiert, und die gesamten Zellen in einem Falconröhren gesammelt. Die Zellen wurden erneut wie beschrieben abzentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und das Zellpellet mit 10% Glycerin versetzt (195 μ l/100 ml Ausgangskultur). Die resuspendierten Zellen wurden in vorgekühlten Eppendorfcups zu je 25 μ l aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sie konnten so über einen längeren Zeitraum bei -70 °C aufbewahrt werden. Von großer Wichtigkeit bei der Erstellung von Banken ist die möglichst hohe Transformationseffizienz der elektrokompenten Zellen, die aus diesem Grund vor Anwendung der Zellen überprüft wurde.

Dazu wurde eine 2-mm-Elektroporationsküvette auf Eis vorgekühlt und ein Reaktionsgefäß mit elektrokompenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 μ l einer pUC19-DANN-Stocklösung (0,01 μ g/ml) versetzt und der Ansatz in die Elektroporationsküvette überführt. Die Transformation erfolgte in einem Elektroporationsgerät bei 1800 V für 7,5 msec. Zehn μ l der elektroporierten Zellen wurden in 1 ml SOC Medium, das Raumtemperatur hatte, überführt und für 1 h bei 37°C mit 160 rpm geschüttelt. Danach wurden die transformierten Zellen 1:100 mit SOC-Medium verdünnt und 100 μ l dieser Verdünnung auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Die über Nacht bei 37 °C auf der Platte gewachsenen Kolonien wurden gezählt. Die Transformationseffizienz wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{CFU auf Kontrollplatte}}{\text{pUC (verwendet für die Transformation)}} \times (1 \times 10^6) \times \text{Verdünnungsfaktor} \quad [\text{CFU}/\mu\text{g}]$$

3.26 Elektroporation

Für jeweils eine Elektroporation wurden 1 bis 3 μl der dialysierten Ligationslösung verwendet. Aliquots (20 bis 25 μl) der elektrokompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und anschließend in eine sterile, bei 4°C vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Das Vorkühlen der Küvette kann eine 10fache Erhöhung der Transformationseffizienz bewirken (Miller *et al.*, 1988). Anschließend erfolgte der Zusatz der Ligationslösung, welcher durch antippen der Küvette in der Zellsuspension verteilt wurde, wobei die Bildung von Luftblasen in dem Gemisch vermieden werden sollte. Unmittelbar danach wurde die Küvette in den Elektroporations-Impulsgenerator eingesetzt und die Elektroporation durchgeführt. Studien zur Elektroporation langer DNA in Bakterienzellen zeigten, daß bei Transformationen dieser Art eine gleiche Transformationseffizienz erreicht werden kann, wenn sie entweder bei hoher Feldstärke und kurzer Impulsdauer oder bei schwacher Feldstärke und langer Impulsdauer durchgeführt wurden. Die hier beschriebenen Experimente zur Bank-Konstruktion wurden bei starkem elektrischen Feld und kurzer Impulsdauer durchgeführt (2500 V (12,5 kV/cm) für 2,4 msec.) Nach der Elektroporation wurde der Ansatz sofort in 500 μl angewärmtes (RT) SOC-Medium transferiert und bei 37 °C für 45 min inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt auf LB-Platten aufgetragen, welche 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol, 50 $\mu\text{g/ml}$ X-Gal und 25 $\mu\text{g/ml}$ IPTG enthielten. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die weißen, Insert-enthaltenden und blauen, insertfreien Kolonien gezählt. Die positiven Kolonien wurden in LB-Chloramphenicol-Medium aufgenommen. Diese Bakterien-Lösungen wurden als Glycerin-Kulturen bei -70 °C aufbewahrt.

4. Ergebnisse

4.1. Konstruktion einer genomischen Bank aus der LEW.1W/Gun Ratte (RT1^u Haplotyp)

Zur Kartierung, positionellen Klonierung und für ausgedehnte Sequenzierungsarbeiten von komplexen Genomen ist die Verfügbarkeit von kompletten rekombinanten DNA-Banken erforderlich. YAC-Banken (*yeast artificial chromosome*), die lange Insert-Fragmente tragen, sind für die physikalische Kartierung großer Genombereiche geeignet. Die YAC-Klone sind jedoch oft instabil, und außerdem ist es schwierig, ausreichende Mengen an DNA aus YAC-Klonen für die Erstellung von Subbanken dieser Klone zu isolieren. Die in den letzten Jahren erstellten BAC- (*bacterial artificial chromosome*) (Shizuya *et al.*, 1992) und PAC-Banken (*P1-derived artificial chromosome*) (Ioannou *et al.*, 1994) bieten eine günstige Alternative zur Kartierung und Sequenzierung von Säugergenomen, denn diese bakteriellen Klone tragen zwar kürzere Insert-Fragmente als die YAC-Klone, sind aber relativ stabil und die rekombinante DNA kann einfacher isoliert werden.

Über die Konstruktion und Analyse mehrerer BAC- und PAC-Banken sind in den letzten Jahren publikationen erschienen, z.B. humane BAC-Banken (Shizuya *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1994), *Sorgum bicolor*- (Woo *et al.*, 1994), Reis- (Wang *et al.*,) und bovine BAC-Bank (Li Cai *et al.*, 1995) oder eine PAC-Bank der Maus (Pierce *et al.*, 1992).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine genomische BAC-Bank aus dem Genom des Inzuchtstammes LEW.1W/Gun (RT1^u-Haplotyp) der Ratte zu konstruieren.

Genomische DNA wurde aus der Milz bzw. aus den Lymphozyten isoliert, in *low-melting-point* Agarose-Blöckchen verarbeitet (s. 3.2.2) und bis zur Verwendung in 0,5 M EDTA bei 4°C aufbewahrt.

Als Klonierungsvektor zur Bankkonstruktion wurde der pBeloBAC11-Vektor verwendet (s. 2.2), der in 1 bis 2 Kopien pro *E.coli*-Zelle vorkommt. Dadurch kommt es seltener zu Rearrangements der inserierten DNA, ein wichtiger Aspekt bei der Konstruktion einer Bank aus einem Eukaryonten-Genom, welches eine große Zahl an repetitiven Elementen enthält, die Rearrangements begünstigen.

Zu beachten war ebenfalls die Qualität des präparierten Plasmids. In einer Bakterienzelle liegen eine bis zwei Kopien des Vektors vor; somit ist die Menge an isolierbarer Plasmid-DNA gering, und es müssen größere Mengen an Bakterienkulturen verwendet werden, um für die Experimente ausreichend Vektor-DNA zu erhalten. Dieses hat zu Folge, daß es schwierig ist, DNA des isolierten Plasmids in hoher Reinheit zu erhalten, denn Kontaminationen mit *E.coli*-DNA waren nicht auszuschließen, da diese 99% des totalen DNA-Gehaltes ausmacht. Aus 500 ml Bakterienkultur konnten einige μg DNA des reinen Vektors erhalten werden. Grundsätzlich wurde die durch Restriktionsspaltung linearisierte Plasmid-DNA nach Dephosphorylierung und elektrophoretischer Trennung aus dem Agarose-Gel eluiert. Auf diese Weise wurden bei der Bank-Konstruktion Religationen des Vektors ohne aufgenommene Inserts, die Bildung von Concatameren des Vektors oder die Anwesenheit nicht linearisierter Moleküle auf das Minimum reduziert. Folglich betrug der Hintergrund an Kolonien ohne inserierte DNA nur 3% bezogen auf die Gesamtanzahl der die Bank darstellenden Kolonien.

Als Klonierungsstelle wurde die *Bam*HI Restriktionsstelle aus dem Klonierungssegment des Vektors verwendet.

Die isolierte genomische DNA wurde entweder mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI oder *Mbo*I partiell gespalten (s. 3.4.1) und zur Ligation in den Klonierungsvektor eingesetzt. Mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde ein Vorlauf durchgeführt, um kurze durch Scherkräfte entstandene DNA-Fragmente zu entfernen (Abb. 7).

Die Abbildung 8 zeigt repräsentativ einen Lauf partiell gespaltener genomischer DNA in einem PFGE-Gel nach Färbung mit EtBr. Aus dem Gel wurde vor der Färbung anhand des Markers (λ -Leiter) die Region, die eine Länge zwischen 100 bis 150 kb aufwies, ausgeschnitten. Aus den ausgeschnittenen Gelstücken wurde die darin enthaltene DNA durch Elektroelution isoliert und für die Ligation in den Klonierungsvektor verwendet.

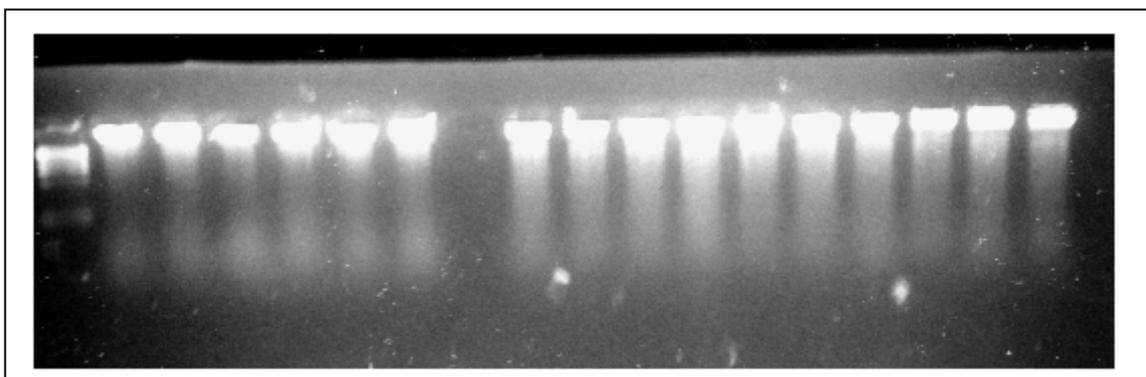


Abb. 7: Pulsfeldgelelektrophorese des Vorlaufs der in Blöckchen verarbeiteten genomischen DNA.
Die Lauf-Bedingungen waren 80V, Rotationswinkel 120°, Pulsdauer 5 sec und 11°C Temperatur.

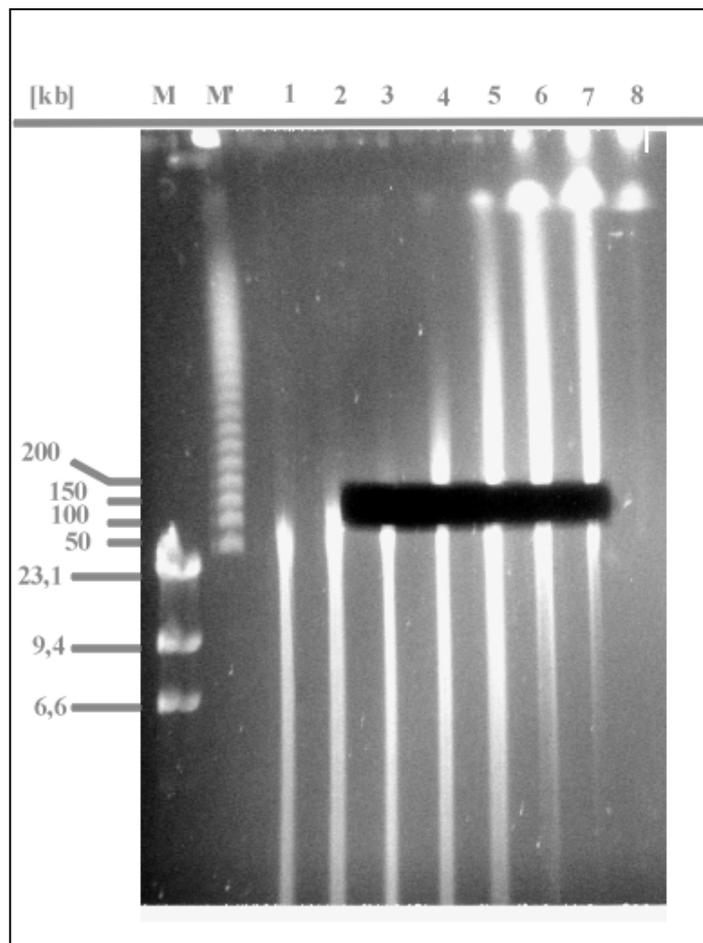


Abb. 8: Pulsfeldgelelektrophorese partiell gespaltener genomischer DNA. Eingesetzt wurden jeweils Blöckchen, die 4,5 μg DNA enthielten und mit abnehmender Enzymkonzentration inkubiert wurden. M: λ -HindIII; M': λ -Concatamer; 1: 7,5 U *Mbo*I/ μg DNA; 2: 6,75 U *Mbo*I/ μg DNA; 3: 5 U *Mbo*I/ μg DNA; 4: 2,5 U *Mbo*I/ μg DNA; 5: 1,5 U *Mbo*I/ μg DNA; 6: 1,5 U *Mbo*I/ μg DNA; 7: 0,5 U *Mbo*I/ μg DNA, 8: 0,25 U *Mbo*I/ μg DNA; 9: 0 U *Mbo*I/ μg DNA. Die Laufbedingungen waren für 24h, bei einer Temperatur von 11 °C: Zeitintervall in Sekunden, logarithmisch verändert von 100 \rightarrow 10, Rotationswinkel in $^\circ$, linear verändert von 120 \rightarrow 110, und eine logarithmisch veränderten Spannung in V von 200 \rightarrow 150.

Die Ligation der partiell gespaltenen genomischen DNA der Ratte in den BAC-Vektor erfolgte nach der in 3.16 beschriebenen Methode. Der Ligationsansatz wurde nach Mikrodialyse in 0,5 x TE Spermin/Spermidin-Lösung in den *E.coli*-Stamm DH10B elektrotransformiert. Die elektrokompetenten- Zellen stammten aus eigener Herstellung und wiesen eine Transformationseffizienz von $1,5 \times 10^{10}$ Transformanten pro μg DNA auf.

Für jeweils eine Elektroporation wurden 1 bis 3 μl der dialysierten Ligationen verwendet (s. 3.26). In einem ersten Ansatz von Ligationen und 120 anschließenden Transformationen

wurden 33.600 Kolonien erhalten. Die Durchschnittslänge der Inserts der überprüften Kolonien betrug 30 kb (Abb. 9). Es handelt sich allerdings um einen der ersten Ansätze ohne Vorlauf der DNA.

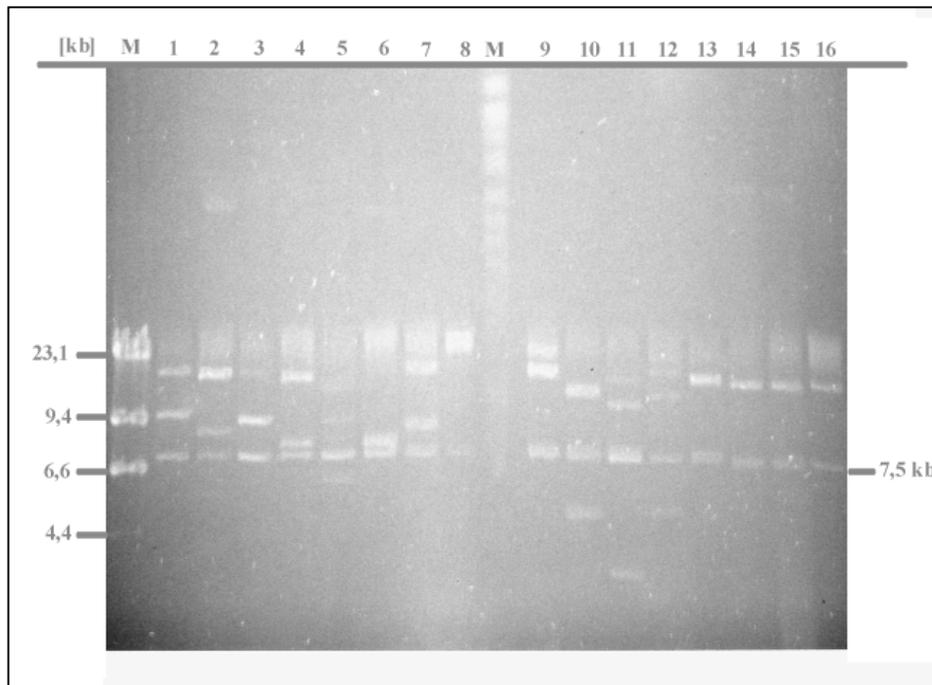


Abb. 9: Pulsfeldgelelektrophorese einiger mit *NotI* gespaltenen BAC-Klone (1-16). Auf der Höhe von 7,5 kb ist der linearisierte pBeloBAC11-Vektor zu sehen. Die Laufbedingungen waren für 24h, bei einer Temperatur von 11 °C: Zeitintervall in Sekunden, logarithmisch verändert von 100 → 10, Rotationswinkel in °, linear verändert von 120 → 110, und eine logarithmisch veränderten Spannung in V von 200 → 150.

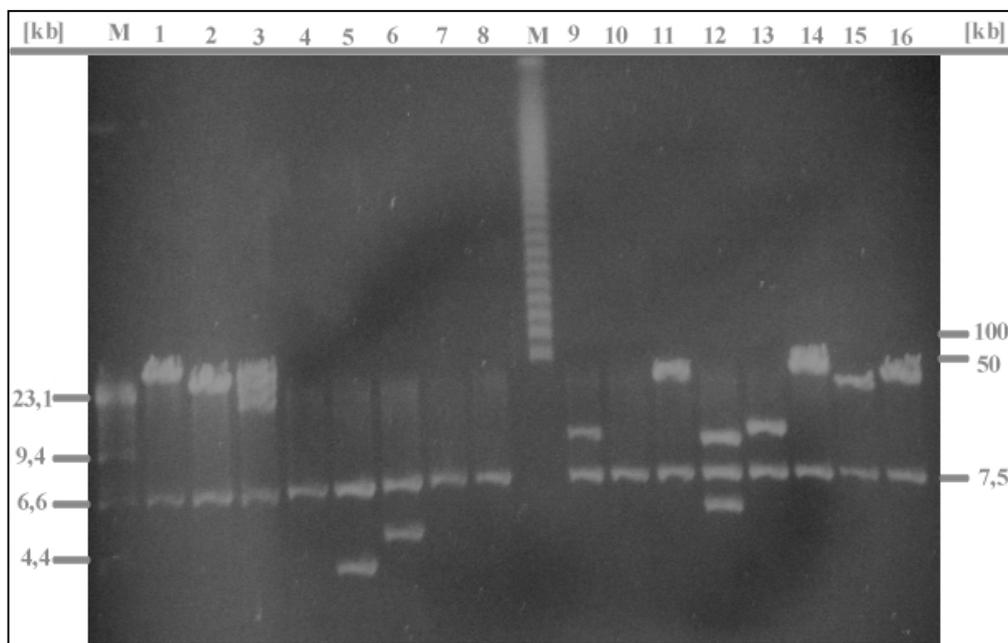


Abb. 10: Pulsfeldgelelektrophorese einiger mit *NotI* gespaltener BAC-Klone nach Optimierung der Bedingungen. Auf der Höhe von 7,5 kb befindet sich der linearisierte Vektor. Rechts ist die Länge der ersten zwei Banden aus den λ -Concatameren (50 und 100 kb) gezeichnet. Die Laufbedingungen waren für 24h, bei einer Temperatur von 11 °C: Zeitintervall in Sekunden, logarithmisch verändert von 100 \rightarrow 10, Rotationswinkel in °, linear verändert von 120 \rightarrow 110, und eine logarithmisch veränderten Spannung in V von 200 \rightarrow 150 .

Es wurden weitere Versuche zur Optimierung der Insertlänge durchgeführt, diese bestanden darin, daß die in Blöckchen verarbeitete DNA vor dem partiellen Verdau einen Vorlauf unterzogen wurde und kleineren DNA-Mengen zum Restriktionsverdau eingesetzt wurden. Durch den Einsatz geringerer DNA-Menge war eine bessere Auftrennung der langen DNA-Moleküle im Pulsfeldgel ermöglicht. Außerdem wurde DNA aus einem höheren Bereich nach der Auftrennung isoliert von 100 kb bis 200 oder 250 kb.

Es wurden 120 weitere Elektroporationen durchgeführt und 128.760 positive Klone erhalten. Der Anteil der Kolonien ohne ein Insert betrug 3%. Die Analyse der Insert-Länge mehrerer Klone zeigte, daß etwa die Hälfte der analysierten Klone eine Insert-Länge von durchschnittlich 50 kb hatte, und die anderen Klone relativ kleine Fragmente mit durchschnittlich ca. 6 kb aufgenommen haben. In der Abb. 10 sind repräsentativ einige mit *NotI* gespaltene BAC-Klone aus diesen Ansätzen abgebildet.

Die Größe eines haploiden Säugergenoms beträgt 3×10^9 bp. Durch die folgende Beziehung kann der Umfang der erstellten genomischen Bank berechnet werden:

Anzahl der Kolonien x durchschnittliche Größe der inserierten Fragmente [bp] = Größe der erhaltenen Bank [bp].

Insgesamt ergab sich eine Größe von $4,24 \times 10^9$ bp. Dieser Wert, geteilt durch die haploide Genomgröße, ergibt die Anzahl der klonierten Genom-Äquivalente (GE) und entspricht hier 1,4 Genom-Äquivalenten.

Für folgende Analysen zur Untersuchung der *RT1.C/M*-Region des Ratten MHC wurde jedoch diese Bank nicht weiter verwendet, denn in der zwischen Zeit wurde eine PAC-Bank des Ratten Genoms eines Umfangs von 10 GE (Woon *et al.*, 1998) über das Ressourcen-Zentrum im Deutschen Humangenomprojekt verfügbar (s. 2.14).

4.2 Etablierung von Hybridisierungsproben

Für die Isolierung von PAC-Klonen und die Erstellung von PAC-Contigs wurden spezifische Hybridisierungsproben an klonierten Genen oder anhand von spezifischen Primern mittels PCR für bekannte MHC-gekoppelte Genen etabliert. Weitere Hybridisierungsproben wurden aus STS-(*sequence-tagged sites*) Markern der Maus definiert. Außerdem wurden aus PAC-Endsequenzdaten (s. 3.18) eigene STS-Marker der Ratte etabliert.

Alle verwendeten Primer sind im Abschnitt 2.3 und eine Zusammenstellung der Hybridisierungsproben ist im Abschnitt 2.13 zu finden.

Die verwendete DNA für Proben aus der Ratte stammte aus dem Ratteninzuchtsstamm BN/Gun. Für Maus-Proben wurde der Stamm C57BL/6 verwendet. Für die humanen Proben wurde DNA aus verschiedenen Individuen verwendet.

4.2.1 Sonden aus klassischen MHC-Klasse-I-Genen

Für die Klonierung und physikalische Kartierung der *RTI-C*-Region war es notwendig, die genomische PAC-Bank der Ratte (Woon *et al.*, 1998) mehrfach mit unterschiedlichen Sonden zu *screenen*.

Zunächst wurden MHC-Klasse-I-Gen-spezifische Proben benutzt. Dazu wurden Subklone des Klasse-I-Gens *RTI-A^u* verwendet (Walter *et al.*, 1995), die von Herrn Dr. L. Walter, Abt. Immunogenetik, zur Verfügung gestellt wurden. Eine Zusammenstellung der Subklone findet sich in Tab. 2.

Tab. 2: Subklone des *RTI-A^u* Gens (Walter *et al.*, 1995) und daraus generierte MHC-Klasse-I-spezifische Proben.

Subklon	Spaltung durch:	Länge des als Sonde verwendeten Fragments	Bereich des Klasse-I-Gens, aus dem die Sonde stammt	Bezeichnung der Probe
P6 1.3	<i>NotI/PstI</i>	1,3 kb	Promotor-Region	Promotor Probe

P6 0.7	<i>NotI/PstI</i>	678 bp	Exon 1 + Intron1 + <u>Exon 2 ($\alpha 1$)</u> + Intron2	$\alpha 1$ -Probe
P4	<i>PstI</i>	289 bp	130 bp Intron 3 + <u>159 bp Exon 4 ($\alpha 3$)</u>	$\alpha 3$ -Probe
P7	<i>PstI/HindIII</i>	731 bp	Exon 7 + Intron 8 + Exon 8 + 3'-untranslatierte Region bis poly(A)-Signal	Cyto-Poly-A- Probe

Am Anfang des Exons 2 des *RT1-A^u*- Gens wurde der Primer alpha1-5' definiert und am Ende des Exons 2 der Primer alpha1-3'. Eine PCR mit diesen Primern an dem *RT1-A^u*-Gen lieferte das gesamte Exon 2 in einer Länge von 270 bp. In der Sequenz dieses Exons existiert eine *KspI* Schnittstelle. Diese wurde verwendet, um das Exon 2 in zwei Teile zu spalten. Das Fragment, das die 5'-Hälfte des Exons enthält, hat eine Länge von 141 bp und das Fragment der 3'-Hälfte des Exons umfasst 129 bp. Diese Restriktionsfragmente wurden auf einem 2,5% igen Agarose-Gel aufgetrennt und als Hybridisierungssonden zur Überprüfung der Exon 2-reichen Region im Übergang vom Contig 2-1 zum Contig 2-2 verwendet.

4.2.2 Erstellung von Hybridisierungsproben aus MHC-Klasse-Ib-Genen

RT1-M3 (Rattus norvegicus)

Das MHC-Klasse-Ib-Gen *RT1-M3* ist ortholog zu *H2-M3* der Maus (Wang *et al.*, 1991b). Untersuchungen an der Maus zeigten, daß das *H2-M3*-Gen für ein Klasse-Ib-Molekül kodiert, welches N-formylierte Peptide mitochondrialen oder bakteriellen Ursprungs zytotoxischen T-Lymphozyten präsentieren kann. Dieses Molekül ist an der Immunantwort nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* beteiligt. Das Gen wurde am telomeren Ende des MHC sowohl bei der Maus (Jones *et al.*, 1995) als auch bei der Ratte (Lambracht *et al.*, 1995) lokalisiert.

Zur Erstellung der spezifischen *RT1-M3* Probe wurde ein Primer-Paar im Exon 3, das 60-70% Homologie zu anderen Klasse-I-Genen in dieser Region zeigt, ausgewählt. Das PCR-Produkt

besitzt eine Länge von 250 bp und wurde verwendet, um diejenigen Klone aus dem α 3-*Screening* zu identifizieren, die das M3-Gen tragen.

RT1-M4 (Rattus norvegicus)

Das *H2-M4*-homologe Gen der Ratte konnte durch einen Mikrosatellitenmarker identifiziert werden (Lambracht *et al.*, 1998). Es wurden den Mikrosatellit flankierende Primer definiert und ein PCR-Produkt von 129 bp erhalten, welches als Sonde zur Identifizierung des *RT1-M4*-Gens in PAC-Klonen verwendet wurde.

H2-M2 (Mus musculus)

Das *H2-M2*-Gen (oder Thy19.4) der Maus (Brorson *et al.*, 1989) wurde wie *H2-M3*, am telomeren MHC-Ende lokalisiert. Um PAC-Klone identifizieren zu können, die das homologe Gen der Ratte tragen, wurde eine Probe aus dem Exon 2 von *H2-M2* durch PCR generiert, welche eine Länge von 270 bp aufweist.

RT.BM1 (Rattus norvegicus)

Eine Hybridisierungsprobe wurde aus dem *RT.BM1*-Gen (Parker *et al.*, 1990) generiert, das in der *RT1-C/E*-Region liegt und in der NC2-Region* (NC = *non-coding*) ein Alu-ähnliches *repeat*-Element enthält. Zur Generierung der *BM1*-spezifischen Probe wurden Primer in der NC1-Region* definiert. Das erhaltene PCR-Produkt sollte auf cDNA-Ebene 300 bp betragen. Auf genomischer Ebene hat es eine Länge 1000 bp. Es beinhaltet das Exon 7, Intron 7, Exon 8, ein 619 bp langes Intron im 3'-utr (Salgar *et al.*, 1998) und einen Teil der NC1-Region.

4.2.3 Erstellung von Hybridisierungssonden aus verschiedenen „Ankergenen“

Die vollständige Kartierung und teilweise Sequenzierung des H2-Komplexes sowie die komplette Sequenzierung des HLA-Komplexes liefern bisher nicht bekannte Informationen über die Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes in diesen Spezies. Anhand dieser Daten war es möglich, für viele MHC-Gene Proben zu generieren um zu untersuchen, ob diese Gene an orthologer Position im RT1-Komplex vorkommen.

Bat 1 (Rattus norvegicus)

Das Gen codiert für eine nukleäre RNA Helikase. Für die Herstellung einer Bat1-Probe wurden die in der Abteilung Immungenetik vorhandenen Primer rBat1-5' und rBat1-3',

welche der codierenden Region des Ratten-*Bat1*-Gens entstammen, verwendet, um an cDNA eine PCR durchzuführen. Die Sequenz, aus der die Primer stammen, ist unter M75168 in der EMBL/Genbank zu finden (Nair *et al.*, 1992). Die Länge des PCR Produkts beträgt 400 bp.

*Der 3'-untranslatierte Bereich der Maus-Klasse-I-Gene ist in zwei Regionen unterteilt worden, NC1 und NC2 (Lalanne *et al.*, 1982). Eine ähnliche Aufteilung ist auch für die Klasse-I-Gene der Ratte vorgeschlagen worden, wobei die ersten 320 Nukleotide des 3'-utr die NC1-Region umfaßt und die NC2-Region den Rest von in der Regel ca. 130 bp (Mauxion *et al.*, 1989)

Pou5f1 (Mus musculus)

Pou5f1 ist ein Gen, das für einen Transkriptionsfaktor (auch OTF-3, oct4 genannt) kodiert. Dieser Transkriptionsfaktor enthält eine POU-Domäne sowie eine Homeodomäne und ist in undifferenzierten pluripotenten Zellen des frühen Embryos und der Keimzellen exprimiert. Dementsprechend spielt dieses Gen in der frühen Entwicklung eine Rolle und reguliert die Transkription von Genen mit dem Octamer/DNA-Bindungs-Motiv (Rosner *et al.*, 1990).

Die Primer wurden an cDNA der Maus-Sequenz S58426 (Rosner *et al.*, 1990) in der codierenden Region, 3'-wärts von der Homeodomäne, und exakt vor dem Beginn des 3'-UT definiert. In dieser Region, der sogenannten *spacer*-Region zwischen der POU-spezifischen Domäne und der Homeodomäne, und an verschiedenen Aminosäure-Positionen in der POU-spezifischen Domäne unterscheidet sich dieses Protein von anderen POU-Proteinen. Die PCR zur Erstellung der Sonde wurde an genomischer DNA durchgeführt, und das erhaltene Produkt wies eine Länge von 170 bp auf.

Cak (Rattus norvegicus)

Dieses Gen ist auch unter den Bezeichnungen DDR, EDDR1, NEP bekannt und codiert für eine Zell-Adhäsions-Kinase. Die Primer-Definition erfolgte an der cDNA der Ratten Sequenz AW144724 (Laval *et al.*, 1994). Das RT-PCR Produkt sollte theoretisch 370 bp enthalten. Verglichen mit der genomischen Sequenz, die für das menschliche Gen bekannt ist, sollten diese Primer jedoch ein Intron überspannen. Die PCR an genomischer DNA der Ratte ergab ein Produkt von 1 kb Länge.

Gtf2h4 (Rattus norvegicus)

Dieses Gen codiert für p52, die fünfte Untereinheit des Kernenzym des Transkription/DNA-Reparatur-Faktors IIIH. Die Primer Definition erfolgte an cDNA der Ratte Y07595, Marinori

et al., 1997. Das PCR-Produkt beträgt auf cDNA- und genomischer-Ebene 228 bp, es ist also kein Intron in dem Primer umfassenden Bereich vorhanden.

Prg1 (Rattus norvegicus)

Prg1 ist ein „early response“-Gen (Schäfer *et al.*, 1996), homolog dem gly96 (Charles *et al.*, 1993) der Maus und ein potentieller Transkriptionsfaktor. Die Primer wurden an der 3'-untranslatierten Region definiert. Das PCR Produkt umfaßt 300 bp. Die benutzte Sequenz ist unter X96437 zu finden. Durch Ansequenzieren des hier beschriebenen Klonen I16223 wurde am telomeren Ende eine Sequenz aus dem *Prg1*-Gen identifiziert.

Pnuts (Rattus norvegicus)

Das Gen *Pnuts* (***p***hosphatase ***I*** ***n***uclear ***t***argeting ***s***ubunit) ist auch unter der Bezeichnung *FB19* zu finden (Totaro *et al.*, 1998). Das *FB19*-Gen wurde 70 kb centromerwärts von HLA-E lokalisiert.

Gna-rs1 (Mus musculus)

Bei *Gna-rs1* handelt es sich um ein putatives GTP-bindendes Protein. Das homologe Maus-Gen wird auch als *Mmr1*, das homologe humane Gen auch als *HSR1* oder *GNLI* bezeichnet. Die verwendete Probe ist ein 359 bp *EcoRI*-Fragment und wurde von Dr. Pierre Pontarotti, Marseille, zur Verfügung gestellt.

TC4 (Homo sapiens)

Das *TC4*-Gen kodiert für ein Ras-ähnliches Protein. Die Primer entstammen aus der humanen cDNA Sequenz M31469 (Drivas *et al.*, 1990). Das PCR Produkt besitzt eine Länge von 625 bp.

ZNF173 (Homo sapiens)

Das Zinkfinger-Protein ZNF173 (Chu *et al.*, 1995) gehört einer Multigen-Familie an. Es enthält zwei Cystein- und Histidin-reiche Domänen, welche charakteristisch für Metall-abhängige, DNA bindende Proteine sind. Zusätzlich ist eine *coiled-coil*-Domäne vorhanden, die eventuell zur Dimerisation beiträgt. Vor dem Carboxy-Terminus ist eine Polyglutaminsäure-Region zu finden.

Primer wurden an der humanen cDNA Sequenz aus NM_003449 im Bereich zwischen *coiled-coil*-Domäne Polyglutamin-Region definiert. Im Vergleich mit der genomischen Sequenz

überspannen diese Primer eine Region von zwei Introns. Das PCR Produkt wurde an humaner cDNA generiert und beträgt 328 bp.

RFB30 (Homo sapiens)

Das Gen *RFB30* gehört zur Multigen-Familie der B30-RING-Finger-Proteine. Diese enthalten eine konservierte Domäne, die als B30.2 bezeichnet wird. Die Proteine dieser Familie haben eine RING-B-Box- Domäne in Exon 1, sowie eine coiled-coil-Domäne im Exon 2 und binden sehr wahrscheinlich Nukleinsäuren oder Proteine. Die B30.2 ähnliche Domäne (Exon 7) wurde ursprünglich in einem transmembranen Protein, Butyrophylin, welches in der Milchdrüse während der Laktation exprimiert ist, nachgewiesen. In diesem Protein folgt auf ein transmembranes Segment eine cytoplasmatische B30.2 Domäne, der sich zwei extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen anschliessen. Die distale Immunglobulin-ähnliche Domäne entspricht der Immunglobulin-ähnlichen Domäne des Myelin/Oligodendrocyten-Glycoproteins (MOG).

Zur Erstellung der RFB30-Probe wurden Primer an Exon G (Exon 7) definiert (Y07829, Henry *et al.*, 1997) und die PCR an humaner genomischer DNA durchgeführt. Die Länge des erhaltenen PCR-Produktes beträgt 420 bp.

Tctex5 (Mus musculus)

Tctex5 gehört zu den *t-complex testis-expressed genes* (Young *et al.*, 1993). Die Maus-Probe umfaßt 500 bp (*EcoRI* Fragment) und wurde von Dr. Pierre Pontarotti, Marseille, zur Verfügung gestellt.

Mog (Rattus norvegicus)

Das Myelin/Oligodendrocyten-Glykoprotein (MOG) kommt im Myelin des zentralen Nervensystems vor. *MOG* wird, im Vergleich zu anderen, gut charakterisierten Myelin-Proteinen, erst spät in der Entwicklung des Gehirns gebildet. Die externale Lokalisation des MOG an der Myelin-Scheide und an Oligodendrozyten sowie die späte Expression sprechen für eine spezifische Rolle des MOG in den letzten Stadien der Myelinisierung. Das MOG-Protein hat sich als ein wichtiges Autoantigen bei autoimmunen Krankheiten des ZNS, wie der Autoimmunen Encephalomyelitis und der Multiplen Sklerose, erwiesen.

Die Mog-Primer wurden an der Sequenz des Exons 2 des Ratten Gens definiert (L21995; Pham-Dinh *et al.*, 1993). Das generierte PCR Produkt umfaßt 270 bp.

Tu42 (Mus musculus)

Das Tu42-Gen kodiert für einen olfaktorischen Rezeptor. Die Probe (1,9 bp *EcoRI/BamHI*) wurde von Dr. Pierre Pontarotti, Marseille, zur Verfügung gestellt.

4.2.4 Erstellung von STS-Markern aus der Ratte und der Maus

I162T (Rattus norvegicus)

Aus der Endsequenzierung des Klonen I16223 wurde am telomeren Ende (4.4.2.1.4) eine Sequenz erhalten, die kein *repeat* darstellt, aber auch keine Homologie zu bereits bekannten Sequenzen aufweist. Auf der Basis dieser Sequenz wurden Primer definiert und ein PCR-Produkt von 230 bp Länge generiert. Die Probe wurde als STS-Marker verwendet, um damit die im Contig benachbarten PAC-Klone zu überprüfen.

Grc (Rattus norvegicus)

Der Grc-Phänotyp ist durch Kleinwuchs, reduzierte Fertilität und erhöhte Suszeptibilität für chemisch induzierte Tumoren charakterisiert (Gill *et al.*, 1997). Eine Probe von 500 bp, die die Grc-Region detektiert wurde aus der Sequenz des Klonen pGRC1.4 (Cortese Hassett *et al.*, 1989) generiert. Die genaue Beschreibung erfolgt unter 4.4.2.1.1

Mikrosatellit D20Gun1 (Rattus norvegicus)

Aus der Endsequenzierung des centromeren Endes des Klonen J2298 wurde u.a. die Sequenz eines Mikrosatelliten erhalten. Es handelt sich um eine repetitive Sequenz, die mit der Insertion von Retrotransposons kombiniert ist. Dieses *repeat* besteht aus (GAA)_n/(GAAA)_n und hat eine Länge von 100 bp. Die flankierende Sequenz ist homolog der Sequenz eines intracisternalen A-Partikels, das sowohl in metastatischen Tumor-Zelllinien der Ratte (Grassi, 1998 unpubliziert) als auch bei der sogenannten Eker-Ratte vorkommt. Die Eker-Mutation ist auf dem Chromosom 10 lokalisiert. Die Tiere erkrankten an renalem Carcinom (Kobayashi *et al.*, 1995).

Durch den Mikrosatelliten flankierende Primer wurde aus dem Klon J2298 ein PCR-Produkt generiert und als Marker verwendet.

H12587 (Rattus norvegicus)

Die Endsequenzierung des PAC-Klonen H12587 am centromeren Ende ergab eine anonyme, d.h. nicht in der Datenbank (Genbank/EMBL) vorhandene Sequenz. Aus dieser Sequenz

wurden Primer etabliert und das erhaltene 160 bp umfassende PCR-Produkt als STS Marker verwendet. Das *Screening* der genomischen Bank mit dieser Sonde ergab jedoch bekannte Klone aus der Region des Contig 2-1. Aus diesem Ergebnis wurde der Schluß gezogen, daß es sich um einen Marker handelt, der mehrfach in dieser Region vorkommt.

255D16 (*Mus musculus*)

Anhand von YAC- oder BAC-Klonen, die für den MHC der Maus etabliert worden sind (Amadou et al., 1999) wurde der STS-Marker 255D16 mittels PCR hergestellt und zur Kartierung bei der Ratte eingesetzt. Dazu wurden an der Sequenz B88392 Primer gewählt und an genomischer DNA der Maus die PCR durchgeführt. Die generierte Probe hat eine Länge von 260 bp. Dieser STS-Marker ist am centromeren Ende der H2-M Region lokalisiert.

261A5T und 261A5S (*Mus musculus*)

Der STS-Marker 261A5T der Maus ist ca. 300 kb telomerwärts vom Marker 255D16 (s. oben) entfernt. Wiederum der Marker 261A5S ist ca. 100 kb telomerwärts von 261A5T entfernt. Beide Marker befinden sich in der H2-M Region. Die 261A5T-Probe wurde durch Primer aus der Sequenz B88394 erstellt, wobei sich ein PCR-Produkt von 360 bp ergab. Analog wurde die 261A5S-Probe aus der Sequenz B88393 erstellt, und die per PCR erhaltene Hybridisierungssonde weist eine Länge von 330 bp auf.

4.3 Klonierung und physikalische Kartierung der *RT1-C/M*-Region anhand einer genomischen Bank aus der BN-Ratte (RT1^u-Haplotyp)

Zur Klonierung der *RT1-C*-Region wurde eine genomische Bank des Inzuchtstammes BN (RT1^u-Haplotyp) verwendet, die von Woon *et al.*, (1998) konstruiert worden ist und über das Ressourcen-Zentrum des Humanen Genom-Projekts in Berlin verfügbar ist.

Zu Beginn der Versuche, die *RT1-C/M*-Region zu klonieren, wurde die oben genannte Bank mit der *Bat1* Probe *gescreent* (s. 4.2). Dieses Gen ist am telomeren Ende der Klasse-III-Region lokalisiert. Aus diesem *screening* wurden drei *Bat1*-positive Klone erhalten. Diese Klone erwiesen sich auch positiv mit der *Tnfa*-Probe. Das *Tnfa*-Gen ist ca. 40 kb (Walter *et al.* 1997) centromerwärts vom *Bat1*-Gen lokalisiert. Diese Klone zeigten nach Hybridisierung

mit der $\alpha 1$ - und $\alpha 3$ -Probe (s. 2.13. und Abb. 14) eine große Anzahl an positiven Fragmenten, deren Zuordnung eine dachziegelartige Anordnung (Überlappung) ergab und zu der Annahme berechtigte, daß eine dichte Abfolge von MHC-Klasse-I-Genen in dieser Region vorhanden ist.

Ein *Screening* der PAC-Bank mit der $\alpha 3$ -Probe, deren Sequenz hochkonserviert in allen MHC-Klasse-I-Genen ist, sollte alle Klone, die solche Gene tragen, identifizieren. Da die genomische Bank einen Umfang von 10 Genom-Äquivalenten hat, mußte mit einer großen Anzahl solcher Klone gerechnet werden. Da aber im Bereich der $\alpha 1$ -Domäne eine größere Variabilität innerhalb der Klasse-I-Gene besteht, mußte ein *Screening* mit einer $\alpha 1$ -Probe unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen eine geringere Anzahl an solchen Klonen liefern, die untereinander eine höhere Homologie in der $\alpha 1$ -Sequenz aufweisen.

Durch das *Screening* mit der $\alpha 1$ -Probe (s. 4.2) wurden 43 positive Klone erhalten, davon wurden 7 Klone der RT1-A Region zugewiesen, da sie auch das *Ring1*-Gen tragen, das sich am centromeren Ende des RT1-Komplexes befindet (Walter et al., 1996). Die restlichen 37 Klone konnten anhand der $\alpha 1$ - bzw $\alpha 3$ -Hybridisierungs-Banden in zwei *Contigs* angeordnet werden (Abb. 14, 23).

Durch das weitere *Screening* der Bank mit der $\alpha 3$ -Probe konnten die meisten der $\alpha 1$ -positiven Klone erhalten werden sowie weitere 61 Klone, die sich offensichtlich im $\alpha 1$ -Bereich von den vorigen $\alpha 1$ -positiven Klonen stark unterscheiden. Auch bei diesen Klonen war eine Zusammenstellung in 2 *Contigs* anhand des $\alpha 3$ -Hybridisierungsmusters möglich (s. Abb. 32, 34).

Bei 22 Klonen, die entweder ein oder zwei $\alpha 3$ -hybridisierende Fragmente vorweisen, fand sich eine Hybridisierung mit den *RT1-M2*- bzw. *RT1-M3*- Proben.

Zur Erstellung der *Contigs* wurde es nach folgendem Prinzip gearbeitet: aus den durch die *Screenings* der PAC-Bank (Wonn et al., 1998) positiv identifizierten Klonen wurde DNA isoliert (s. 3.2.5) und nach 3.4 mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI gespalten. Nach elektrophoretischer Trennung der gespaltenen DNA (s. 3.6.1) wurden Southernblots auf Nylon Membranen erstellt (s. 3.7), welche zur Hybridisierung (s. 3.8) mit gewünschten Sonden verwendet wurden. In diesem Fall wurden zunächst die Hybridisierungsproben $\alpha 1$ und $\alpha 3$ eingesetzt. Durch den Vergleich der mit diesen Proben hybridisierenden *Bam*HI-Fragmenten konnte festgestellt werden, ob und welche der Fragmente aus den untersuchten Klonen überlappen. PAC-Klone, die überlappende $\alpha 1$ und/oder $\alpha 3$ hybridisierende *Bam*HI-Fragmente trugen wurden zunächst in *Contigs* zusammengesetzt. Weiterhin wurden die auf

dieser Weise in Contigs zusammengestellte PAC-Klone mit zusätzlichen Proben überprüft (durch Hybridisierung oder PCR-Durchführung), die entweder aus PAC-Endsequenzierung hergestellt wurden oder/und mit verschiedenen Genproben, wodurch auch das genaue Kartieren dieser Gene erfolgte.

Die in den Contigs aufgezeichnete Klasse-I hybridisierende Fragmente wurden nach der Länge der jeweils mit der $\alpha 1$ und/oder $\alpha 3$ Sonde hybridisierenden *Bam*HI Restriktionsfragmente genannt, ein Prinzip das auch bei der Kartierung des MHC der Maus angewendet wurde (Amadou *et al.*, 1999). Folgend werden im einzelnen die erstellten Contigs besprochen.

4.3.1 Beschreibung von Contig 1

In einem ersten Contig, das durch Hybridisierung mit der *Tnfa*- und *Bat1*-Probe in der Klasse-III-Region verankert ist, konnten insgesamt 24 PAC-Klone zusammengestellt werden (s. Tab. 3). Das Contig beginnt ca. 60 kb centromerwärts des *Tnfa*-Gens. Telomerwärts des *Tnfa*-Gens befindet sich das *Bat1*-Gen. Der Abstand zwischen diesen Genen beträgt im RT1^u-Haplotyp ca. 40 kb (Walter *et al.*, 1997). Dies entspricht der Länge, die auch bei Mensch und Maus bekannt ist. In dem hier untersuchten RT1ⁿ-Haplotyp wurde dieser Abstand nicht vermessen; auch die Abstände zwischen den einzelnen Klasse-I-Genen oder -Genfragmenten ist nicht bekannt. Zwischen dem *Bat1*-Gen und dem ersten Klasse-I-Gen konnte per *long range* PCR ein Abstand von 10 kb festgestellt werden. Durch die Definition der verwendeten Primer wurde es möglich, die Orientierung dieser Gene zu bestimmen (Abb. 11).

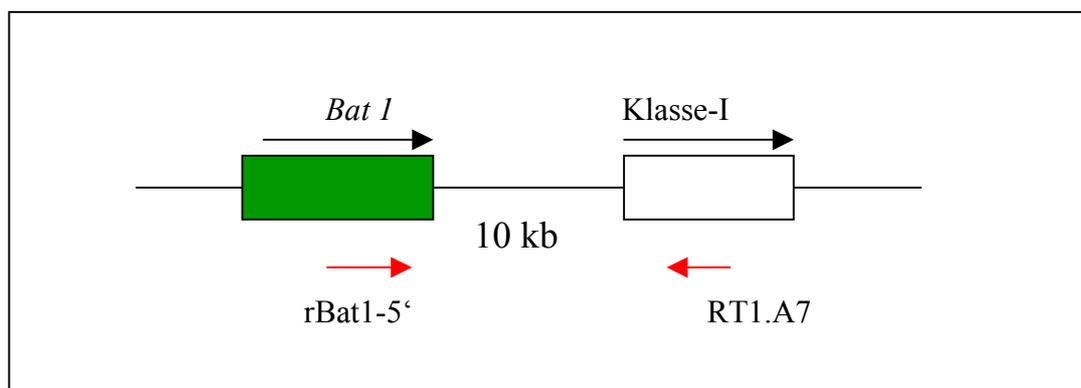


Abb. 11: *Long-range* PCR mit Primern aus dem *Bat1*-Gen und einem Klasse-I-Gen. Die schwarzen Pfeile zeigen die Orientierung des *Bat1*-Gens und des nachfolgenden Klasse-I-Gens. Die grauen Pfeile deuten die Orientierung der für die *long range* PCR verwendeten Primer an.

An die fünf PAC-Klone, die mit der *Tnfa*- und *Bat1*-Probe hybridisiereten, konnten weitere 14 Klone angefügt werden, die eine dichte Abfolge an $\alpha1/\alpha3$ -hybridisierenden Fragmente zeigten. Die mit der $\alpha1$ - bzw. $\alpha3$ -Probe hybridisierende Fragmente sind in den Abbildungen 12 bzw. 13 zu sehen. Insgesamt waren 20 solcher *Bam*HI-Fragmente in dieser Region zu finden. Es wurden alle hybridisierenden Fragmente separat in der Abbildung 14 eingetragen, wobei, zumindest bei den $\alpha1/\alpha3$ -doppeltpositiven Fragmenten davon auszugehen ist, daß es sich um komplette Gene handelt. Bei den nebeneinander gezeichneten $\alpha1/\alpha3$ -positiven Fragmenten könnte es sich auch um Gene handeln, die eine interne *Bam*HI-Schnittstelle enthalten. Das Hybridisierungsmuster mit der Promotor- und der Cyto-Probe (siehe 2.13. und Abb.15 bzw. 16) bestätigte diese Annahme. Demzufolge könnten sich in dieser Region 15 Klasse-I-Gene befinden. Bei dem 23 kb langen $\alpha1$ -positiven Fragment könnte es sich um ein unvollständiges Gen handeln, es ist aber auch nicht auszuschließen, daß sich das zu diesem Gen gehörende $\alpha3$ -Fragment auf einem der benachbarten langen Fragmente befindet.

An dem oben genannten *long-range* PCR-Produkt von 10 kb (Abb. 11) wurde von *Bat1* telomerwärts eine Sequenzierung durchgeführt. Verwendet wurde der Primer rBAT1.3-neu, der im 3'-utr des *Bat1*-Gens definiert wurde. Es wurde eine Sequenz von 400 bp erhalten. Ein Vergleich dieser Sequenz mit der homologen Maus-Sequenz (Schäfer *et al.*, 1999) ergab, daß nach dem *Bat1*-Polyadenylierungs-Signal die Sequenz für 45 bp völlig identisch sind, dann aber die Homologie abbricht. (Anhang 8.2)

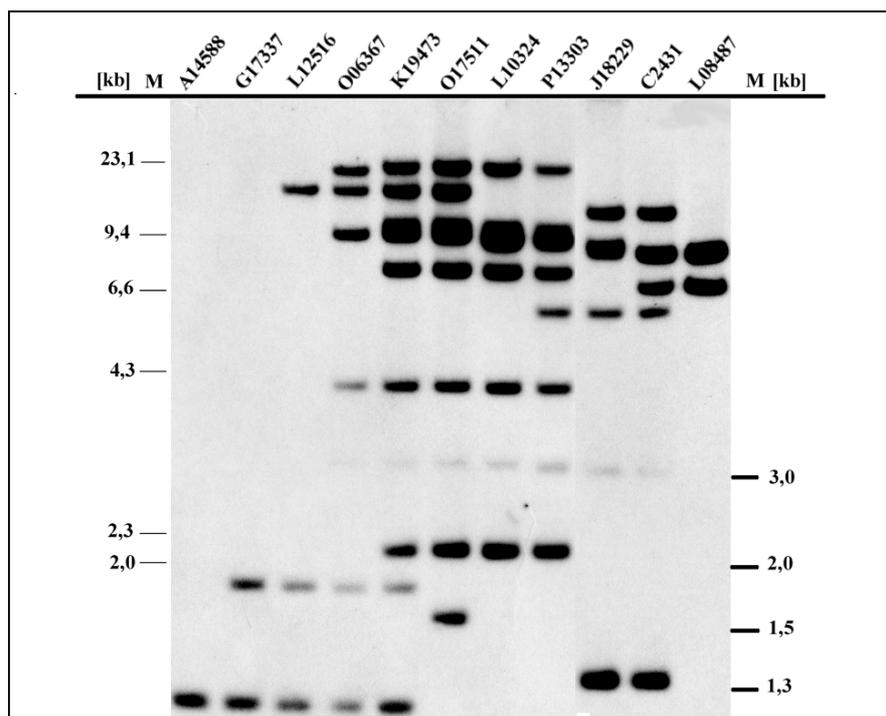


Abb. 12: Southernblotanalyse von *Bam*HI verdaute DNA von PAC-Klonen des Contigs 1 mit der α 1-Probe. Die Bezeichnungen der Klone finden sich über den Bahnen. Links und rechts ist der Längenstandard angegeben. Eine Zusammenstellung der Klone finden sich in Tab. 3, die Zuordnung zu Contig 1 ist in Abb. 14 gezeigt.

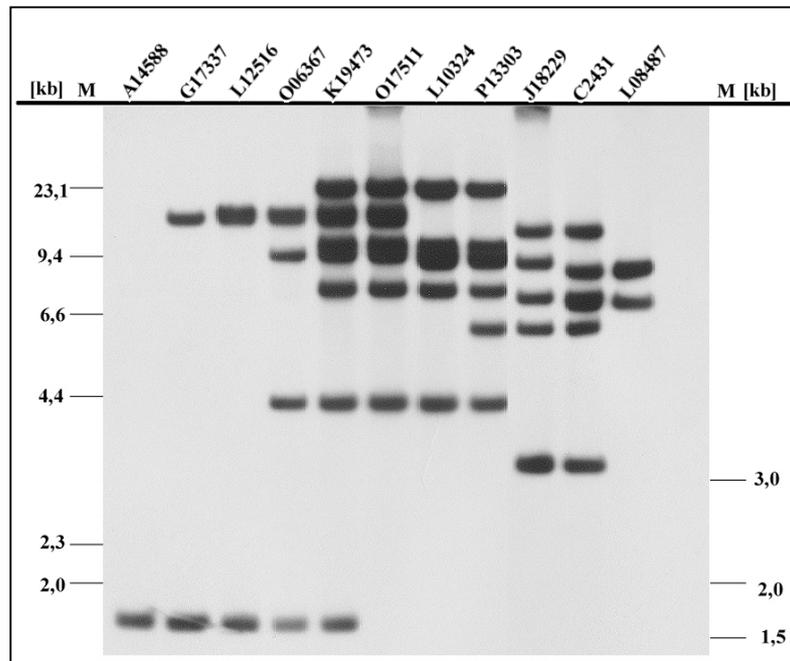


Abb. 13: Southernblotanalyse von *Bam*HI verdaute DNA von PAC-Klonen des Contigs 1 mit der α 3-Probe. Es sind repräsentativ die meisten PAC-Klone, die Klasse-I-Gene tragen gezeigt. Links und rechts ist der Längenstandard angegeben. Die Zusammenfassung der gesamten Klone dieses Contigs ist auf der Tab. 3 und Abb. 14 zu entnehmen.

Tab. 3: Zusammenfassung der PAC-Klone, die dem Contig 1 zugeordnet wurden. Aufgeführt sind die PAC-Bezeichnung, Filter-Nummer der Ratten-PAC-Bank sowie die Koordinaten der Klone. Weiterhin ist das Ergebnis der Hybridisierung der PAC-Klone mit verschiedenen Proben aus dieser Region angegeben.

	PAC	Filter Nr.	Koordinaten	Hybridisierungs-Fragmente mit der α 1-Probe	Hybridisierungs-Fragmente mit der α 3-Probe	Hybridisierung mit weiteren Proben
1	A14588	110-9-122	171 78, 173 80	1	1,8	<i>Tnfa</i> <i>Bat1</i>
2	H04473	110-6-161	104 203, 101 204	1/2	1,8/18	<i>Tnfa</i> <i>Bat1</i>

3	G17337		36 128, 38 130	1/2	1,8/18	<i>Tnfa</i> <i>Bat1</i>
4	L12516	110-7-158	184 101, 181 101	1/2/19	1,8/18/19	<i>Tnfa</i> <i>Bat1</i>
5	O06367	110-6-116	91 86, 94 86	1/2/19/23/10/4	1,8/18/19/10/4	<i>Tnfa</i> <i>Bat1</i>
6	K19473	110-6-161	29 188, 26 189	1/2/19/23/10/4/ 2,3/12/8	1,8/18/19/10/4/ 24/12/8	<i>Bat1</i>
7	O17511	110-7-158	39 86, 36 86	2/19/23/10/4/ 2,3/12/8/9,5	18/19/10/4/24/ 12/8/9,5	
8	L10324	110-5-138	192 103, 192 101	23/10/4/2,3/12/8/ 9,5/6	10/4/24/12/8/ 9,5/6	
9	P13303	110-5-138	179 164, 180 161	23/10/4/2,3/12/8/ 9,5/6/3,5/1,2	10/4/24/12/8/ 9,5/6/3,5	
10	J18229	110-4-122	34 14, 35 111	9,5/6/3,5/1,2/ 17/8,5	9,5/6/3,5/7/17/ 8,5	
11	E05168	110-3-110	219 140, 218 137	9,5/6/3,5/1,2/ 17/8,5	9,5/6/3,5/7/17/ 8,5	
12	K18224	110-4-122	154 26, 151 26	9,5/6/3,5/1,2/ 17/8,5	9,5/6/3,5/7/17/ 8,5	
13	A22327	110-5-138	134 238, 131 239	3,5/1,2/17/8,5/ 6,8	3,5/7/17/8,5/6,8	

14	J12142	110-2-127	65 32, 63 31	3,5/1,2/17/8,5/ 6,8	3,5/7/17/8,5/6,8	
15	K03168	110-3-110	229 110, 228 107	3,5/1,2/17/8,5/ 6,8	3,5/7/17/8,5/6,8	
16	D07219	110-4-122	206 225, 206 222	3,5/1,2/17/8,5/ 6,8	3,5/7/17/8,5/6,8	
17	L08487	110-2-127	15 105, 12 104	8,5/6,8	8,5/6,8	
18	C2431	110-1-116	2 146, 2 148	9,5/6/3,5/1,2/ 17/8,5/6,8	9,5/6/3,5/7/17/ 8,5/6,8	<i>Pou5f1</i>
19	C2331	110-1-116	7 146, 7 148	9,5/6/3,5/1,2/ 17/8,5/6,8	9,5/6/3,5/7/17/ 8,5/6,8	<i>Pou5f1</i>
20	A24506	110-8-108	121 80 121 77	_____	_____	<i>S</i> <i>Cak</i> <i>Gtf2</i>
21	K11482	110-7-111	188 30 186 28	_____	_____	<i>Cak</i> <i>Gtf2</i>
22	N0751	110-9-155	208 175 206 173	_____	_____	<i>Cak</i> <i>Gtf2</i>
23	H13218	110-4-135	176 45 176 42	_____	_____	<i>Cak</i> <i>Gtf2</i>
24	D20510	110-8-108	141 145 141 142	_____	_____	<i>Cak</i> <i>Gtf2</i>

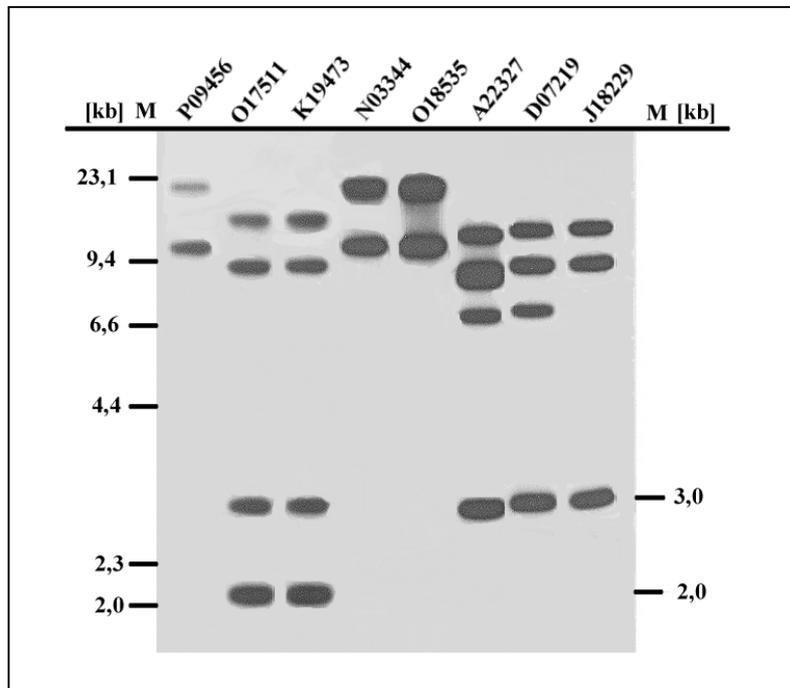


Abb. 15: Hybridisierung eines Southernblots mit der Promotor-Probe. Es sind überlappende PAC-Klone angegeben, die dem Contig 1 zugeordnet wurden und alle dort detektierten Klasse-I-Gene umfassen. Es ist erkennbar, daß die Promotor-Probe eine weitere Bande der Länge 3,0 kb erkennt, welche weder mit der α 1- noch mit der α 3-Probe reagiert. Die drei PAC-Klone P09456, N03344 und O18535 gehören der *RTI-A* Region an, da sie auch mit Sacm2I- bzw. Ring1-Probe hybridisieren (nicht gezeigt). Die Längensstandards sind auf der linken und rechten Seite des Blots angegeben.

Die Überprüfung der PAC-Klone mit der Promotor-Probe ergab, daß nur einige der Klasse-I-positiven Fragmente des Contig 1 mit dieser Probe hybridisieren sowie die der *RTI-A*-Region zugeordnete Klone. In der Abb. 15 sind nicht alle Klone des Contigs 1 aufgeführt, sondern ein „minimal-Contig“, das alle Klasse-I-Gene des Contigs repräsentiert. Verglichen mit den Daten aus der α 1- und α 3-Hybridisierung reagiert das erste (1/1,8 *Bam*HI) und das zweite Gen (2/18 *Bam*HI) nicht mit dieser Promotor-Probe. Dieses könnte bedeuten, daß diese Gene entweder keine Promotoren enthalten oder daß der Promotor keine ausreichende Homologie zu dem der Klasse-Ia-Gene zeigt. Folgende α 1-positive *Bam*HI-Fragmente reagieren ebenfalls nicht mit der Promotor-Probe: 23 kb, 4 kb, 12 kb, 8 kb, 6 kb, 1,2 kb, 8,5 kb.

Die restlichen sieben *Bam*HI-Fragmente die sowohl mit der α 1-Probe als auch mit der α 3-Probe hybridisieren und vermutlich vollständige Gene tragen, hybridisieren zusätzlich mit der oben genannten Promotor Probe.

Die Hybridisierung mit einer Sonde aus dem cytoplasmatischen Teil eines klassischen Klasse-I-Gens (s. 2.13 und Abb. 5) zeigt, daß fast alle α 3-hybridisierenden Fragmente des Contigs 1 mit dieser Probe reagieren. Ausnahmen bilden das 12 kb- und das 9,5 kb-*Bam*HI-Fragment (Abb. 16).

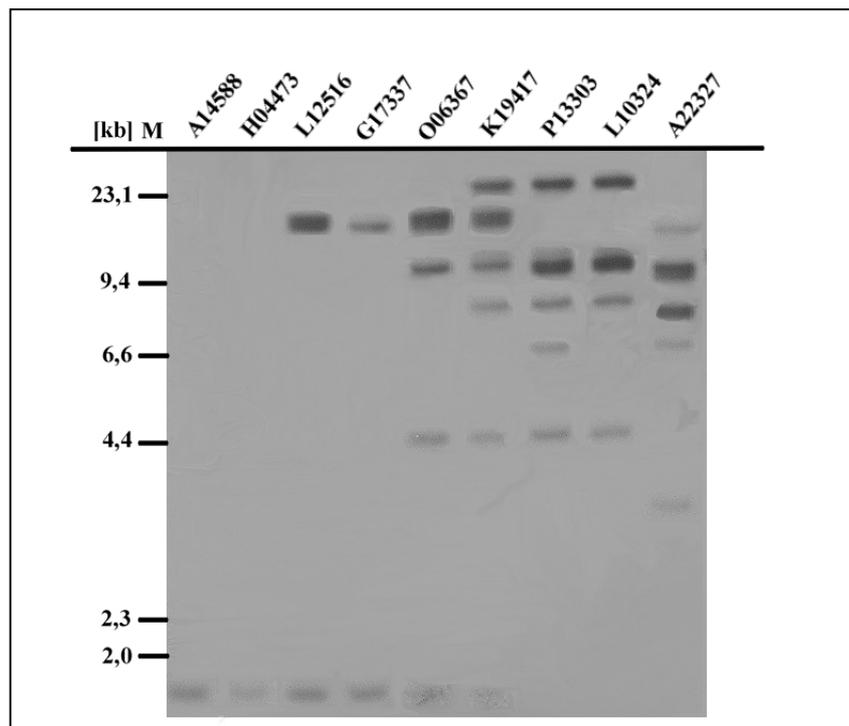


Abb. 16: Hybridisierung eines Southernblots, der Klone aus dem Contig 1 enthält, mit der Sonde aus dem cytoplasmatischen Teil eines klassischen Klasse-I-Gens. Links ist der Längenstandard angegeben.

Ausschließlich die PAC-Klone C2331 und C2341 zeigten eine Hybridisierung mit der Probe für das Gen *Pou5f1* (Rosner *et al.*, 1990) auf einer Laufhöhe von 900 bp (Abb. 14).

Die Kartierung des H2-Komplexes (Amadou *et al.*, 1999) sowie die Sequenzierung des humanen MHC (*The MHC Sequencing Consortium*, 1999) zeigen, daß zwischen dem *Pou5f1* und *Gna-rs1* (s. Abb. 23) keine Klasse-I-Gene zu finden sind. Diese Region enthält jedoch einige konservierte Gene an orthologer Position bei Maus und Mensch.

Um diese Region auch in der Ratte zu klonieren, wurde ein weiteres *Screening* der PAC-Bank mit Proben aus dem *CAK*-Gen und dem *GTF2H4*-Gen (4.2.) des humanen MHC (Forbes und

Trowsdale 1999) vorgenommen. Fünf positive Klone wurden erhalten: A24506, K11482, N0751, H13318 und D20510. Diese Klone wurden in der Zwischenzeit in der Abteilung Immungenetik weiter untersucht, und es wurde gezeigt, daß der PAC-Klon A24506 die Gene *Pou5f1*, *Tcf19*, *S*, *Gtf2* und *Cak* trägt. Die restlichen vier Klone tragen nur die Gene *Gtf2h4* und *Cak*.

4.3.1.1 Sequenzierung der Enden einiger PAC-Klone aus dem Contig 1

Es wurden Sequenzierungen der Enden aus einigen Klonen des Contigs 1 durchgeführt, um Sequenz-Informationen aus dieser Region zu erhalten und um *walking*-Proben (STS-Marker) zu erstellen.

Der PAC-Klon **A14588** wurde mit dem Vektor-spezifischen Primer pPAC4-3 direkt ansequenziert. Erhalten wurde eine Sequenz von ca. 500 bp. Diese zeigt Homologie zur bekannten Sequenz der β -Untereinheit der murinen Protein-Kinase CK2 (Boldyreff *et al.*, 1995). Diese Sequenz ist im 3'-utr des Gens lokalisiert, und die Sequenzidentität auf Nukleotid-Ebene liegt in verschiedenen Bereiche zwischen 87% und 94%. Aufgrund der Lokalisation des humanen und des Maus-CK2-Gens in der Klasse-III-Region muß es sich um das centromere Ende des PAC-Klons handeln, das ansequenziert wurde

Mit dem Vektor-spezifischen Primer pPAC4-3 und dem Klasse-Ia-spezifischen Primer RT1.A3' wurde durch *long range* PCR am PAC-Klon **G17337** ein 6 kb langes Fragment erhalten. Das positive PCR-Ergebnis zeigte zunächst, daß ein Klasse-I-Gen nah am telomeren Ende dieses Klons liegen muß. Sequenzierung mit dem pPAC4-3-Primer ergab eine lesbare Sequenz von 500 bp Länge ohne signifikante Homologie zu den in der Datenbank enthaltenen Sequenzen.

Aus der Endsequenzierung des centromeren Endes des Klons **C2331** wurde die Sequenz eines Klasse-I-Gens erhalten, die 90% Sequenzähnlichkeit zu einem LW2-ähnlichen Klasse I Gen (Yuan *et al.*, 1998) zeigt.

Die Sequenzierungsdaten sind im Anhang gezeigt (8.2)

4.3.1.2 11/3R-homologe Gene im Contig 1

Das Gen 11/3R (Rothermel *et al.*, 1993) ist ein Klasse-Ib-Gen der Ratte. Die genspezifische Probe 11/3R-5/1 aus dem NC2-Teil des 3'-utr wurde verwendet, um das Contig 1 nach 11/3R-verwandten Genen zu untersuchen. Im Contig 1 wurden sieben Klasse-I-Fragmente identifiziert, die mit dieser Probe hybridisierten die 18 kb-, 24 kb-, 12 kb-, 8 kb-, 6 kb-, 17 kb-, und 8,5 kb-*Bam*HI-Fragmente (Abb. 14, 17).

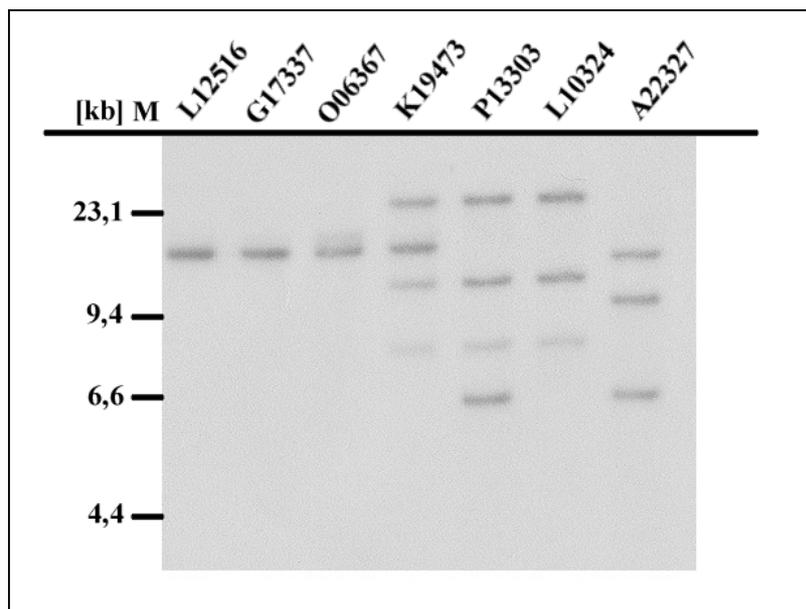


Abb. 17: Southernblot-Hybridisierung mit der 11/3R-5/1-Probe. Einige der $\alpha 3$ -hybridisierenden Fragmente reagieren mit dieser Probe. Sieben 11/3R-homologe Gene (Genfragmente) befinden sich im Contig 1. Links ist der Längenstandard angegeben.

4.3.1.3 Subklonierung und Teil-Sequenzierung einiger Klasse-I-Gene aus dem Contig 1

Zu Beginn der Untersuchungen der RT1-C/M-Region wurden die zuerst erhaltenen Klone A14588, G17337 und O06367 und damit die telomerwärts zu *Bat1* gelegenen ersten sechs Klasse-I-Gene eingehender analysiert. Dazu wurden die *Bam*HI-Fragmente des jeweiligen Klons in den pBluescript-Vektor subkloniert und die so erhaltenen Subbanken nach Klasse-I-Genen oder Genfragmenten *gescreent* (s. 3.12). Auf diesem Wege wurden folgende nach der Insertlänge bezeichneten Subklone isoliert:

1 kb	α 1-positives-Fragment des ersten Klasse-I-Gens auf dem Contig 1
1,8 kb	α 3-positives-Fragment des ersten Klasse-I-Gens auf dem Contig 1
2 kb	α 1-positives-Fragment des zweiten Klasse-I-Gens auf dem Contig 1
18 kb	α 3 positives-Fragment des zweiten Klasse-I-Gens auf dem Contig 1
19 kb	α 1/ α 3- und Promotor/Cyto- positives-Fragment
23 kb	α 1-positives Fragment
10 kb	α 1/ α 3- und Promotor/Cyto- positives-Fragment
4 kb	α 1/ α 3 und Cyto-positives Fragment

Die Reihenfolge dieser Gene auf dem Contig ist durch die dachziegelartige Überlappung der Klone leicht festzulegen. Das erste Klasse-I-Gen aus dem PAC-Klon A14588 wurde zusätzlich als 3,7 kb *Eco*RI-Fragment isoliert und subkloniert.

Weiterhin wurden aus den sechs oben erwähnten Genen bzw. Genfragmenten die Sequenzen aus dem Exon 2 des Klasse-I-Gens ermittelt.

In Abbildung 18 wurden diese Sequenzen mit der Sequenz zweier Klasse-I-Gene aus der *RT1-A*-Region und mit der von zweibereits bekannten Klasse-I-Gene der *RT1-C/M*-region verglichen. Die variablen Nukleotide wurden jeweils hervorgehoben.

1	18kbB	GGTACATGGAAAGTGGGCTACGTGGACGACACCGCAGTTTCGTGGCTACGACACCGGATGCAAGAAATCCGAGATACGAGCCCGGGGGCCGGT	90
2	RT1.Au	GGTTCAATCGCTGTCCGCTACGTGGACGACACCGGAGTTTCGTGGCTACGACACCGGATGCAAGAAATCCGAGGATGGAGCCCGGGCCGGT	90
3	10kbB	GGTTCAATCTCTGTCCGCTACGTGGACGACACCGGAGTTTCGTGGCTACGACACCGGATGCAAGAAATCCGAGATATGAGCCCGGGGGCCGGT	90
4	LW2	GGTTCAATTATCTGTCCGCTACGTGGACGACACCGGAGTTTCGTGGCTACGACACCGGAGAAATCCGAGATACGAGCCCGGGTTGGGT	90
5	3_7E	GGTTCAATGGAAAGTCCGGCTATGTGGACGACACCGGAGTTTCGTGGCTTCGACAGTCGACAGTCGACGGGAGAAATCCGAGATACGAGCCCGGGTTCCGGT	90
6	19kbB	GGTTCAATTATCTGTCCGCTACGTGGACGACACCGCAGTTCAATGGCTTCGACAGCGACGGGAGAAATCCGAGGATGGAGCCCGGGCCGGT	90
7	23kbB	GGTTCAATCTCTGTCCGCTACGTGGACGATACGGAGTTTCGTGCACTACGACACCGGACAGGAGAAATCCGAGGATGGAGCCCGGGAACGGCGGT	90
8	4kbB	GGTTCAATTATCTGTCCGGCTATGTGGACACACCGGAGTTTCGTGGCTACGACACCGGACGCAAGAAATCCGAGATACGAGCCCGGGCCGGT	90
9	RT1.A3n	GGTTCAATTATCTGTCCGCTACGTGGACGACAGGGAGTCAATGGCTTCGACAGCGACGGGAGAAATCCGAGGATGAAGCCTCGGGCCGGT	90
10	11/3	GGTTCAATCGAAAGTCCGCTACGTGGAGTGCACAGAGTTTCGTGGCTACGACACCGGAGAAATCCGAGATATGAGCCCGGGGGCCGGT	90
1	18kbB	GGATGGAGCGGGAGGGCCGGAGTATTGGGAGAGGGAGACCCAGAACGCCAAGAGAAAACGAGCAGGTTTACCAGTGGACCTGAGGACCG	180
2	RT1.Au	GGATGGAGCGGGAGGGCCGGAGTATTGGGAGCGGGAGACGCAGGGAGCCAAAGGACACGAGCAGGTGAACCGAGTGAACCTGAGGACCC	180
3	10kbB	GGATGGAGCGGGAGGGCCGGAGTATTGGGAGAGCCAGACAGAAGCCCAAGAGAAAACGAGCAGGTTTACCAGTGGACCTGAGTACCC	180
4	LW2	GGATGGAGCGGGAGGGTCCGGAGTATTGGGAGCGGGAGACACTGATGGTCAAGGAAAACGAGCAGGTTTACCAGTGGACCTGAGGACCC	180
5	3_7E	GGATGGAGCGGGCAGAGGCCCGGAGTATTGGGAGCGGGAGACGCAGGGAGCCAAAGAAAAGAGCAGACTTTCGAGTGAACCTGAGGACCC	180
6	19kbB	GGATGGAGCGGGAGGGCCGGGATATTGGGAGCAGAACACACGATGGGAAAGACAAGAGCAATGGTACCAGTGAACCTGAGGACCG	180
7	23kbB	GGTGGAGCGGGAGGGCCAGATATTGGGAGGAGGACGCAGAGCCAAAGAGAGGGAGCATGGTACCAGGAGCCCTGAGGAACC	180
8	4kbB	GGATGGAGCGGGAGGGCCGGAGTATTGGGAGACGACACAGATCCGTCAAGGACACGATGGAGTTCCGAGTGAACCTGAGGAATC	180
9	RT1.A3n	GGATGGAGCGGGAGGGCCGGAGTATTGGGAGCGGCAGACAGGAAGTCAAGGAAAAGAGCAGATTTCCGAGACAACTGAGGACCC	180
10	11/3	GGATGGAGCGGGAGGGGAACGGAGTATTGGGAGAGGGAGACAGGAGCAATATGTTCCGAGTGAACCTGAGGAATC	180
1	18kbB	TGCTCCGCTACTACAACCAGAG	202
2	RT1.Au	TGCGCGGCTACTACAACCAGAG	202
3	10kbB	TGCGAGGCTACTACAACCAGAG	202
4	LW2	TGCTCCGCTACTACAACCAGAG	202
5	3_7E	TGCTTGGCTACTACAACCAGAG	202
6	19kbB	CGCTCCGCTACTACAACCAGAG	202
7	23kbB	TGCGCAGCTACTACAACCAGAG	202
8	4kbB	TGCTTAGGCTACTACAACCAGAG	202
9	RT1.A3n	T-----	181
10	11/3	TGCGCGGCTACTACAACCAGAG	202

Abb. 19: Vergleich der Sequenz aus dem Exon 2 von Klasse-I-Gene des Contigs 1 und von zwei Klasse-I-Gene aus der RT1-A-Region und von zwei Klasse-I-Gene aus der RT1.C-Region. Eingrahmt sind die Sequenzen der RT1-A Gene (RT1.A3ⁿ, RT1.Aⁿ) und der RT1.C-Gene (LW2, 11/3). Die graue Schattierung kennzeichnet zwischen diesen Genen konservierte Nukleotide. In hellgrau sind die Positionen hervorgehoben, die eine Variabilität zeigen.

4.3.1.4 Sequenzhomologie der α 1-Domäne von Klasse-I-Genen des Contigs 1 zu anderen Klasse-I-Genen

Durch PCR an den erhaltenen Subklonen unter Verwendung der Exon 2-spezifischen Primer RT1.A3' und RT1.A7 wurden Produkte von 270 bp erhalten und sequenziert. Die Sequenzen wurden mit der Datenbank verglichen. Die ermittelte Sequenzidentität zu anderen Klasse-I-Genen wird in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Vergleich der Exon-2-Sequenz der sechs centromeren Klasse-I-Genen bzw. Genfragmente des Contigs 1 mit in der Datenbank vorhandenen Klasse-I-Sequenzen. Angegeben sind die jeweils höchste Sequenzidentität, die entsprechende Zugangs-Nummer für die homologe Sequenz in der Datenbank sowie die entsprechende Referenz.

Klasse-I-Gen bzw. Genfragment des Contigs 1 (Bezeichnung durch <i>Bam</i> HI- bzw. <i>Eco</i> RI-Restriktionsfragment)	Sequenzidentität in % (Länge der homologen Bereiche)	Homologes Gen	Accession number	Referenz
1. 1/1,8 <i>Bam</i>HI oder 3,7 <i>Eco</i>RI	99% (207/209 bp)	RT1-U ^c	AJ005022	Leong <i>et al.</i> , 1999
2. 2/18 <i>Bam</i>HI	99% (234/235 bp)	RT1-A2 ⁿ	X90376	Joly <i>et al.</i> , 1998
3. 19 kb <i>Bam</i>HI	90% (191/211 bp)	H2-Q8 (Maus)	U57392	Weiss <i>et al.</i> , 1984
	88% (216/244bp)	RT1-A1 ^h	AJ249698	

4. 23 kb <i>Bam</i>HI	88% (177/201bp)	RT1-A ^u	X82669	Walter <i>et al.</i> , 1995
5. 10 kb <i>Bam</i>HI	95% (199/209bp)	RT1-A1 ^k	AJ249702	
	93% (196/209bp)	RT1-A1 ^b	AJ2449704	
6. 4 kb <i>Bam</i>HI	100% (202/202bp)	RT1.E ^g	AJ243338	
	100% (202/202bp)	<i>clone 4</i>	U50447	Wang <i>et al.</i> , 1996

Aus den aufgeführten Daten in Tab. 4 ist erkennbar, daß die bisher teilweise sequenzierten Klasse-I-Gene des Contigs 1 eine größere Homologie (zumindest im Exon 2) zu den Klasse-I-Genen der *RT1-A*-Region als zu denen des Contigs 2 (siehe 4.3.2.1) zeigen.

4.3.2 Beschreibung von Contig 2

Mehrere der PAC-Klone aus dem $\alpha 1$ - und $\alpha 3$ -*Screening* (s. Anhang Tab. 9, 10) könnten zu einem zweiten Contig geordnet werden (Contig 2), das eine Länge von ca. 1300 kb (1,3 Mb) beträgt. Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wurde das Contig 2 in drei Abschnitte behandelt. In dem ersten Abschnitt wurden die ersten ca. 500 kb des Contig 2, in dem zweiten Abschnitt die darauffolgenden ca. 400 kb und in dem dritten Abschnitt die letzten ca. 400 kb beschrieben.

4.3.2.1 Contig 2, erster Abschnitt

Im ersten Abschnitt (centromeres Ende) des Contigs 2 konnten 29 überlappende Klasse-I-Gen-tragende Klone anhand des $\alpha 1/\alpha 3$ -Hybridisierungsmusters angeordnet werden.

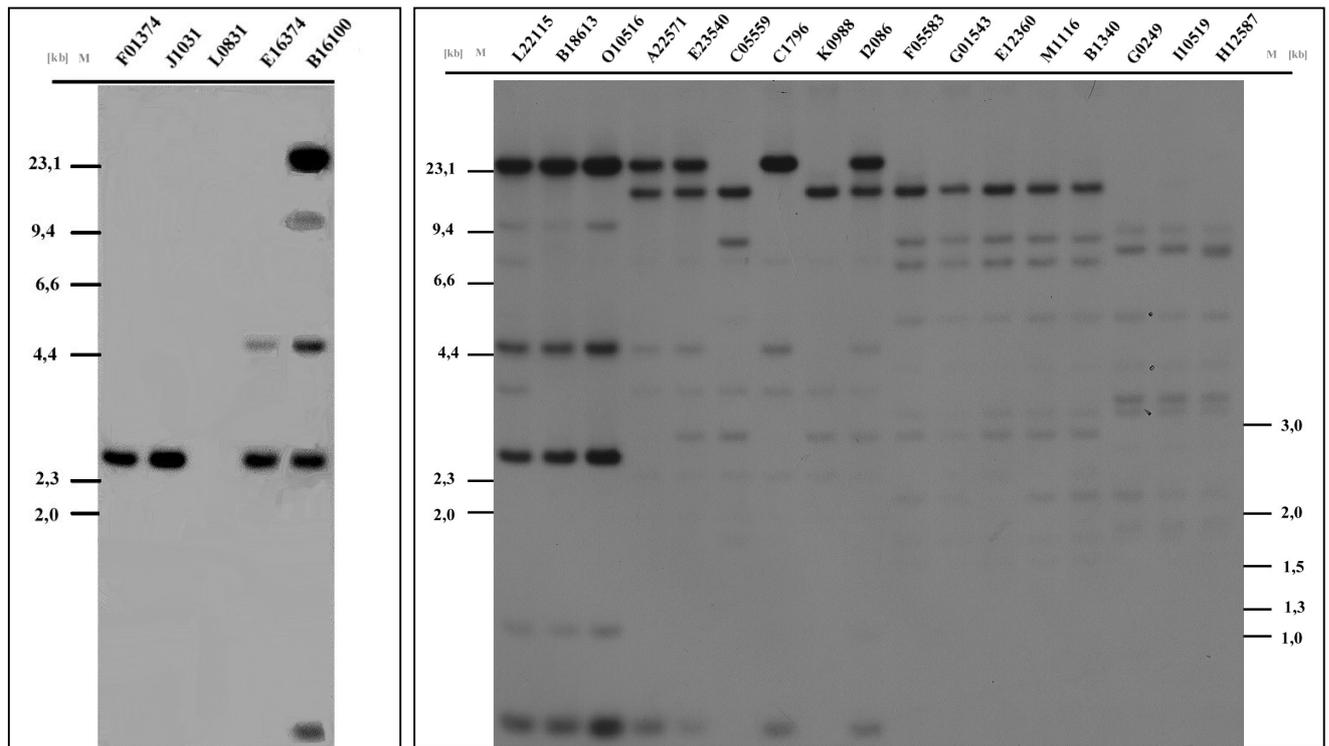


Abb. 19: Southernblot-Hybridisierung mit der $\alpha 1$ -Probe. Die telomerwärts liegenden PAC-Klone (s. Abb. 21) zeigen eine große Anzahl mit der $\alpha 1$ -Probe schwach hybridisierender Fragmente. Links und rechts sind die Längenstandards angegeben.

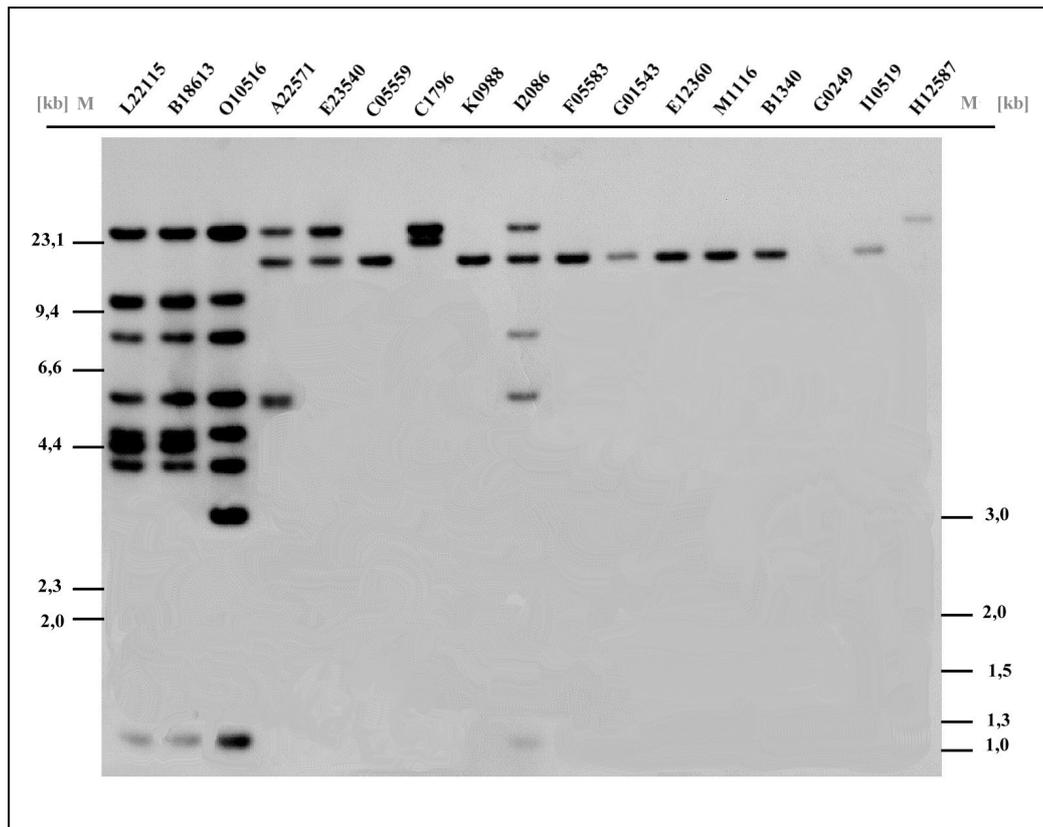


Abb. 20: Southernblot-Hybridisierung mit der $\alpha 3$ -Probe. Auffällig ist, daß die telomerwärts liegenden PAC-Klone (Abb. 21) nur ein $\alpha 3$ -hybridisierendes Fragment tragen oder überhaupt keine $\alpha 3$ -Hybridisierung zeigen. Links und rechts sind die Längenstandards angegeben.

Die Hybridisierungs-Ergebnisse mit den $\alpha 1$ - bzw. $\alpha 3$ -Proben zeigen, daß über eine längere Region am telomeren Ende des ersten Abschnitts von Contigs 2 keine $\alpha 3$ -Fragmente zu finden sind, jedoch eine größere Anzahl an $\alpha 1$ -hybridisierenden Fragmenten (s. 4.3.2.2).

Tab. 5: PAC-Klone, die den ersten Abschnitt von Contig 2 bilden. Die Koordinaten der Klone aus der genomischen Bank werden angegeben sowie alle überprüften Hybridisierungen mit Klasse-I-Proben, und Proben von Anker-Genen sowie STS- Markern.

	PAC	Filter Nr.	Koordinaten	Länge der mit der $\alpha 1$ -Probe hybridisierenden Fragmente [kb]	Länge der mit der $\alpha 3$ -Probe hybridisierenden Fragmente [kb]	Hybridisierung mit Anker Proben	STS-Marker
1	E06479	110-7-107	95 220, 92 219	—	—	<i>Prg1</i>	

2	F05479	110-7-107	100 215, 97 214	_____	_____	<i>Prgl</i>	
3	I16223	110-4-122	44 116, 41 116	_____	_____	<i>Pnuts</i> <i>Gna-rs1</i>	I162T
4	I19108	110-2-127	147 118, 147 116	_____	8/10	<i>Pnuts</i> <i>Gna-rs1</i>	I162T
5	I16274	110-4-122	45 38, 42 37	_____	8/10/4,4	<i>Pnuts</i> <i>Gna-rs1</i>	I162T
6	F01374	110-6-116	239 54	2,5	8/10/4,4	<i>Pnuts</i> <i>Gna-rs1</i>	I162T
7	J1031	110-1-116	72 111, 72 113	2,5	8/10/4,4	<i>Pnuts</i> <i>Gna-rs1</i>	I162T
8	E16374	110-6-116	164 59	2,5/4,6	8/10/4,4/4,6	<i>Pnuts</i> <i>Gna-rs1</i>	I162T
9	P05384	110-9-122	205 152, 203 151	4,6/12	4,6/4/12/7,5		
10	B16100	110-2-127	42 75, 45 74	2,5/4,6/12/0,5/ 24	10/4,4/4,6/4/12/ 7,5/1/5/24		
11	B18613	110-9-122	34 153, 31 154	2,5/4,6/12/0,5/ 24	4,4/4,6/4/12/ 7,5/1/5/24		
12	L22115	110-2-127	15 105, 12 104	2,5/4,6/12/0,5/ 24/4,6/3,5	4,4/4,6/4/12/ 7,5/1/5/24		

13	O10516	110-7-158	194 86, 191 86	2,5/4,6/12/0,5/ 24	3an/4,6/4/12/ 7,5/1/5/24		
14	C1796	110-2-127	159 150, 158 147	0,5/24/4,6/3,5/ 2,3	5/24		
15	I2086	110-2-127	144 39, 145 36	0,5/24/4,6/3,5/ 2,3/20/2,8	5/24/20/7		
16	A22571	110-7-158	15 157, 13 156	0,5/24/4,6/3,5/ 2,3/20	5/24/20		
17	E23540	110-7-158	127 138, 127 136	0,5/24/4,6/3,5/ 2,3/20/2,8	24/20		
18	E22540	110-7-158	132 138, 132 136	0,5/24/4,6/3,5/ 2,3/20/2,8	24/20		
19	K0988	110-2-127	80 26, 79 29	3,5/2,3/20/2,8	20/7		
20	C05559	110-7-158	100 148, 97 147	3,5/2,3/20/2,8/ 8/5/1,7	20/7		
21	E12360	110-5-134	185 137, 183 136	2,3/20/2,8/8/5/ 1,7/1,5/3,2	20/7		
22	B1340	110-1-116	59 73, 56 74	2,3/20/2,8/8/5/ 1,7/1,5/3,2/3,8/ 2,1	20/7		
23	F05583	110-9-122	99 131, 96 131	20/2,8/8/5/1,7/ 1,5/3,2/3,8/2,1	20/7		

24	G01543	110-7-158	239 208, 236 209	20/2,8/8/5/1,7/ 1,5/3,2/3,8/2,1	20/7		
25	M11116	110-2-127	190 20, 187 19	20/2,8/8/5/1,7/ 1,5/3,2/3,8/2,1	20/7		
26	P05116	110-2-127	220 5, 217 4	2,3/20/2,8/8/5/ 1,7/1,5/3,2/3,8	20/7		
27	N12311	110-5-143	63 172, 64 175	5/1,7/1,5/3,2/ 3,8/2,1/7,5/7,6/1, 9/10	_____		
28	J02139	110-2-127	115 112, 113 111	5/1,7/1,5/3,2/ 3,8/2,1/7,5/7,6/ 1,9/10/11	_____		
29	P04519	110-8-104	225 161, 224 164	5/1,7/1,5/3,2/ 3,8/2,1/7,5/7,6/ 1,9/10/11	_____		
30	E14284	110-4-131	175 57, 173 56	5/1,7/1,5/3,2/ 3,8/2,1/7,5/7,6/ 1,9/10/11	_____		
31	B08610	110-9-138	205 152, 203 151	5/1,7/1,5/3,2/ 3,8/2,1/7,5/7,6/ 1,9/10/11	_____		
32	A02552	110-8-104	235 160, 232 159	5/1,7/1,5/3,2/3,8/ 2,1/7,5/7,6/1,9/1 0/11	_____		

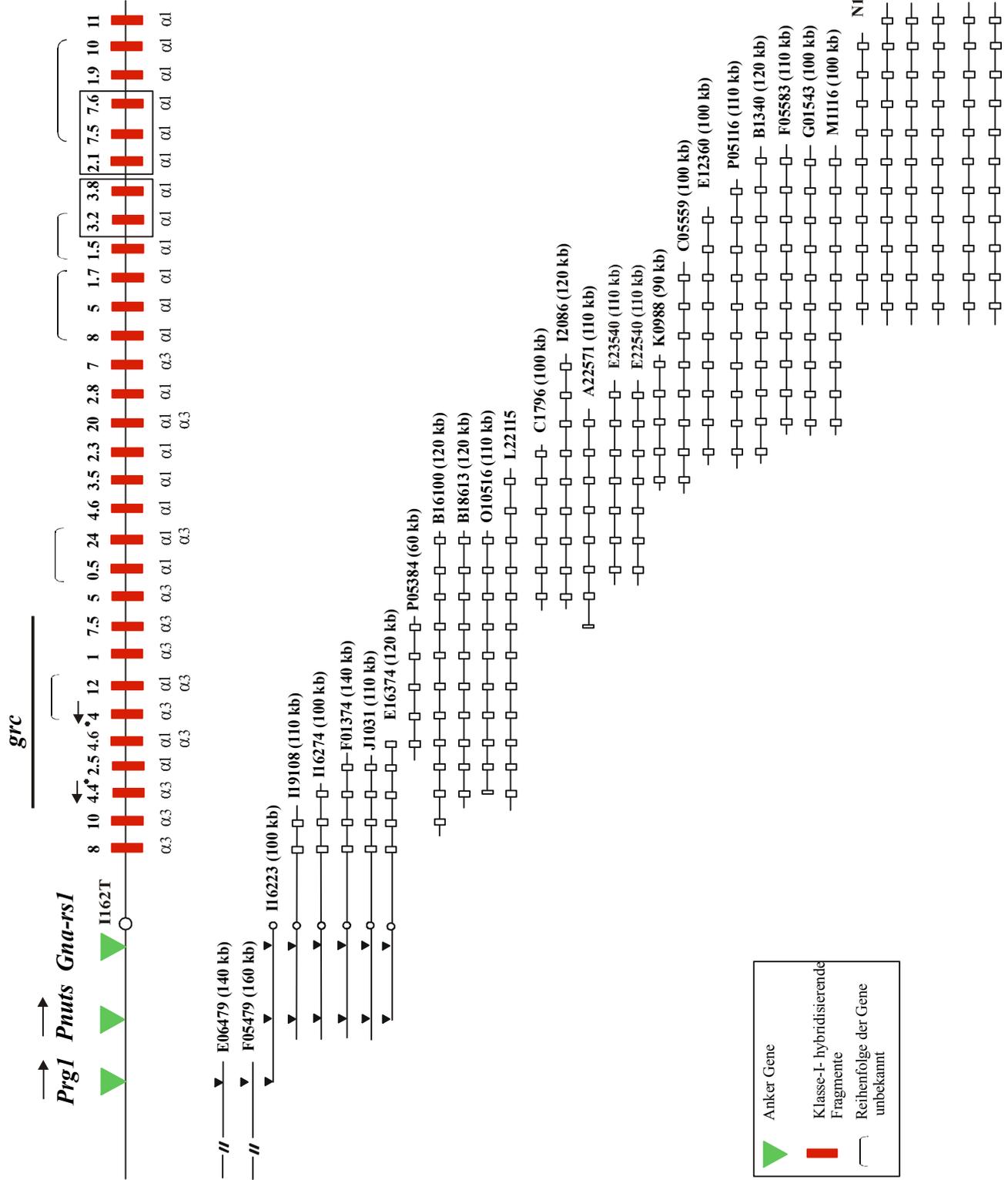


Abb. 21: Schematische Darstellung des ersten Abschnitts von Contigs 2 mit den überlappenden PAC-Klonen. Die offenen Kästchen stellen Klasse-I-Fragmente und die schwarzen Dreiecke die Anker Gene auf die einzelnen PAC-Klone dar. Der Balken zeigt den Bereich, über den sich die grc-Region erstreckt.

4.3.2.1.1 Die *grc*-Region

Alle erhaltenen PAC-Klone aus dem α 1-*Screening* der PAC-Bank wurden auf Southernblots mit der *grc*-Probe (Salgar *et al.*, 1997) hybridisiert. Die *grc*-Region des Ratten-MHC enthält rezessive Gene, die Sterilität der männlichen Individuen sowie reduzierte Fertilität der Weibchen verursachen, die Körpergröße reduzieren und die Suszeptibilität für chemisch induzierte Tumoren erhöhen (Gill *et al.*, 1979). Frühere Studien haben gezeigt, daß der *grc*-Phänotyp auftritt, wenn eine bestimmte Deletion von ca. 70 kb (Cortese Hasset *et al.*, 1989) im MHC vorliegt. Bei *grc*-positiven Tiere fehlt der oben genannte Phänotyp. Die Gene, die diesen Phänotyp verursachen, sind noch nicht identifiziert.

Einige der Klone, die am centromeren Ende des ersten Abschnitts von Contigs 2 liegen, hybridisieren mit der *grc*-Probe. Das Muster dieser Hybridisierung ist in Abbildung 22 gezeigt.

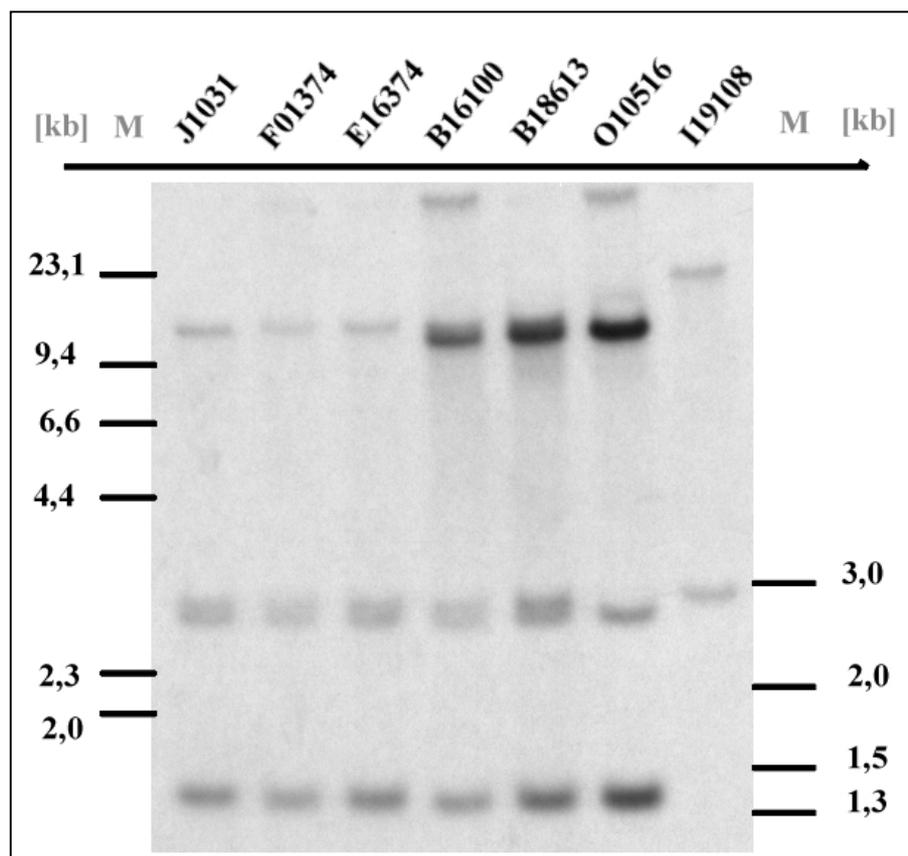


Abb. 24: Southernblot-Hybridisierung mit der *grc*-Probe. Bei dem Klon I19108 tritt zusätzlich ein Fragment von ca. 24 kb auf. Dieses ist artifizuell, da es auch mit dem Vektor hybridisiert. Links und rechts sind die Längenstandards angegeben.

Die Überlappung der *grc*-positive Fragmente tragenden PAC-Klone ist in Abb. 23 zusammengefasst.

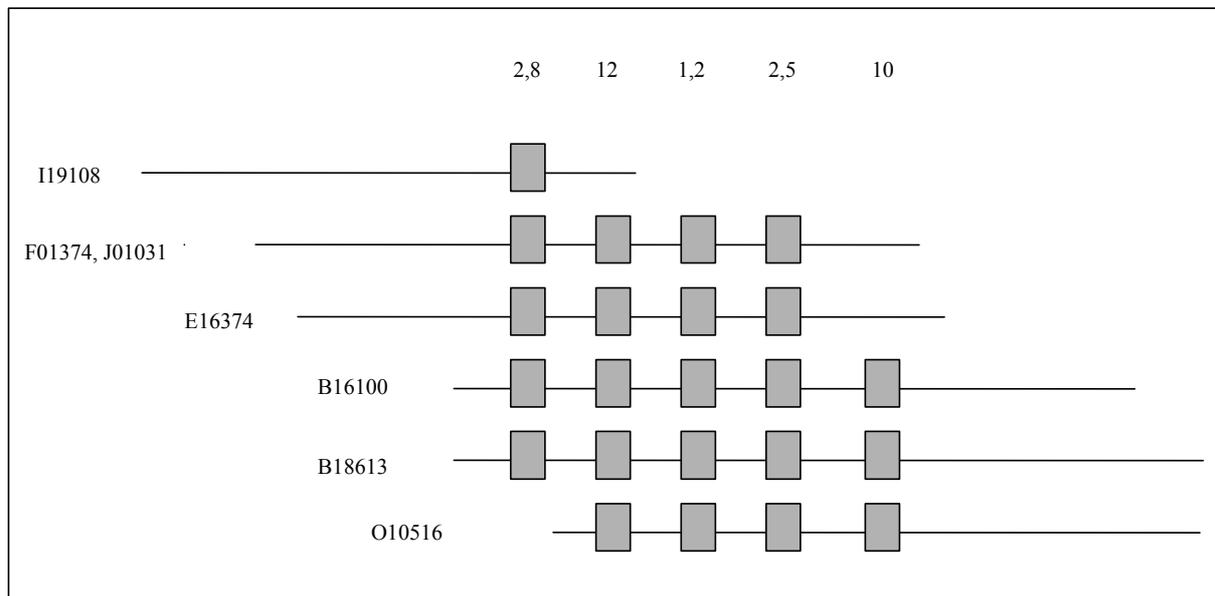


Abb. 23: Schematische Darstellung der *grc*-positiven PAC-Klone.. Die grauen Kästchen stellen die *Bam*HI-Fragmente dar, die mit der *grc*-Sonde hybridisieren. Darüber ist deren Länge in kb angegeben.

Anhand dieser Daten ist die *grc*-Region in der BN-Ratte genau zu kartieren. Aus den hier gezeigten Kartierungs-Daten umfasst die *grc*-Region einen Bereich von ca. 70 kb, wie von Cortese Hasset *et al.* (1989) beschrieben. In der Region sind sieben Klasse-I-Gene zu finden, unter diesen *RT.BMI* (4,4 *Bam*HI-Fragment), sowie ein H2-T2 ähnliches Gen (4,0 kb *Bam*HI). Die Orientierung beider Gene ist der Abbildung 21 zu entnehmen. Das *RT.BMI*-Gen wurde auch von Salgar *et al.* (1998) in die Nähe der *grc*-Region kartiert.

4.3.2.1.2 *RT.BMI*-Gene

Um die *RT.BMI*-Gene identifizieren zu können, wurde eine Probe aus der nicht codierenden-Region des Gens (Parker *et al.*, 1990) generiert. Die 1 kb lange Probe (s. 4.2.2) wurde zur Überprüfung der PAC-Klone als Sonde eingesetzt. Positive Hybridisierungs-Banden zeigten die Klone F01374, J1031, E16374, B16100, B16100, B18613, und zwar in der Länge 4,4 kb und 2,8 kb (Abb. 24). Der Klon O10516 zeigt eine hybridisierende Bande einer Länge von 3 kb. Das 4,4-kb-Fragment ist hier angeschnitten. Durch die Endsequenzierung dieses Klons wurde an dessen centromerem Ende eine Sequenz erhalten, die der Sequenz in der nicht codierenden Region des *RT1-S3*-Gens entspricht und einen Mikrosatelliten und der Länge von

134 bp trägt, der in der nicht codierenden Region des *RT1-S3*-Gens (Salgar *et al.*, 1998) vorkommt.

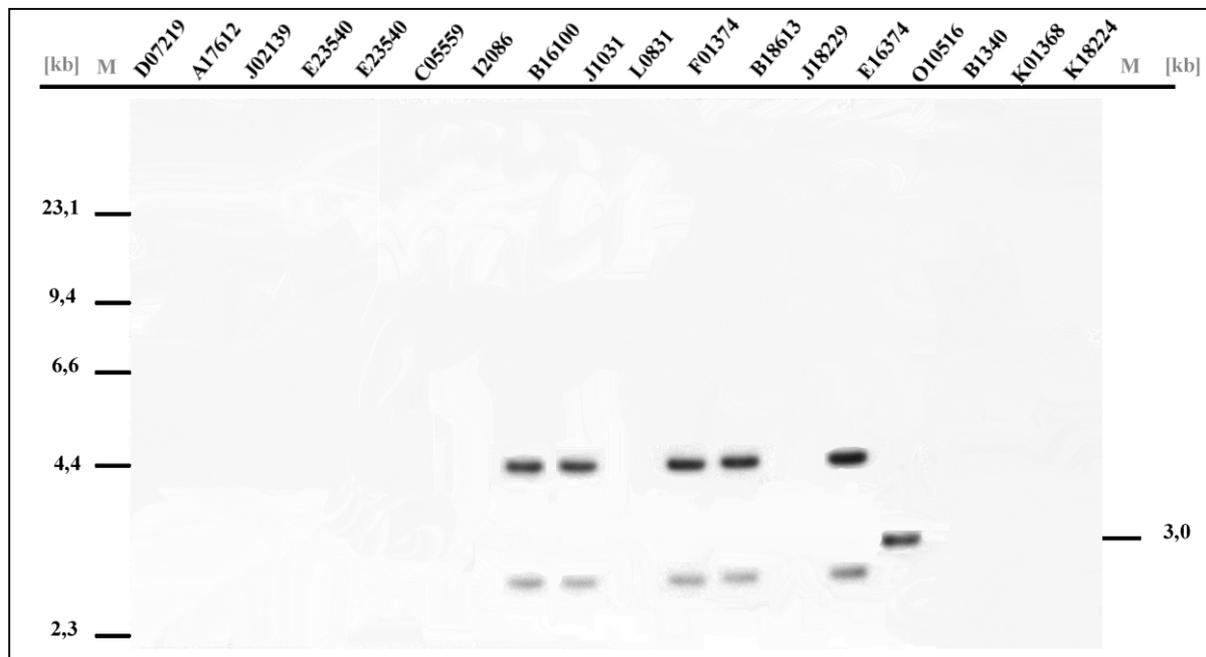


Abb. 24: Southernblot-Hybridisierung der PAC-Klone des ersten Abschnittes von Contigs 2 mit der *BMI*-Probe. Die zwei hybridisierenden Fragmente deuten auf die Existenz von zwei *RT.BMI*-Genen hin. Beim Klon O10516 tritt ein 3 kb langes Fragment auf. Durch Ansequenzieren dieses Klones wurde gezeigt, daß es sich um ein angeschnittenes *RT.BMI*-Gen sich handelt. Links und rechts ist der Längenstandard angegeben.

4.3.2.1.3 „Anker-Gene“ des Contigs 2 im ersten Abschnitt

Durch die Endsequenzierung des Klones E16374 wurde eine Sequenz ermittelt, die identisch mit einem Teil der codierenden Region des *Pnuts*-Gens (*phosphatase I nuclear targeting subunit*) (Allen *et al.*, 1998) ist. Durch Analyse der benachbarten Klone mit *Pnuts* spezifischen Primern, konnte durch PCR festgestellt werden, daß es sich um das centromere Ende des Klones handelt. Somit wurde dieses Gen in der Ratte feinkartiert und konnte außerdem als Marker verwendet werden.

Aus der Endsequenzierung des Klones I16223 wurde an dessen centromerem Ende ein weiteres Gen identifiziert. Es handelt sich hier um das Gen *Prg1* (Schäfer *et al.*, 1996), dessen Genprodukt homolog zum gly96 Protein der Maus ist und ein durch Wachstumsfaktoren induzierbares kurzlebige glykolyisiertes Protein darstellt.

Mit einer Probe aus dem *Prg1*-Gen wurde die PAC-Bank *gescreent*, und zwei weitere *PRG1*-positive Klone konnten erhalten werden (E06479, F05479). Die Hybridisierung mit der *Prg1*-Probe zeigt zwei hybridisierende Banden auf der Höhe von 4,0 und 4,6 kb. Diese Klone erstrecken sich in vom Contig 2 ca. 140 kb centromerwärts. Die noch vorhandene Lücke zwischen den *Cak*-positiven Klonen (Ende von Contig 1) und *Prg1*-positiven Klonen dürfte mit einem *Screening* der Bank anhand einer *walking*-Probe zu schließen sein, denn im MHC des Menschen besteht zwischen diesen beiden Genen nur ein Abstand von ca. 150 kb. Der Abstand zwischen dem *Pou5f1* und dem *HSR1* (*Gna-rs1*)-Gen beträgt beim Mensch 608 kb (*The MHC Sequencing Consortium*, 1999). Bei der Maus ist diese Region zwischen *Pou5f1* und *Gna-rs1* kürzer und beträgt insgesamt ca. 300 kb (Amadou *et al.*, 1999).

Am telomeren Ende diesen ersten Abschnitts von Contig 2 ist eine Region von ca. 100 kb zu beobachten, die nur $\alpha 1$ - hybridisierende Fragmente aufweist.

4.3.2.2 Contig 2, zweiter Abschnitt

Die oben genannte Region, die nur $\alpha 1$ - hybridisierende Fragmente aufweist, setzt sich über eine Länge von weiteren ca. 150 kb fort. Insgesamt kommen in diesem Bereich des Contig 2, 25 ausschließlich $\alpha 1$ -hybridisierende Fragmente vor in einer gesamten Länge von ca. 250 kb. Bei dem 11 kb langen Fragment am Ende der Abbildung 21 und am Beginn der Abbildung 30 handelt es sich um dasselbe Fragment. Eine gesamt Übersicht der erstellten Contigs ist im Anhang (?) zu sehen. Um diese Fragmente näher zu charakterisieren, wurde zunächst der PAC-Klon H12587 in den Bluescript KS+-Vektor subkloniert. Aus der erhaltenen Subbank wurden durch Kolonie-*Screening* (3.12) die Klone isoliert, die mit der $\alpha 1$ -Probe hybridisierten. Zwei dieser Subklone mit einer Insert-Länge von 2,1 kb (Klon 24) bzw. 3,4 kb (Klon 14) wurden isoliert und mit vektorspezifischen Primern (M13(-20) und M13N) von beiden Seiten ansequenziert. Bei dem Klon 24 konnte mit dem Primer M13(-20) ein kurzer Abschnitt eines Klasse-I-Gens erhalten werden, welches dem 3'-Ende des Exons 2 ($\alpha 1$ -Domäne) entspricht (Abb. 25). Dieses Fragment der Exon 2-Sequenz ist von anonymer Sequenz flankiert.

RT1.A ^u	cgagcaggtgaa
Klon 24.....	agagcagacctt
ccGAGTGAACCTGAGGTGCGCGG- CTA CTA ACCCCAACCAGAGCGAGGGCG	
agGAGTGAACCTGAGGT CCCTGCTGAAGTTACTACA ACCAGAGCCAGGGCC	
gtgagtgaccccggtcggaggtcagaccct	
aggacctctctgctt cactag gtaagggactgaga	

Abb. 25: Vergleich der Teilsequenz aus dem Exon 2 des Klasse-I-Gens RT1.A^u und der erhaltenen Sequenz aus dem Klon 24 des PAC-Klones H12587. Die Sequenz aus dem Subklon 24 zeigt Homologie zu dem 3'-Ende des Exons. Diese Sequenz ist durch fett gedruckte große Buchstaben markiert.

Zusätzlich wurde 84% Sequenzidentität zum BAC-Klon citb585c7 (AC005807) aus der H2-T-Region der Maus gefunden. Ansequenzieren des Klones 14 mit dem Primer M13r ergab ebenfalls eine homologe Sequenz zu einem Bereich des Maus BAC-Klones citb585c7.

Aus dem Exon 2 des RT1-A^u-Gens wurden zwei Proben erstellt, von denen die eine die 5'-wärts und die andere die 3'-wärts gelegene Hälfte des Exons 2 enthält (4.2.1). Diese Proben wurden einzeln verwendet um die Exon 2-reichen PAC-Klone zu hybridisieren. Die Hybridisierung zeigte, daß die Probe aus der 5'-Hälfte des Exons, im Gegensatz zur Probe aus der 3'-Hälfte, nicht mit den -Exon-2-Fragmenten reagiert. Damit wurde gezeigt, daß es sich bei den Exon-2-Fragmenten dieser Region offensichtlich um ganz ähnliche Gen-Fragmente handelt.

Die Abbildung 26 zeigt die Restriktionsanalyse einiger PAC-Klone, die nur α 1-Hybridisierung aufweisen.

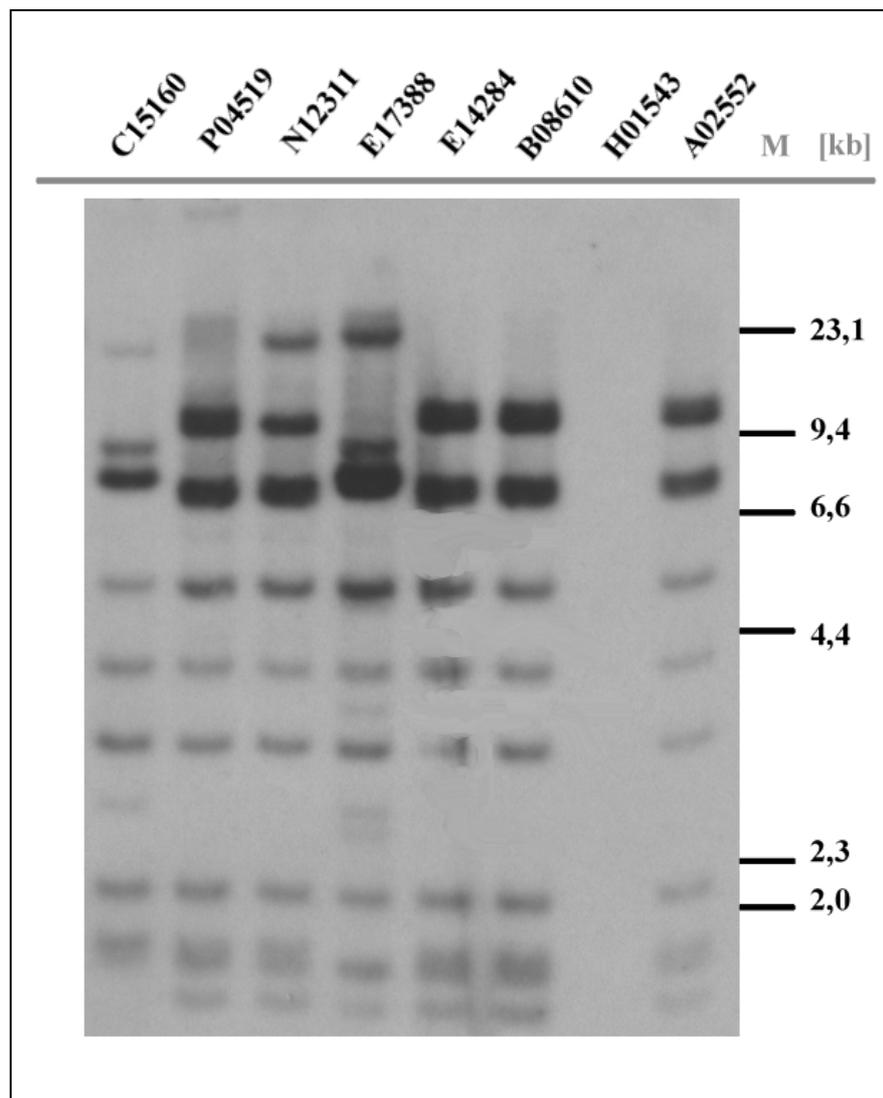


Abb. 26: Southerblotanalyse der der *Bam*HI-gespaltenen PAC-Klone die nur mit der α 1-Probe hybridisieren. Der Klon H01543 ist ein falsch-positiver Klon aus dem ursprünglichen *Screening* der PAC-Bank. Rechts ist der Längenstandard angegeben.

Der zweite Abschnitt des Contig 2 wurde aus insgesamt 30 PAC-Klonen zusammengestellt. Die größte Anzahl dieser Klone wurde aus dem α 3-*Screening* (Anhang ?) erhalten. In Abb. 27 ist das Hybridisierungsmuster mit der α 3-Probe der *Bam*HI-Restriktionsspaltung einer großen Anzahl aus den PAC-Klonen dieser Region des Contig 2 dargestellt. Der Klon I1448 (s.auch Abb.30) enthält keine Klasse-I-hybridisierende-Fragmente und wurde aus einem Sonder *Screening* der PAC-Bank mit dem STS-Marker der Maus 255D16T erhalten. Die hybridisierungs-Fragmente des Klones G03460 mit der α 3-Probe sind auf diesem Blot nicht deutlich zu sehen aufgrund der geringen DNA Menge. Die aufgeführten Klasse-I-Fragmente

im Bezug auf diesem Klon (s. Abb. 30) basieren auf die Daten eines weiteren Blots (nicht gezeigt). Der Klon I16274 wurde im ersten Abschnitt des Contigs 2 gezeigt, an seinem centromeren Ende (s. Abb. 21). Letztlich der Klon A05218 ist dem telomeren Ende des Contigs 2 zugewiesen (s. Abb. 32) aufgrund seiner Positivität mit der RT1-M3-Probe.

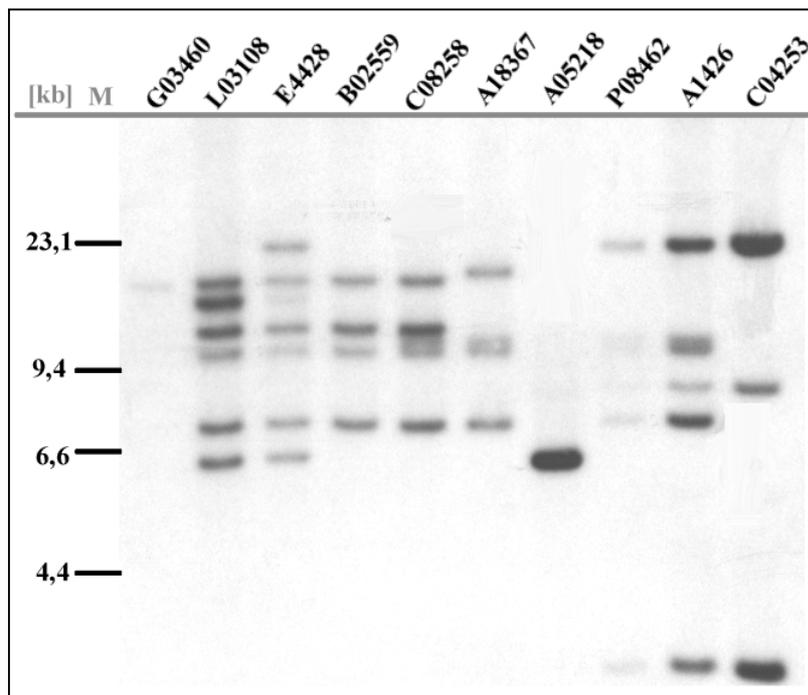
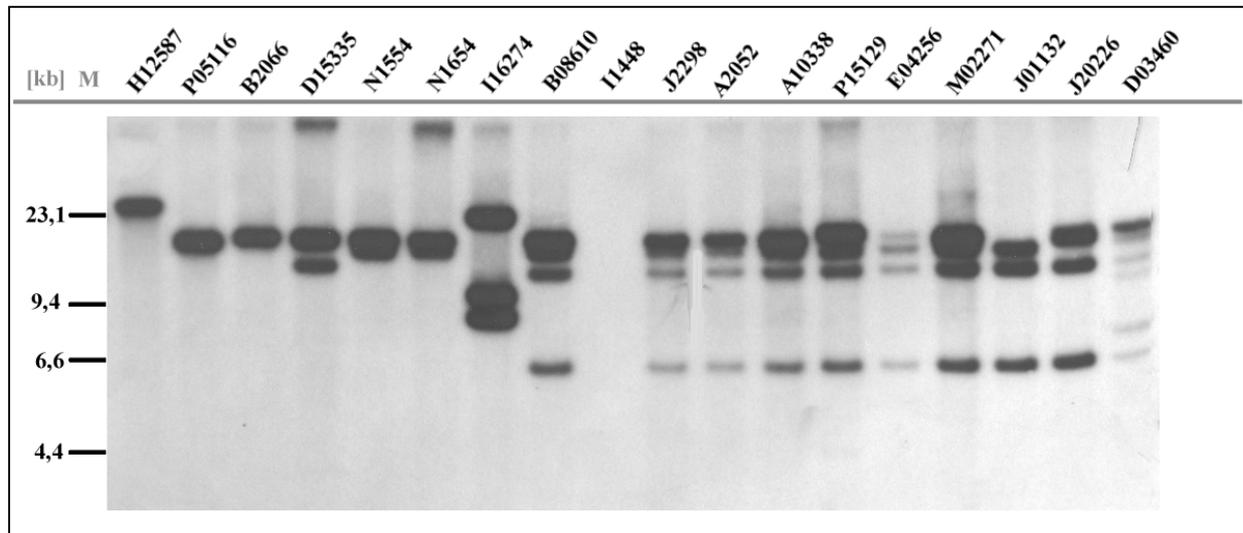


Abb. 27: Southernblot-Hybridisierung der *Bam*HI-gespaltenen PAC-Klone aus dem zweiten Abschnitt des Contigs 2 mit der α 3-Probe. Der Klon H12587 enthält eine artifizielle >23 kb Bande, auf der zusätzlich zu einem Klasse-I-Gen auch der PAC-Vektor nachgewiesen wurde (nicht gezeigt). Die Klone I16274 und A05218 gehören nicht diesem Contig an (s. Text). Links ist der Längenstandard angegeben.

Die bereits besprochene Exon-2-reiche Region folgt eine Region mit ausschließlich α 3-hybridisierenden Fragmenten. Diese Region könnte dem Anfang der H2-M-Region der Maus entsprechen (Jones *et al.*, 1999). Im Bereich des Exon 2 zeigen H2-M-Gene geringere Homologie zu anderen Klasse-I-Genen. Dieses kann der Grund für die fehlende Hybridisierung mit der α 1-Probe sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese Gene der Ratte nicht näher untersucht.

Eine weiterer Ansatz, die Homologie oder sogar die Orthologie dieser Region des Ratten-MHC zu der H2-M-Region der Maus zu überprüfen, bestand darin, die Ratten-PAC-Klone mit bestimmten STS-Markern aus der H2-M-Region zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde der STS-Marker 255D16T ausgewählt, welcher am centromeren Ende der H2-M-Region lokalisiert ist. Zwei weitere STS-Marker der Maus, 261A5T und 261A5S, die ca. 200 kb telomerwärts von 255D16T lokalisiert sind, wurden ebenfalls verwendet.

Die Hybridisierung mit der 255D16T-Probe ergab eine Reihe von positiven Klone. Es zeigte sich eine Hybridisierungs-Bande von ca. 15 kb bei den PAC-Klonen B08610, J2298, M02271, A2052, A10338, J01131, J20226, E04256, P15129, D03460, G03460, L03108, E4428 und B02559. Aus einem separaten *Screening* mit der Probe 255D16T wurde zusätzlich der Klon I1448 erhalten, der zwar den Marker, aber kein Klasse-I-Gen trägt. Durch Vergleich der STS-hybridisierenden und nicht hybridisierenden PAC-Klone war es möglich, diesen Marker auf den Ratten-PAC-Contig 2 zwischen den Klasse-I-Gen-BamHI-Fragmenten von 6 und 13 kb zu identifizieren. In der Abbildung 30 wurde die Lokalisation dieses Markers mit einem schwarz gefüllten Kreis dargestellt. Die Hybridisierung mit den STS-Markern 261A5T und 261A5S ergab ebenfalls positive Klone. Beide Marker kartieren im Bereich zwischen dem 255D16T-Marker und den 7 kb- bzw. 11 kb-Klasse-I-Genen (Abb. 30).

In den Abbildungen 28 und 29 sind jeweils die Hybridisierungs-Banden mit den Markern 261A5T und 261A5S zu sehen.

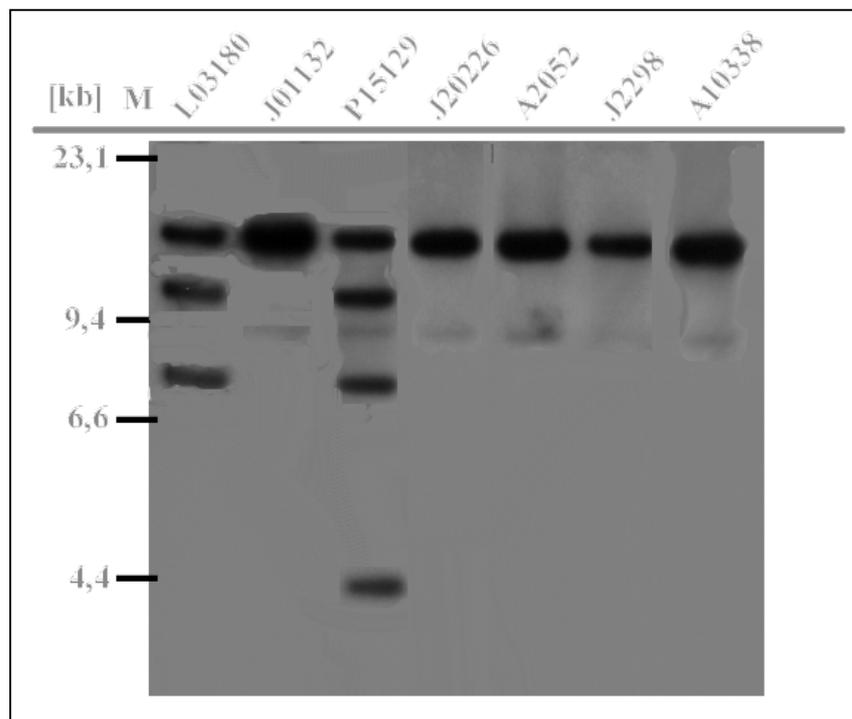
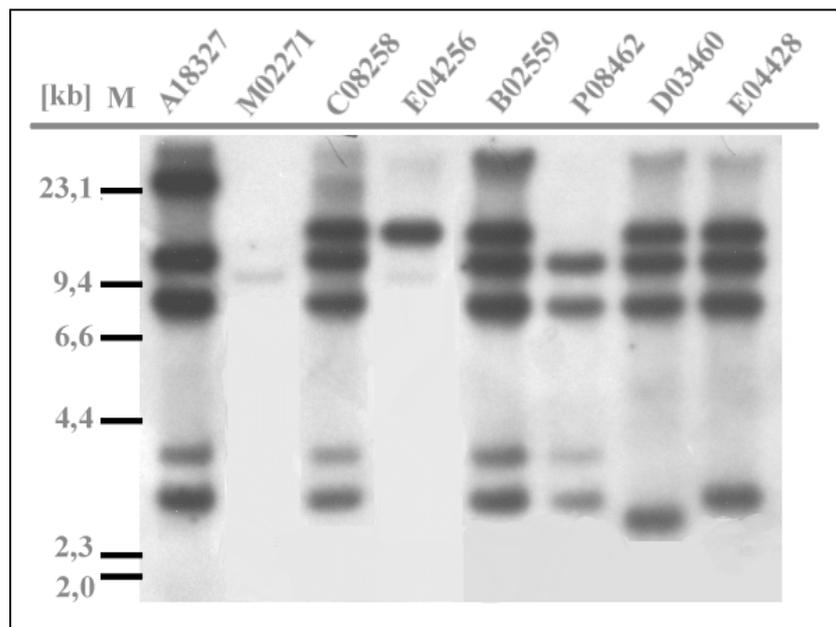


Abb. 28: Southernblot-Hybridisierung *Bam*HI-geschnittener DNA von verschiedenen PAC-Klonen des Contigs 2 (Abschnitt 2) mit dem STS-Marker 261A5T. Die mehrfach hybridisierenden Banden einiger Klone deutet darauf hin, daß in der Ratte diese Sequenz als mehrfache Kopie vorliegt. Links ist der Längenstandard angegeben.

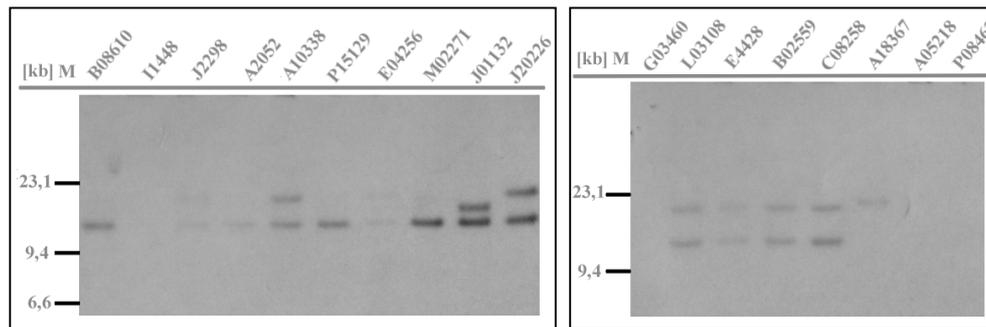


Abb. 29: Southernblot-Hybridisierung *Bam*HI-gespaltener PAC-DNA des Contig 2 (zweiter Abschnitt) mit der 261A5S-Probe. Bei den PAC-Klonen J2298 und E04256 gibt es zwei hybridisierende Banden. Auf dieser Abbildung sind diese aufgrund der schwachen Intensität schwer erkennbar. Links ist der Längenstandard angegeben.

Die Endsequenzierung des Klones J2298 führte zur Identifikation eines Mikrosatelliten (4.2.2), der zur Überprüfung der PAC-Klone verwendet wurde. Weitere Klone, die diesen Mikrosatelliten tragen, sind H12587, G0249, I10519, B2066, D15335, N1554, N1654 und B08610. Die Positivität dieser Klone wurde teilweise durch Hybridisierung und teilweise durch PCR nachgewiesen. Die entsprechenden Primer wurden an der flankierenden Sequenz definiert. Zur Hybridisierung wurde das 100 bp PCR-Produkt verwendet.

Bei einigen der Klone treten Fragmente auf, deren Länge >20 kb ist. In diesen Fällen ist die *Bam*HI-Schnittstelle an der Klonierungsstelle nicht mehr vorhanden, so daß nach der Restriktionsspaltung der Klone mit *Bam*HI ein Fragment entsteht, in dem der Vektor pPAC4 enthalten ist. Über die Auftrennung mit einer herkömmlichen Gelelektrophorese kann die genaue Länge solcher Fragmente nicht definiert werden, da oberhalb von 20 kb Länge keine gute Auftrennung möglich ist. Um nachzuweisen, daß die Vektor-Sequenz tatsächlich in diesen Fragmenten vorhanden ist, wurde der reine Vektor präpariert und damit eine Hybridisierung dieser Fragmente durchgeführt. Wie erwartet hybridisierten sie mit der Vektor-Probe. Klone dieses Contigs, die derartige artifizielle Fragmente tragen, sind auf der Abbildung 30 mit einem Stern gekennzeichnet. Es handelt sich um die Klone E17338, H12587, D15335, E4428 und A18367.

Der Klon A18367, welcher die Klasse-I-tragenden Fragmente 7, 11 und 12 beinhaltet, weist ein zusätzliches Fragment der Länge 19 kb auf. In diesem Fall mußte es sich um ein angeschnittenes 23-kb-Klasse-I-Fragment handeln, welches als nächstes in dem Contig auftritt.

Tab. 6: Zusammenfassung der PAC-Klone, die dem zweiten Abschnitt des Contig 2 bilden.
Aufgeführt sind die entsprechende Filter Nummer der Ratten-Bank die Koordinaten der Klone und die Hybridisierung der Klone mit verschiedenen Proben aus dieser Region.

	PAC	Filter Nr.	Koordinaten	Länge der mit der α 1-Probe hybridisieren- den Fragm- ente [kb]	Länge der mit der α 3-Probe hybridisieren- den Fragm- ente [kb]	Hybridisi- erung mit weiteren Anker Pro- ben [kb]	Marker aus PAC-End- sequenzie- rung
1	E17388	110-8-104	37 58, 37 56	11/1,5/7,5/7,6/ 2,1/5/1,7/9/3,8 /3,2			
2	C15160	110-9-138	49 69, 50 66	11/1,5/7,5/7,6/ 2,1/5/1,7/9/3,8 /3,2/1,9			
3	K05363	110-6-116	216 190, 216 187	11/1,5/7,5/7,6/ 2,1/5/1,7/9/3,8 /3,2			
4	H12587	110-9-122	63 125, 61 123	1,5/7,5/7,6/2,1 /5/1,7/9/3,8/ 3,2/3,4/5			Mikrosatellit
5	G0249	110-1-116	113 130, 111 128	2,1/5/7,7/9/ 3,8/3,2/3,4/5			Mikrosatellit
6	I10519	110-7-158	194 199, 195 196	2,1/5/7,7/9/ 3,8/3,2/3,4/5	18		Mikrosatellit
7	B2066	110-1-116	143 154, 144 152	3,8/3,2/3,4/5	18		Mikrosatellit
8	D15335	110-5-134	143 154, 144 152	3,8/3,2/3,4/5	18		Mikrosatellit
9	N1554	110-1-116	168 95,	3,4/5	18/16		Mikrosatellit

			166 93				
10	N1654	110-1-116	163 95, 161 93	3,4/5	18/16		Mikrosatellit
11	B08610	110-9-138	205 152, 203 151	3,4/5	18/16/6/13	255D16T 261A5S	Mikrosatellit
12	J2298	110-2-127	135 34, 132 35	5	18/16/6/13	255D16T 261A5T 261A5S	Mikrosatellit
13	M02271	110-4-122	115 98, 112 97	5	18/16/6/13	255D16T 261A5S	
14	A2052	110-1-116	23 80, 21 78	_____	18/16/6/13	255D16T 261A5T 261A5S	
15	A10338	110-5-134	193 80, 191 78	_____	18/16/6/13	255D16T 261A5T 261A5S	
16	J01132	110-2-127	240 113, 237 112	_____	16/6/13	255D16T 261A5T 261A5S	
17	J20226	110-4-122	24 31, 21 31	_____	16/6/13/18	255D16T 261A5T 261A5S	
18	E04256	110-4-122	104 58, 101 59		18/16/6/13	255D16T 261A5T 261A5S	
19	P15129	110-2-127	170 163, 167 162	5	18/16/6/13/18	255D16T 261A5T 261A5S	
20	D03460	110-6-161	110 64,	_____	18/16/6/13/18/	255D16T 261A5T	

			107 65		7/11	261A5S	
21	G03460	110-6-161	110 49, 107 50	_____	18/16/6/13/18/ 7/11	255D16T 261A5S	
22	L03108	110-2-127	227 103, 227 101	_____	16/6/13/18/ 7/11	255D16T 261A5T 261A5S	
23	E04428	110-6-116	225 57, 223 56	_____	6/13/18/7/11	255D16T 261A5T 261A5S	
24	B02559	110-7-158	115 153, 112 152	_____	13/18/7/11	255D16T 261A5T 261A5S	
25	I1448	110-10-132	175 120, 172 119	_____	_____	255D16T	
26	C08258	110-4-122	204 148, 201 149	_____	13/18/7/11/12	261A5T 261A5S	
27	A18367	110-6-116	34 156, 31 156	_____	7/11/12	261A5T 261A5S	
28	A1426	110-1-116	175 79, 172 80	_____	7/11/12/23/8/ 3,2		
29	P08462	110-6-161	205 84, 202 85	_____	7/11/12/23/8/ 3,2	261A5T	P0846T
30	C04253	110-4-122	204 228, 202 227	_____	23/8/3,2		

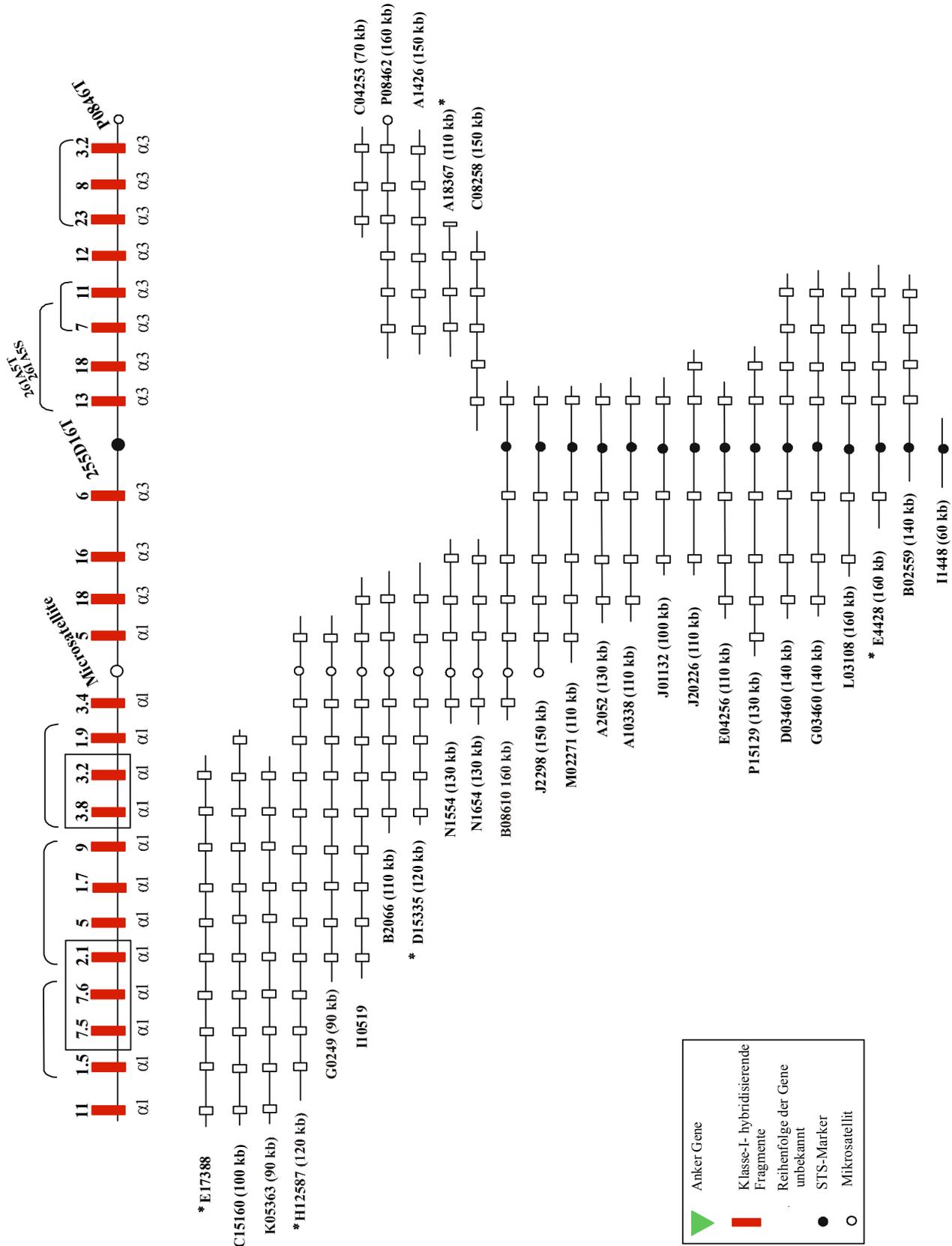


Abb. 30: Schematische Darstellung des zweiten Abschnitts von Contigs 2 mit den überlappenden PAC-Klonen. Die offenen Kästchen stellen Klasse-I-Fragmente dar.

4.3.2.3 Contig 2, dritter Abschnitt

Aus dem $\alpha 3$ -Screening der genomischen Bank wurden unter anderem PAC-Klone erhalten, die $\alpha 3$ -positive *Bam*HI-Restriktionsfragmente der Größe 2,3 kb, 4,1 kb und 1,5 kb zeigten. (Abbildung 31). Zwei der Klone mit diesem $\alpha 3$ -Muster tragen zusätzlich die Gene *Tctex5* und *Mog*.

Aufgrund vorhandener Daten aus der Maus (Wang *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1999) war anzunehmen, daß es sich um die H2-M4, H2-M5 und H2-M6 der Maus homologen Gene handelt, die zwischen den Genen *Tctex 5* und *Mog* in der distalen H2-M-Region Maus lokalisiert sind.

Das *RT1-M4* Gen der Ratte wurde bereits beschrieben (Lambracht *et al.*, 1998). In Intron 3 dieses Gens wurde ein imperfektes *GT-repeat* (TG)₇CG(TG)₂CG(TG)₂₀ identifiziert (Lambracht *et al.*, 1998), das in verschiedenen Rattenstämmen einen Längenpolymorphismus zeigt. Durch das *repeat*-flankierende Primer war per PCR ein Produkt von 129 bp in der BN-Ratte erhalten worden (Lambracht *et al.*, 1998). Die PAC-Klone L19417, N20105, K145, A23104, J0567, H11471, K09358 und E21511, welche das Muster der drei $\alpha 3$ -Fragmente aufweisen, stellten sich als positiv für den Mikrosatelliten des *RT1-M4*-Gens heraus. Das von Lambracht *et al.* (1995) identifizierte *Bam*HI-Restriktionsfragment, welches das *RT1-M4*-Gen trägt, hat eine Länge von 4,1 kb. Ein Klasse-I-Gen tragendes *Bam*HI-Fragment dieser Länge wurde auch hier ermittelt. Somit wurde im dritten Abschnitt des Contigs 2 das Gen *RT1-M4* identifiziert und die Lokalisation bestimmt (Abb.32).

Durch weiteres *Screening* der genomischen Bank mit den Proben *Tctex5*, *Rfb30*, *Znf173* (siehe 4.2) wurden Klone erhalten, die sich am centromeren Ende dieses Contigs befinden. Der Klon P20499 trägt alle drei Gene *Znf173*, *Rfb30* und *Tctex 5*. Zusätzlich trägt er den STS-Marker P084T.

Mehrere der Klone hybridisierten zusätzlich mit der Probe aus dem *Mog*-Gen (4.2 und Abbildung 32). Die Hybridisierung des *Bam*HI-Southern Blots mit der *Mog*-Probe ergibt eine positive Bande von ca. 500 bp.

Die Klone O21242 und H10232 sind positiv mit der Probe Tu42.

Aus der Endsequenzierung des Klones H10232 konnte ein STS-Marker erstellt werden (H102T), der am telomeren Ende des Klones lokalisiert wurde.

Aufgrund von Daten der Maus-MHC-Kartierung (Amadou *et al.*, 1999) wurde der STS-Marker 573K1S, der sich in der Maus zwischen dem *Tu42*-Gen und dem *H2-M3* Gen befindet, für weitere Kartierungen benutzt. Mit diesem Marker wurden alle *RT1-M3* und *RT1-M2* positiven PAC-Klone (4.3.3) untersucht. Zwei dieser Klone, D13419 und J21470, tragen den 573K1S-Marker. Diese Klone weisen außerdem den Ratten-STS-Marker H102T auf, so daß damit die Lücke zu PAC-Klon H10232 überbrückt wird. Die Klone D13419 und J21470, tragen ferner zwei *RT1-M3* positive Banden der Länge 6,2 kb und 2,5 kb.

In der Tabelle 7 werden alle dem dritten Abschnitt des Contigs 2 zugeordneten PAC-Klone zusammengefaßt.

Die Abbildung 31 zeigt eine repräsentative Hybridisierung der *Bam*HI-Restriktionsfragmente einiger Klone aus dem dritten Abschnitt des Contigs 2 mit der $\alpha 3$ -Probe (4.2). Die restlichen Klone wurden auf mehreren Southern Blots verteilt überprüft; diese Abbildungen wurden hier nicht eingefügt.

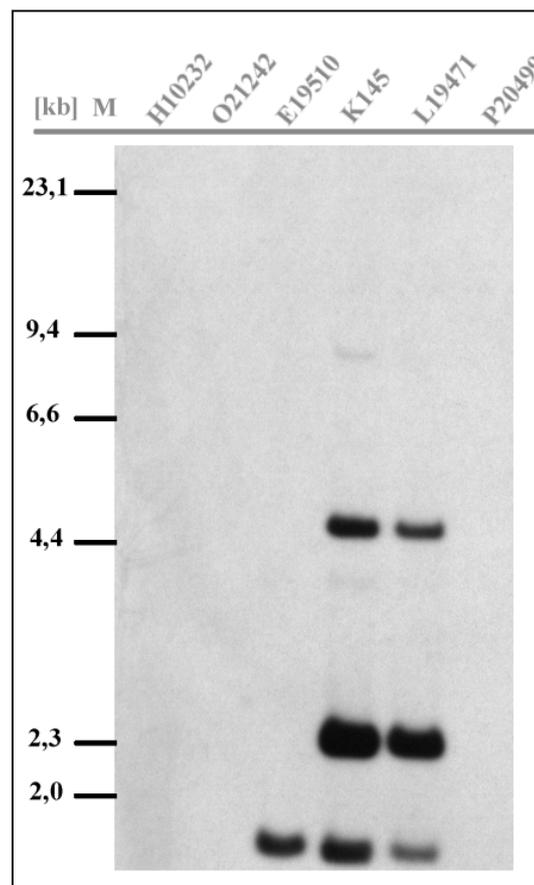


Abb. 33: Southernblot-Hybridisierung einiger Klone aus dem dritten Abschnitt des Contigs 2 mit der $\alpha 3$ -Probe. Alle weiteren Klasse-I-tragende Klone dieses Contigs zeigen das gleiche Muster wie die hier abgebildeten Klone. Links ist der Längenstandard angegeben.

Die Abbildung 34 zeigt eine schematische Darstellung der dem dritten Abschnitt des Contigs 2 zugehörigen Klone. Die Klone D13419, J21470, K15386 und H18232 werden in dem Abschnitt 4.3.3 nochmals aufgeführt.

Tab. 7: Zusammenfassung der PAC-Klone, die dem dritten Abschnitt des Contigs 2 zugeordnet sind. Aufgeführt ist die entsprechende Filter-Nummer der Ratten-Bank, die Koordinaten der Klone und die Hybridisierung der Klone mit verschiedenen Proben aus dieser Region.

	PAC	Filter Nr.	Koordinaten	Länge der mit der α 1-Probe hybridisierenden Fragmente [kb]	Länge der mit der α 3-Probe hybridisierenden Fragmente [kb]	Hybridisierung mit weiteren Anker Proben und STS-Markern	Proben aus PAC-End-Sequenzierung
1	P20499	110-7-107	25 82, 23 81	_____	_____	<i>Znf173</i> <i>Rfb30</i> <i>Tctex5</i>	P0846T
2	O22140	110-2-127	135 7, 133 6	_____	_____	<i>Tctex5</i>	
3	K08519	110-7-158	204 189, 205 186	_____	_____	<i>Tctex5</i>	
4	L19417	110-6-116	150 183, 147 182	_____	2,3/4,1/1,5	<i>Tctex5</i> <i>Mog</i> <i>RT1-M4</i>	
5	N20105	110-2-127	142 173, 142 171	_____	2,3/4,1/1,5	<i>Tctex5</i> <i>Mog</i> <i>RT1-M4</i>	
6	K145	110-1-116	51 190, 51 187	_____	2,3/4,1/1,5	<i>Mog</i> <i>RT1-M4</i>	

7	A23104	110-2-127	127 78, 127 76	_____	2,3/4,1/1,5	<i>Mog</i> <i>RT1-M4</i>	
8	J0567	110-9-122	100 112, 98 111	_____	2,3/4,1/1,5	<i>Mog</i> <i>RT1-M4</i>	
9	H11471	110-6-161	189 203, 186 204	_____	2,3/4,1/1,5	<i>Mog</i> <i>RT1-M4</i>	
10	K09358	110-5-134	80 27, 78 26	_____	2,3/4,1/1,5	<i>Mog</i> <i>RT1-M4</i>	
11	E21511	110-7-158	19 136, 16 136	_____	2,3/4,1/1,5	<i>RT1-M4</i>	
12	E19510	110-7-158	146 140, 146 137	_____	1,5	<i>Mog</i>	
13	O21242	110-4-122	140 9, 137 10	_____	_____	<i>Mog</i> <i>Tu42</i>	
14	H10232	110-4-122	75 41, 74 44	_____	_____	<i>Tu42</i>	H102T
15	D13419	110-6-116	60 223, 57 222	_____		<i>RT1-M3</i> 573K1S	H102T
16	J21470	110-6-161	139 33, 136 34	_____		<i>RT1-M3</i> 573K1S	H102T
17	K15386	110-6-116	170 29, 167 30	_____		<i>RT1-M3</i>	
18	H18232	110-4-122	35 41, 34 44	_____		<i>RT1-M3</i>	

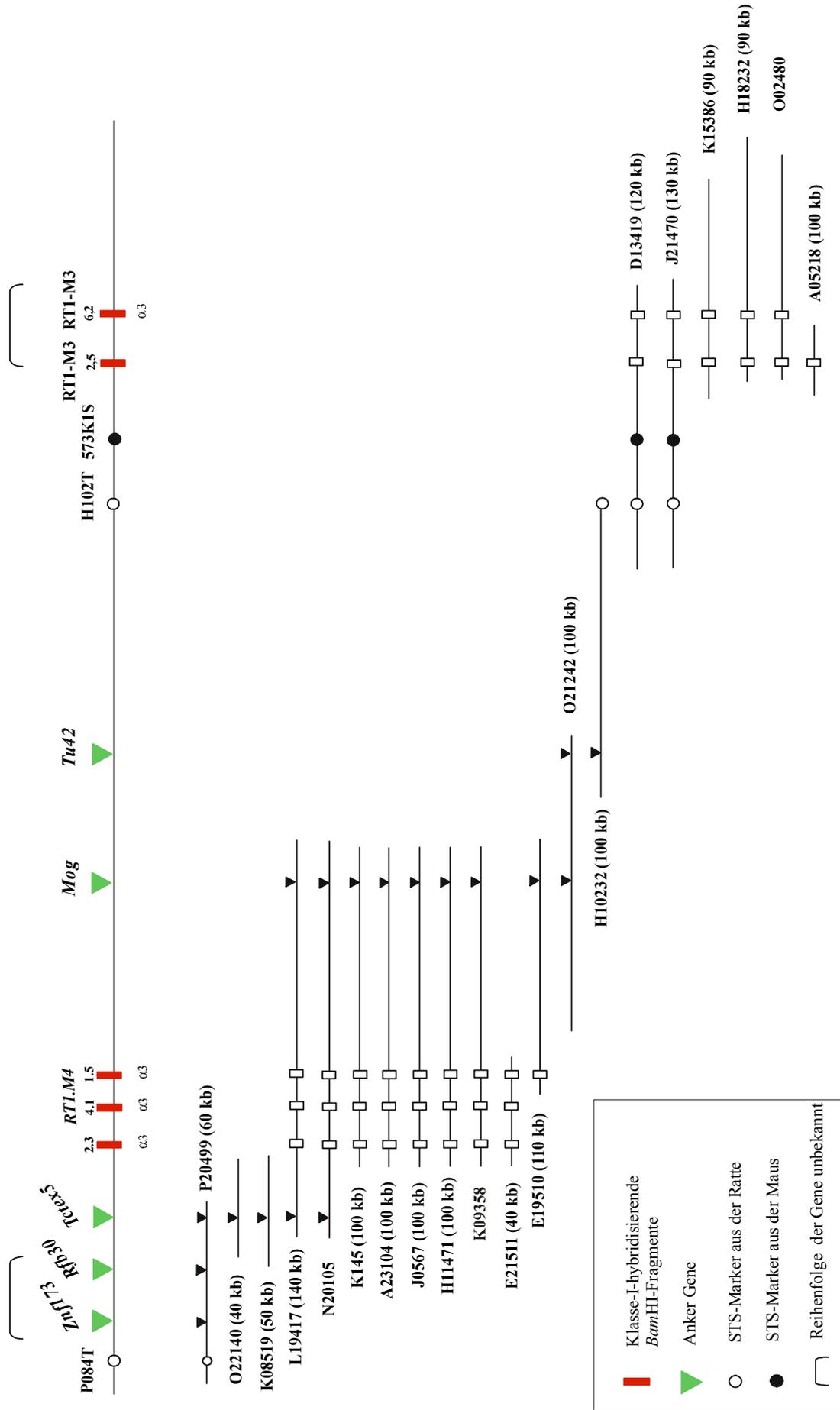


Abb. 32: Schematische Darstellung des dritten Abschnitts von Contig 2 mit den überlappenden PAC-Klonen. Die offenen Kästchen stellen Klasse-I-Fragmente und die schwarzen Dreiecke die Anker -Gene auf den PAC-Klonen dar.

4.3.2.4 Endsequenzierung einiger Klone aus dem Contig 2

Der PAC-Klon **I16223** wurde an beiden Enden ansequenziert. Am telomeren Ende wurde eine Sequenz erhalten, die keine Homologie zu bekannten Sequenzen aufweist. Daraus wurden Primer etabliert (STS-Marker I162T), und damit eine PCR auch an den benachbarten PAC-Klonen des Contigs durchgeführt. Die Klone I16223, I19108, I16274, F01374, J1031, L0831, E16374 tragen tatsächlich auch den Marker I162T.

Durch Sequenzierung des centromeren Endes PAC-Klones **I16223** wurde eine Teilsequenz des Gens *Prg1* (Schäfer *et al.* 1996) gefunden.

Aus der Sequenzierung eines Endes von Klone **E16374** wurde eine Sequenz erhalten, die zum Gen *Pnuts* (Allen *et al.* 1998) gehört. Bisher ist in der Ratte die cDNA Sequenz bekannt. Die hier erhaltene Sequenz entspricht einem Teil der codierenden Region und enthält zwei Exons, das dazwischen liegende Intron und jeweils ein Teil der angrenzenden Introns.

Am telomeren Ende des Klones **E16374** wurde eine Sequenz aus der nicht codierenden Region eines Klasse-I-Gens ermittelt, welche ausgeprägte Homologie zu einem H2-T-ähnlichen-Pseudogen der Maus aufweist.

Der Klon **O10516** lieferte am centromeren Ende eine Teilsequenz des *RT.BMI*-Gens. Die erhaltene Sequenz stammt aus dem 3'-utr, Exon 7 und 8 sowie angrenzenden Introns.

Eine Endsequenzierung wurde zunächst beim Klon **H12587** durchgeführt. An dem centromeren Ende des Klones wurde eine Sequenz identifiziert, die durch Vergleich in der Datenbank teilweise Homologie zu einer nicht näher annotierten Maus-Sequenz aus dem BAC-Klon citb585 (AC005807) von Chromosom 17 zeigt. Ein Banken-Screening mit dieser Probe ergab außer den $\alpha 1$ -reichen Klonen, die in der Abbildung 26 zusammengefaßt sind, auch eine Reihe von Klonen, die im schon im ersten Abschnitt des Contigs 2 eingeordnet waren. Aus diesem Befund konnte geschlossen werden, daß diese Sequenz mehrfach im ersten Abschnitt des Contigs 2 und zu Beginn des zweiten Abschnitts von Contig 2 vorkommt und daher als STS-Marker ungeeignet ist.

Die erhaltene Teilsequenz aus dem telomeren Ende dieses Klones war homolog zu einem LINE-Element (*Long interspersed repetitive DNA sequence*) aus der retroviralen ORF2-Region, die für ein der Reversen Transkriptase ähnliches Protein kodiert.

Beim Ansequenzieren des Klones **G0249** wurde ebenfalls eine Sequenz aus LINE-Elementen erhalten.

Die Endsequenz von PAC-Klon **J2298** zeigte ausgeprägte Homologie (90%) zu einem retroviralen *gag*-Protein. Innerhalb dieser Sequenz ist ein Mikrosatellit von 100 bp enthalten, der aus (GAAA)_n(GAAAA)_n-Wiederholungen besteht. An der flankierenden Sequenz des repetitiven Elementes wurden Primer definiert und die PCR mit den benachbarten Klonen zeigte, daß sich dieser Mikrosatellit am centromeren Ende des Klones J2298 befindet.

Der Klon **A18367** zeigte an einem Ende eine LINE-ähnliche Sequenz. Am anderen Ende wurde eine Sequenz identifiziert, die 82% und in manchen Bereiche sogar bis 96% Sequenzidentität zu Sequenzen der BAC-Klone 592j14 (AC005413) und 76k14 (AC005665) aus dem MHC der Maus zeigen.

Bei **P08462** konnte das eine Ende erfolgreich ansequenziert werden. Diese Sequenz ist homolog zu einem Bereich im BAC-Klon 20h22 der Maus (AC005960). Aus der erhaltenen Sequenz wurden Primer definiert und mittels PCR gezeigt, daß sich diese Sequenz am telomeren Ende des Klones befindet und als STS-Marker, als P0846T bezeichnet, verwendet werden kann (Abbildung 30).

Die Sequenzierungsdaten sind im Anhang 8.2 aufgeführt.

4.3.3 Contig 3 und Contig 4 (*RT1-M3*-, *RT1-M2*-positive Klone)

Aus dem $\alpha 3$ -*Screening* wurden außer den PAC-Klonen, die dem zweiten und dritten Abschnitt des Contigs 2 zugeordnet werden konnten, zusätzlich 22 Klone erhalten, die einzelne oder zwei $\alpha 3$ -positive *Bam*HI-Restriktionsfragmente aufwiesen. Da das *Screening* alle Klasse-I-Gen-tragenden Klone umfassen mußte (4.3), wurde vermutet, daß es sich um *RT1-M3*- und *RT1-M2*-Gen-tragende Klone handeln könnte. Diese Gene sind am distalen Ende der *RT1-M*-Region lokalisiert (Amadou *et al.*, 1999; Lambracht *et al.*, 1999). Die Hybridisierung mit spezifischen Proben des Gens *RT1-M3* bzw. des Mausgens *H2-M2* bestätigten die Annahme, daß diese PAC-Klone die Gene *RT1-M3* und/oder *RT1-M2* Gene tragen. Die Abbildungen 33 und 34 zeigen die hybridisierenden Banden mit den spezifischen

Proben aus *RT1-M3* und *H2-M2*. In der Tabelle 8 werden alle *RT1-M3*-, *RT1-M2*-positiven Klone zusammengefasst. Sie bilden neben dem telomeren Teil des dritten Abschnitts von Contig 2 zwei weitere Contigs, Contig 3 und Contig 4, die sich nicht überlappen und bisher nicht an Contig 2 angeschlossen werden konnten.

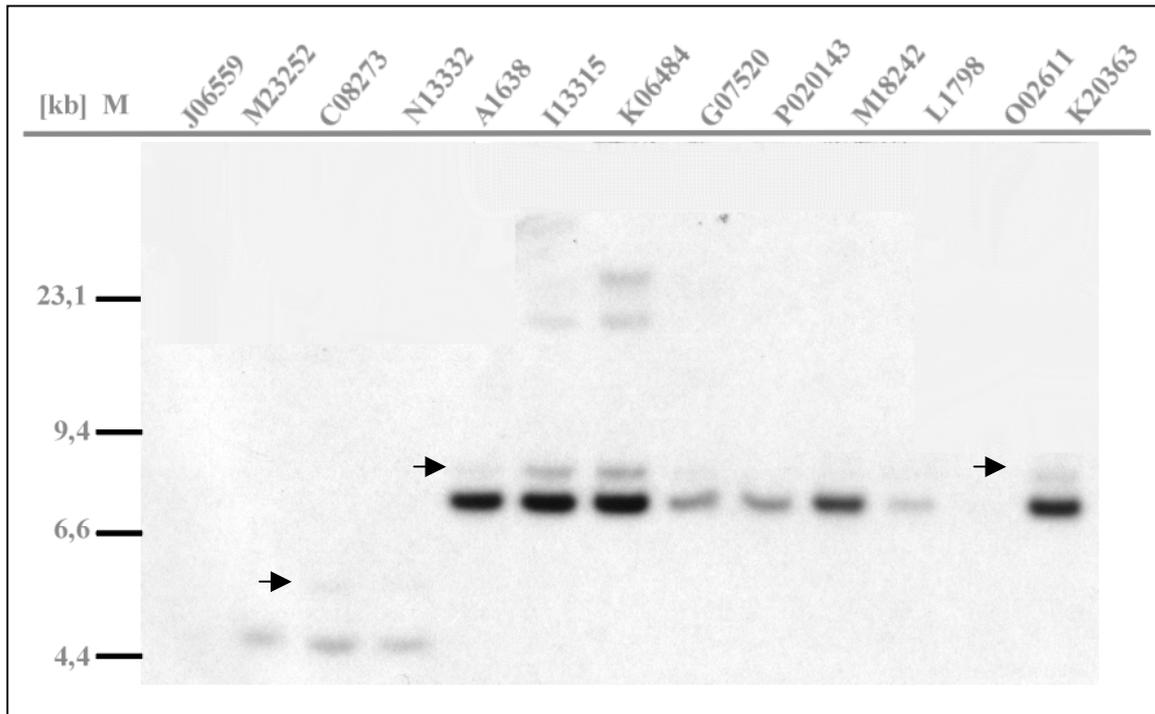


Abb. 33: Southernblot-Hybridisierung mit der *H2-M2*-Probe. Die mit Pfeilen angedeuteten Banden stellen sehr wahrscheinlich kreuzhybridisierende Banden dar. Links ist der Längenstandard angegeben.

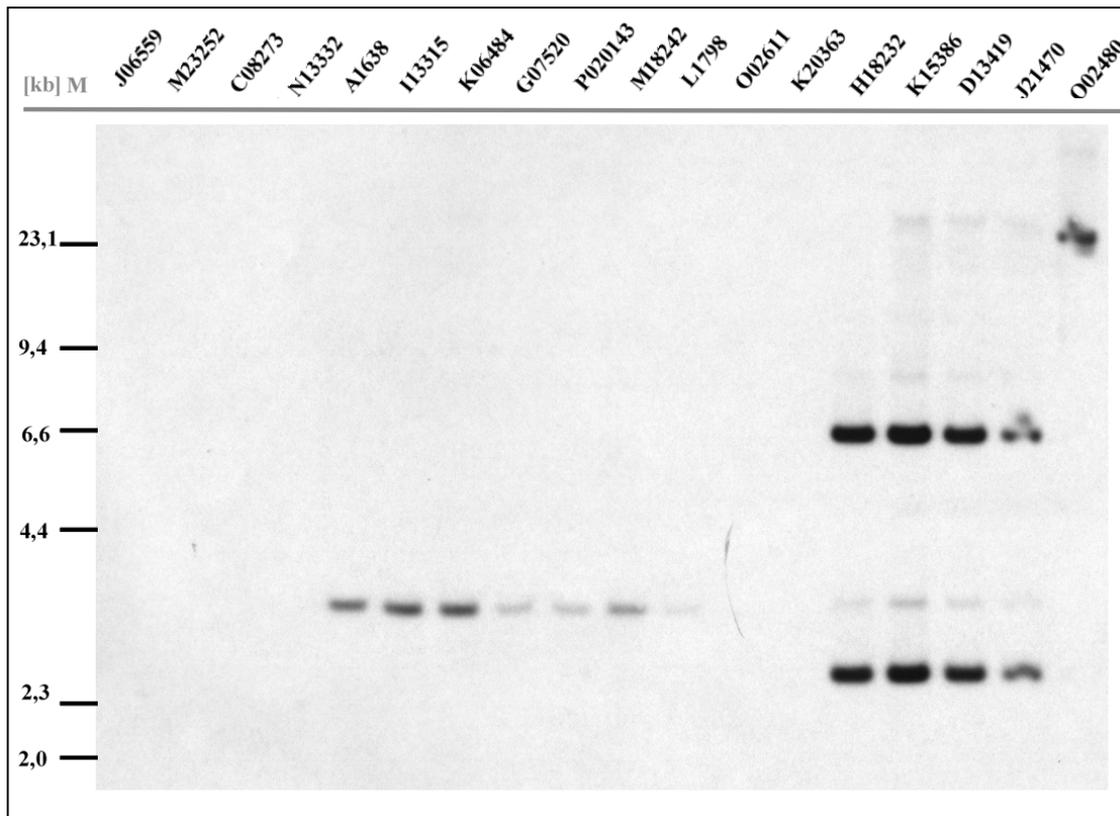


Abb. 34: Southernblot-Hybridisierung *Bam*HI-gespaltener PAC-Klone mit der *RT1-M3*-Probe. Es sind nicht alle Klone auf dem Blot repräsentiert. Links ist der Längenstandard angegeben.

In der Tabelle 8 sind alle PAC-Klone zusammengefaßt, die mit *RT1-M3*- bzw. der *H2-M2*-Probe hybridisieren. Zusätzlich wird die Hybridisierung mit der $\alpha 3$ -Probe angegeben.

Tab. 8: Zusammenfassung der PAC-Klone, die das Contig 3 und dem Contig 4 bilden. Aufgeführt sind die entsprechende Filter-Nummer der Ratten-Bank, die Koordinaten der Klone und die Hybridisierung der Klone mit verschiedenen Proben aus dieser Region.

	PAC	Filter Nr.	Koordinaten	Länge der mit der <i>RT1-M3</i> -Probe hybridisierenden Fragmente [kb]	Länge der mit der <i>H2-M2</i> -Probe hybridisierenden Fragmente [kb]	Länge der mit der $\alpha 3$ -Probe hybridisierenden Fragmente [kb]
1	D13419	110-6-116	60 223, 57 222	6,2/2,5	_____	6,2

2	J21470	110-6-161	139 33, 136 34	6,2/2,5	_____	6,2
3	H18232	110-4-122	35 41, 34 44	6,2/2,5	_____	6,2
4	K15386	110-6-116	170 29, 167 30	6,2/2,5	_____	6,2
5	O02480	110-6-161	235 90, 232 89	6,2/2,5	_____	6,2
6	A05218	110-4-122	216 80, 216 77	6,2	_____	6,2
7	A1638	110-9-122	164 78, 161 79	3	7	3/7
8	I13315	110-5-134	180 199, 177 200	3	7	3/7
9	K06484	110-6-161	93 30, 91 28	3	7	3/7
10	G07520	110-7-158	89 49, 90 46	3	7	3/7
11	P020143	110-2-127	25 162, 23 161	3	7	3/7
12	M18242	110-4-122	155 19, 152 20	3	7	3/7

13	L1748	110-10-132	160 105, 157 104	3	7	3/7
14	O02611	110-9-122	112 168, 112 166	3	7	3/7
15	O11597	110-9-122	67 167, 70 168	3	7	
16	K20363	110-6-116	141 190, 141 187	3	7	3/7
17	J06559	110-7-158	95 113, 92 112	_____	4,4	4,4
18	J08559	110-7-158	85 113, 82 112	_____	4,4	4,4
19	M23252	110-4-122	127 98, 127 96	_____	4,4	4,4
20	C08273	110-4-122	205 228, 202 227	_____	4,4	4,4
21	N13332	110-5-134	180 15, 177 14	_____	4,4	4,4
22	I12230	110-4-122	184 39, 185 36	_____	>23 kb artifizielles Fragment	>23 kb

Die *RTI-M3*-positiven PAC-Klone D13419, J21470, K15386, H12232, O02480 und A05218 sind am telomeren Ende des Contigs 2 eingeordnet. Die restlichen *RTI-M3*- und *RTI-M2*-positiven Klone wurden in der Abbildung 35 schematisch dargestellt.

Neun der zehn PAC-Klone des Contigs 3 zeigen in der Hybridisierung des *Bam*HI-Southernblots mit der Probe *RT1-M3* eine 3 kb lange Bande und eine 7 kb lange Bande mit der Sonde *H2-M2*. Zwei der Klone, O02611 und K20363 enthalten nur das 7 kb lange *H2-M2*-hybridisierende Fragment (Abbildung 35).

Im Contig 4 sind Klone zusammengestellt, die eine hybridisierende *Bam*HI Bande einer Länge von 4,4 kb mit der Probe *H2-M2* zeigen. Der Klon I12230 zeigt bei der Hybridisierung sowohl mit der $\alpha 3$ - als auch mit der *H2-M2*-Probe, eine positive Bande auf der Höhe von 23 kb. Dieses ist ein artifizielles *Bam*HI-Fragment. Es wurde durch Ansequenzieren eine Teilsequenz des *RT1-M2*-Gens der Ratte gefunden.

Diese Daten führen zu der Erkenntnis, daß bei der Ratte eine Duplikation der Gene *RT1-M3* und *RT1-M2* stattgefunden hat.

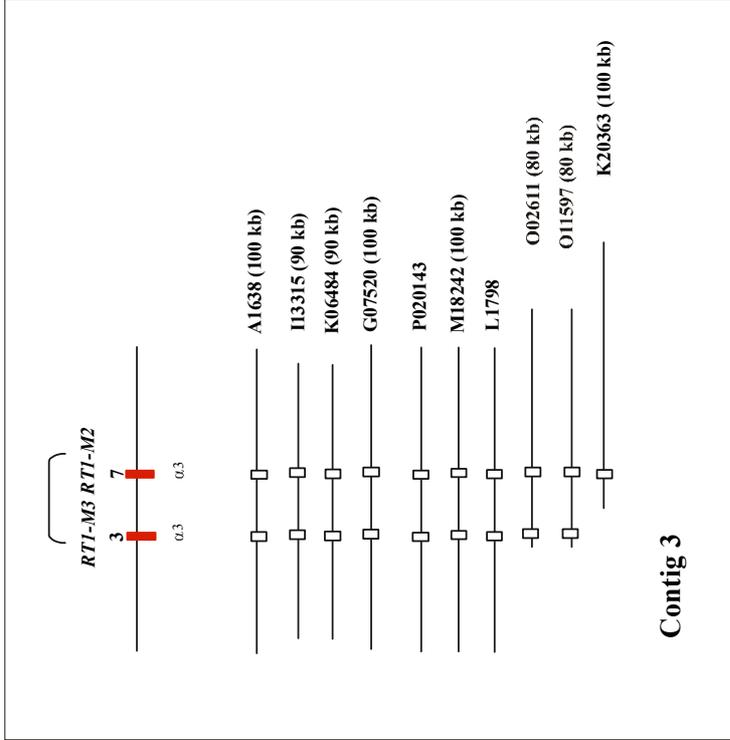
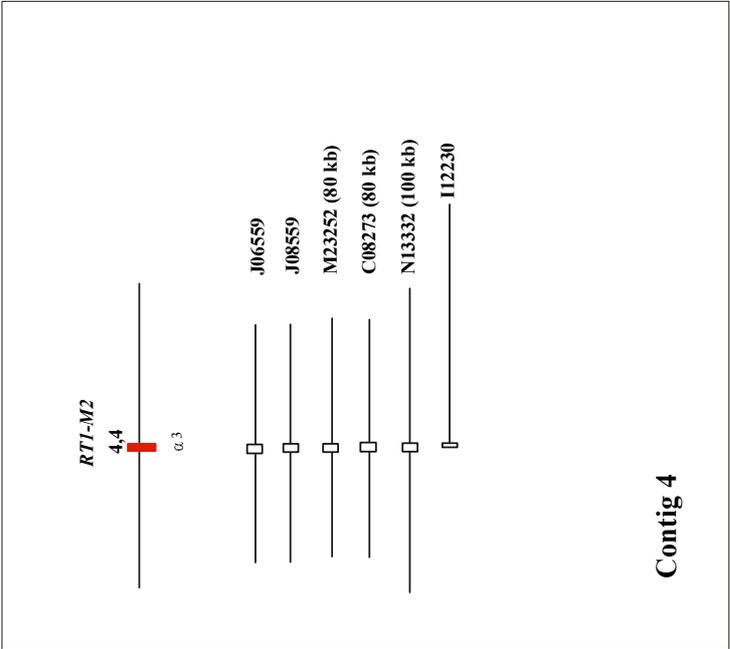


Abb. 35: Schematische Darstellung der PAC-Klone, die Contig 3 und 4 bilden. Der Klon I12230 trägt ein angeschnittenes RTI-M2-Gen.

5. Diskussion

Im Vergleich zu den Daten, die über den MHC des Menschen und der Maus bekannt sind, ist über das RT1-System nur wenig bekannt. Die Aufklärung der genomischen Organisation des MHC der Ratte, der Anzahl und Anordnung der Klasse-I-Gene, deren Polymorphismus und Funktion, sowie die Entdeckung und Kartierung weiterer, in der Evolution konservierter, Gene dieser Region wäre von großer Bedeutung für das Verständnis dieses Multigen Systems. Die Aufklärung der Struktur des RT1-Komplexes und dessen Vergleich mit bekannten Daten des HLA- und H2-Komplexes könnte sowohl einen Einblick in die Evolution dieses Systems, als auch über die Dynamik dieses Gensystems innerhalb der Spezies gewonnen werden. Da die Ratte als Tiermodell bei der Aufklärung MHC-gekoppelter Krankheiten und experimenteller Transplantation dient, wäre die weitere Analyse des RT1-Systems von außerordentlicher Wichtigkeit.

Maus und Ratte besitzen als einzige der bisher untersuchten Spezies Klasse-I-Gene auf beiden Seiten der Klasse-II-, Klasse-III-Genregion. Bei den meisten Antworten cytotoxischer T-Lymphozyten läßt sich die Restriktion in der RT1.A-Region kartieren (Günther und Wurst, 1984). Durch Southernblot-Analyse ist aber gezeigt worden, daß die meisten Klasse-I-Gene auf der anderen Seite der Klasse-II-, Klasse-III-Region lokalisiert sind (Günther *et al.*, 1985, Cortese Hassett *et al.*, 1986). Die Untersuchungen von Jameson *et al.*, 1992 zeigten, daß mindestens 61 Klasse-I-Gene in dieser Region zu finden sind.

Durch diese Arbeit wurde gerade diese Region, die die Hälfte des RT1-Komplexes ausmacht, strukturell analysiert, und somit ein großer Fortschritt zur Entschlüsselung des Ratten MHC erreicht

Nun wurde im Rahmen dieser Arbeit möglich eine Region von ca. 2,3 Mb des Ratten-MHC (RT1-Komplex) in 4 Contigs aus überlappenden PAC-Klonen zu klonieren und kartieren. Die Länge der Contigs wurde durch zusammenstellen der Länge von PAC-Klonen, welche das minimal Contig bilden, berechnet. Es handelt sich um die RT1-C/M-Region, welche die telomere Hälfte des RT1-Komplexes auf dem Chromosom 20 darstellt. Diese Analyse wurde an dem RT1ⁿ-Haplotyp durchgeführt, ein Rattenstamm der weite Anwendung in der Immunologie findet.

Das erste Contig mit einer Länge von ca. 630 kb ist in der Klasse-III-Region mit den Genen *Cak*, *Tnfa* und *Bat1* verankert. Zwischen dem ersten und dem zweiten Contig besteht zur Zeit noch eine Lücke, die allerdings nicht größer als 200 kb sein dürfte. Diese Angabe basiert auf einem Vergleich mit der homologen Region des MHC des Menschen (HLA-Komplex).

Das zweite Contig umfaßt einen Bereich von ca. 1500 kb, und es folgen zwei weitere kurze Contigs von jeweils ca. 150 kb, die wahrscheinlich das telomere Ende des Ratten-MHC darstellen. Diese Annahme beruht auf der Identifizierung der Gene *RT1-M3* und *RT1-M2* im Contig 3 und einem weiteren *RT1-M2*-Gen im Contig 4. Die erforderliche Nachprüfung der Kontinuität dieser Contigs wird momentan mittels spezifischer Marker in der Abteilung Immunogenetik durchgeführt.

Die Klone zur Konstruktion der physikalischen Karte dieses Teiles des Ratten-MHC wurden aus mehrfachen *Screenings* einer genomischen PAC-Bank (Woon *et al.*, 1998) des Ratten-Genoms erhalten. Die Bank hatte einen Umfang von 10 Genom-Äquivalenten und die durchschnittliche Länge der PAC-Inserts beträgt 147 kb. Das *Screening* mit der $\alpha 1$ - und der $\alpha 3$ -Probe sollte alle Klasse-I-tragenden Klone liefern, da es sich ganz offensichtlich um eine vollständige genomische Bank handelt. Durch *Screenings* mit weiteren Proben konnten Klasse-I-Gen-tragende Klone mit Klasse-I-negativen PAC-Klonen verbunden und zu größeren Contigs angeordnet werden. Insgesamt werden die 4 konstruierten Contigs der *RT1-C/M*-Region von 122 PAC-Klonen gebildet.

5.1 Contig 1

Wie bereits oben erwähnt, ist das Contig 1 in der Klasse-III-Region verankert. Dieses wurde durch Anwesenheit der Gene *Tnfa* und *Bat1* gezeigt.

In der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten physikalischen Karte der *RT1-C/M*-Region existiert zwischen dem Contig 1 und dem Contig 2 noch eine Lücke.

Der physikalischen Karte des H2-Komplexes des Maus-Stammes C57BL/6 (H2^b) (Amadou *et al.*, 1999) kann entnommen werden, daß der Abstand zwischen dem *Pou5f1*- (*Oct4*) und dem *Gna-rs1*-Gen maximal 300 kb beträgt. Die physikalische Länge der genomischen PAC-Klone, auf welchen diese Gene in der Ratte kartiert wurden, übersteigt jedoch schon die Länge von 450 kb. Es ist offensichtlich, daß diese Region einen Längen-Unterschied zwischen Ratte und Maus aufweist. Im Menschen-MHC beträgt die Distanz zwischen den beiden Genen nach den neuesten Daten aus der kompletten Sequenzierung des HLA-Komplexes (*The MHC Sequencing Consortium*, 1999) 624 kb. Sollte der Abstand zwischen dem *Pou5f1*- und dem *Gna-rs1*-Gen bei der Ratte auch eine ähnliche Länge wie beim Menschen haben, dann wäre die vorhandene Lücke mit zwei PAC-Längen (2 x 150 kb) zu schließen.

Am centromeren Ende des Contigs 1, welches in der Klasse-III-Region verankert ist, wurden in einem Bereich von 90 kb drei konservierte Gene identifiziert (*CK2*, *Tnfa* und *Bat1*). Am

telomeren Ende des Contigs 1 wurden fünf konservierte Gene, nämlich *Pou5f1*, *Tcf19*, *S*, *Gtf2* und *Cak* in einem Bereich von 200 kb identifiziert. Zwischen diesen zwei Bereichen von in der Evolution konservierten Genen befindet sich eine Region, die in über ca. 350 kb mit Klasse-I-Genen besetzt ist. Orthologe Regionen sind sowohl im HLA- als auch im H2-Komplex zu finden. Beim Menschen ist zwischen dem *BATI*- und dem *POU5F1*-Gen ebenfalls eine Klasse-I-Gen enthaltende Region von ähnlicher Größe zu finden. In dieser Region sind die *MICA*- und *MICB*-Gene (Bahram *et al.*, 1994) sowie die *HLA-B*- und *HLA-C*-Gene lokalisiert. Die *MICA*- und *MICB*-Gene werden in intestinalen Epithelien exprimiert und das von ihnen kodierte Klasse-I-ähnliche Protein bindet kein β -Mikroglobulin und keine Peptide. Die Expression des *MICA*-Gens wird durch Streß, wie z.B. Hitzeschock, induziert (Groh *et al.*, 1996). *MICA* ist ein Ligand für das *NKG2D*-Molekül (Bauer *et al.*, 1999), einem auf NK-Zellen vorkommenden Rezeptor. Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Contigs wurden mit *MIC*-spezifischen Proben sowie mit *HCG*-spezifischen Proben -die Gene der *HCG* Familien befinden sich in unmittelbarer Nähe zu den *MIC* Genen- überprüft und es konnten keine derartigen Gene bei der Ratte gefunden werden. Auch im Mausgenom finden sich keine *MIC*-Gene (Bahram *et al.*, 1994).

Eine gleichartige Organisation ist in dieser Region auch bei der Maus zu beobachten. Zwischen den zwei Bereichen konservierter Gene befinden sich die Klasse-I-Gene der *H2-D/L* und *H2-Q*-Subfamilien. Die Anzahl dieser Gene ist bei der Maus Haplotyp-abhängig variabel.

Im Contig 1 befinden sich zwischen *Bat1* und *Pouf51* elf *Bam*HI-Fragmente, die mit den $\alpha 1$ - und $\alpha 3$ -Proben hybridisieren, vier Fragmente, die nur mit der $\alpha 1$ -Probe und drei Fragmente, die nur mit der $\alpha 3$ -Probe reagieren. Es ist schwierig, Aussagen über die genaue Anzahl der Klasse-I-Gene zu machen. Wenn angenommen wird, daß die elf *Bam*HI-Fragmente, welche mit beiden Proben hybridisieren, ein vollständiges Gen darstellen und die benachbarten $\alpha 1$ - und $\alpha 3$ -Fragmente zu demselben Klasse-I-Gen gehören, dann sind in der Region zwischen *Bat1* und *Pou5f1* 16 Klasse-I-Gene anzunehmen. Fünf der 16 Gene enthalten wahrscheinlich eine interne *Bam*HI-Schnittstelle. Eine Antwort auf diese Frage, wird die Sequenzierung der gesamten Region liefern.

In der *RTI-C*-Region war unter anderem das Gen *11/3R* lokalisiert worden, welches zu einer Genfamilie von ca. 10 Mitgliedern gehört (Rothermel *et al.*, 1993). Dieses Gen weist gegenüber anderen Klasse-I-Genen der Ratte Besonderheiten auf, so z.B. eine kürzere transmembranöse Region als bei den meisten bekannten Klasse-I-Moleküle der Ratte, und der eher der transmembranen Region der *H2-K*-, *-D*-, *-L* und *-Q*-Moleküle der Maus ähnelt.

Weiter fehlt das Exon 7 in der cDNA und das Stopcodon in Exon 8 ist mutiert, so daß eine Verlängerung des cytoplasmatischen Teiles um acht Aminosäuren entsteht. Darüberhinaus ist 3'-utr ungewöhnlich lang. Mit einer 11/3R-genspezifischen Probe wurden alle PAC-Klone durch Hybridisierung überprüft und sieben Gene als positiv identifiziert, die in der *RTI-C*-Region lokalisiert sind und somit zu der 11/3R-Familie gehören. Ein Gen aus der *RTI-A*-Region hybridisiert ebenfalls mit der 11/3R-spezifischen Probe. Die Gesamtzahl der in dieser Arbeit identifizierten 11/3R-homologen Gene stimmt in etwa mit den auf Southernblot-Analyse basierenden Daten überein (Rothermel *et al.*, 1993). Erstmals konnten diese Gene nun genau kartiert werden.

Aus den ersten sechs Genen im Contig 1 wurden Sequenzen des Exons 2, welches für die $\alpha 1$ -Domäne der Klasse-I-Gene kodiert, erstellt. Das Sequenzalignment mit bekannten Sequenzen der Datenbank zeigte, daß diese Gene in Exon 2 höhere Homologie zu *RTI-A*-Klasse-I-Genen als zu *RTI-C*-Klasse-I-Genen aufweisen. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, daß die Klasse-I-Gene der am centromeren Ende des Ratten-MHC gelegenen *RTI-A*-Region durch eine Translokation von Klasse-I-Genen aus der *RTI-C*-Region entstanden sind. Durch die Verwendung einer spezifischen Probe aus dem Promotor eines *RTI-A*-gekoppelten Klasse-Ia-Gens wurde gezeigt, daß die meisten der Klasse-I-Gene, die sich zwischen *Bat1* und *Pou5f1* befinden, ähnliche Promotoren enthalten. Alle weiteren Klasse-I-Gene/Genfragmente in den darauf folgenden Contigs reagieren nicht mit dieser Probe. Bei der Verwendung einer spezifischen Probe aus dem cytoplasmatischen Teil eines *RTI-A*-gekoppelten Klasse-Ia-Gens konnte ein ähnliches Reaktionsmuster beobachtet werden.

Der Bereich der Klasse-I-Gene zwischen den *Bat1*- und *Pou5f1*-Genen entspricht der H2-D/L- und H2-Q-Region des Maus MHC die ebenfalls von *Bat1* bzw. *Pou5f1* begrenzt werden. Die Sequenz aus der $\alpha 1$ -Domäne des auf dem 4 kb *Bam*HI-Fragment identifizierten Klasse-I-Gens ist identisch mit dem von Wang *et al.* (1996) beschriebenen cDNA Klon 4, welcher ebenfalls aus dem RT1ⁿ-Haplotyp stammt und einem funktionellen Gen entspricht

5.2 Contig 2

Am centromeren Ende des Contigs 2 wurden die konservierten Gene *Prg1*, *Pnuts* und *Gnars1* lokalisiert, denen eine lange, mit Klasse-I-Genen besetzte Region folgt, deren Länge ca. 800 kb beträgt.

Im ersten Drittel dieser Klasse-I-Region sind vier *Bam*HI-Fragmente identifiziert worden, die sowohl mit der $\alpha 1$ - als auch mit der $\alpha 3$ -Probe hybridisieren und offensichtlich vollständige

Klasse-I-Gene tragen. Sechs *Bam*HI Fragmente reagieren dagegen nur mit der α 1-Probe und acht weitere nur mit der α 3-Probe. Aufgrund der durch die dichte Überlappung der PAC-Klone festgelegten Lokalisation der einzelnen entweder mit der α 1- oder mit der α 3-Probe hybridisierenden Fragmente ist davon auszugehen, daß auf jeden Fall für vier der α 3-Fragmente kein Partner- α 1-Fragment in unmittelbarer Nähe existiert. Daraus kann geschlossen werden, daß das Exon 2 dieser Gene entweder viel variabler als in RT1-A-gekoppelten Klasse-I-Genen ist und deshalb keine Reaktion mit der verwendeten α 1-Probe stattfinden kann oder daß es sich um Klasse-I-Genfragmente handelt, denen das Exon 2 fehlt. Bei drei weiteren α 3-hybridisierenden Fragmenten existieren in unmittelbarer Nachbarschaft α 1-hybridisierende Fragmente. In diesen Fällen ist die Annahme erlaubt, daß diese Fragmente zusammen gehören und jeweils ein Klasse-I-Gen darstellen, welches eine interne *Bam*HI-Stelle beinhaltet. Weiterhin sind drei α 1-hybridisierende Fragmente vorhanden, die mit großer Wahrscheinlichkeit singuläre Genfragmente darstellen.

Generell ist es zur Zeit noch nicht möglich, eine genauere Aussage über die Anzahl der in dieser Region enthaltenen Klasse-I-Gene/Genfragmente zu machen. Der Versuch, durch Restriktionsspaltung mit anderen Enzymen, wie z.B. *Hind*III und *Eco*RI ein eventuell weniger kompliziertes Bild der hybridisierenden Fragmente zu erhalten, brachte keine neuen Erkenntnisse, da die erhaltenen Bilder ebenso komplex waren. Definitive Information kann ausschließlich das Durchsequenzieren der Region anhand überlappender Klone der Contigs liefern.

Eine eingehendere Untersuchung war bei zwei Klasse-I-Genen aus diesem Bereich des Contigs 2 möglich. Durch die Endsequenzierung zweier PAC-Klone wurde Sequenzinformation aus Bereichen von Klasse-I-Genen erhalten. Zum einen wurde so das schon beschriebene *RT.BM1*-Gen (Parker *et al.*, 1990) identifiziert. Aus der Richtung der erhaltenen Sequenz und der Lage der angewendeten Primer war es möglich, die Orientierung des Gens festzustellen. Das identifizierte Gen befindet sich auf dem 4,4 kb umfassenden α 3-positiven *Bam*HI-Fragment zu Beginn des Contigs 2. Das *RT.BM1* scheint ortholog zum H2-T23-Gen der Maus zu sein, dessen Genprodukt Peptide von Leadersequenzen aus Klasse-I-Molekülen präsentiert und über diesen Weg zur Hemmung von NK-Zellen beiträgt (Salgar *et al.*, 1998). Zum anderen wurde die Teilsequenz eines weiteren Klasse-I-Gens auf dem 4 kb langen *Bam*HI-Fragment erhalten. Dieses zeigt die gleiche Orientierung wie das *RT.BM1*-Gen und weist Homologie zu einem H2-T2-Pseudogen auf.

Die beiden ansequenzierten Gene befinden sich innerhalb der *grc*-Region. Die *grc*-Region (*growth and reproduction complex*) konnte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit feinkartiert

werden (s. Abb. 21) und umfaßt einen Bereich von ca. 70 kb. Deletionsmutanten bei Ratten, denen die *grc*-Region fehlt, zeigen abnormale Wachstums- und Reproduktionscharakteristika sowie erhöhte Suszeptibilität gegenüber karzinogenen Substanzen (Cortese Hassett *et al.*, 1989; Gill *et al.*, 1995). Durch genaue Analyse der PAC-Klone, der *grc*-Region wird es möglich sein die Gene, welche für den *grc*-Phänotyp verantwortlich sind, zu identifizieren.

Dem ersten Drittel der Klasse-I-Gen-haltigen Region des Contigs 2 folgt ein ca. 250 kb langer Abschnitt, in dem ausschließlich α 1-hybridisierende *Bam*HI-Fragmente gefunden wurden. Die Anzahl dieser Fragmente beträgt 25. Zwei dieser Fragmente wurde subkloniert und die Sequenzierung ergab, daß es sich um die 5'-Hälfte von Exon 2 eines Klasse-I-Gens handelt, das von anonymen Sequenzen flankiert wird. Durch Hybridisierung mit den jeweiligen Hälften eines Exons 2 konnte festgestellt werden, daß es sich bei allen 25 Fragmenten um sehr ähnliche Fragmente der 5'-Hälfte von Exon 2 handelt. Innerhalb dieser α 1-Genfragment-reichen Region sind Blöcke von zwei oder drei α 1-Fragmenten als duplizierte Einheiten erkennbar (s. Abb 21 und 30). Offenbar fanden zum Teil Block-Duplikationen und Inversionen statt. Eine homologe Region ist in der der Maus nicht zu finden. Gen-Fragmente ähnlicher Art, wenn auch nicht in dieser Anzahl und Anordnung wurden allerdings im HLA-Komplex beschrieben, z.B. HLA-Z1 in der Klasse-II Region, welches 87 bp aus dem Exon 4 beinhaltet (Beck *et al.*, 1996).

Am Ende der α 1-Genfragment-reichen Region und am Beginn eines neuen Klasse-I-Genabschnittes ist ein Mikrosatellit der Zusammensetzung (GAAA)_n(GAAAA)_n von 100 bp Länge identifiziert worden. Er zeigte keinen Polymorphismus beim Vergleich verschiedener Rattenstämme.

Diesem Bereich schließt sich eine ca. 300 kb lange Region an, in welcher 11 Klasse-I-Gene/Genfragmente identifiziert wurden. Diese hybridisieren alle mit der α 3-Probe (Exon 4), jedoch nicht mit der verwendeten α 1-Probe (Exon 2). Es muß sich um Klasse-I-Gene handeln, die gegenüber einem klassischen Klasse-I-Gen ein weniger konserviertes Exon 2 aufweisen. Aufgrund dieser Tatsache und der Lokalisation ließ sich vermuten, daß hier der Beginn der *RT1-M*-Region vorliegt. Drei STS-Marker (255D16T, 261A5T und 261A5S) aus der homologen Region der Maus wurden verwendet, um diesen RT1-Bereich zu überprüfen. Es konnte gezeigt werden, daß alle drei Marker in ähnlicher Anordnung in der Ratte vorkommen, mit dem Unterschied, daß die Anzahl der zwischen den Markern befindlichen

Klasse-I-Gene in der Ratte geringer ist als bei der Maus und der Marker 261A5T in der BN-Ratte offensichtlich mehrfach dupliziert vorliegt.

Am telomeren Ende Klasse-I-Region dieses Contigs wurde ein neuer STS-Marker etabliert (P0846T), der den Übergang zur nächsten Gruppe überlappender PAC-Klone vermittelt. Am centromeren Ende dieser anschließenden Region sind die konservierten Gene *Znf173*, *Rfb30* und *Tctex5* lokalisiert. Telomerwärts dieser Gene wurden in einem Abstand von ca. 100 kb zwei ebenfalls konservierte Gene lokalisiert, *Mog* und das *Tu42*. In dem dazwischen liegenden Bereich von ca. 100 kb wurden drei Klasse-I-Gene identifiziert. Eins dieser drei Gene konnte durch PCR anhand eines bekannten Mikrosatelliten als das *RTI-M4*-Gen identifiziert werden.

Wird der Bereich der *RTI-M*-Region der Ratte mit der orthologen H2-M-Region der Maus verglichen, so ist zu erkennen, daß diese unterschiedlich lang sind und zum anderen Unterschiede in der Anzahl von Klasse-I-Genen bestehen.

Im 700 kb umfassenden Segment zwischen H2-T1 (am telomeren Ende der H2-T Region gelegen) und *Znf173* befinden sich in der Maus insgesamt 16 Klasse-I Gene, die die M1- und M10-Familie bilden. In der Ratte wurde zwar noch keine Genanalyse durchgeführt, die zeigt, daß es sich um H2-M1- und H2-M10-homologe Gene handelt, es läßt sich aber aus den bereits erwähnten Daten postulieren, daß die aus elf Klasse-I-Genen bestehende Region in der Ratte den centromeren Teil der *RTI-M*-Region darstellt. Die Anzahl dieser Gene scheint in der Ratte geringer und in einem kürzeren Bereich lokalisiert zu sein als bei der Maus.

Zwischen *Znf173* und *Mog* befinden sich in der Maus innerhalb von 180 kb drei Klasse-I-Gene (*M6*, *M4* und *M5*). Das entsprechende Segment der Ratte hat eine ähnliche Länge und trägt die gleiche Anzahl von Klasse-I-Genen. Eins dieser Gene wurde genauer untersucht und als das *RTI-M4*-Gen identifiziert. Dieses Gen trägt einen polymorphen Marker dessen Länge in der BN Ratte 129 bp (Lambracht *et al.*, 1998) beträgt. Bei den anderen beiden Klasse-I-Genen handelt es sich wahrscheinlich um *H2-M5*- und *H2-M6*-homologe Gene der Ratte, so daß dieser Abschnitt des MHC bei Ratte und Maus sehr konserviert erscheint und die entsprechenden Klasse-I-Gene sehr wahrscheinlich auch ortholog sind.

Im telomeren Bereich des Contigs 2 wurden zwei STS Marker kartiert, der in dieser Arbeit etablierte H102T-Marker und der Marker 573K1S aus der orthologen Region der Maus (Amadou *et al.*, 1999). Im Anschluß befinden sich zwei Klasse-I-Gen/Genfragmente, die mit der *RTI-M3*-spezifischen Probe reagieren.

5.3 Contigs 3 und 4

Zwei weitere Contigs überlappender PAC-Klone, die jeweils ca. 150 kb groß sind wurden erstellt. Im Contig 3 konnte ein weiteres *RT1-M3*- und ein *RT1-M2*-Gen/Genfragment identifiziert werden und auf dem Contig 4 ein weiteres *RT1-M2*-Gen. Diese zwei Contigs schließen sich eventuell dem Contig 2 an, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr überprüft wurde. Interessante sind im Vergleich zur Maus die Gene *RT1-M3* und *RT1-M2* in der Ratte dupliziert.

Die homologen Maus Gene *H2-M3* (Wang *et al.*, 1991) und *H2-M2* (Bronson *et al.*, 1989) sind nicht klassische Klasse-I-Gene und zeigen nur im Bereich des Exon 4 hohe Homologie zu anderen Klasse-I-Gene. Es wurde gezeigt, daß von *H2-M3*-Gen kodiertes Klasse-Ib-Molekül N-formylierte Peptide mitochondrialen oder bakteriellen Ursprungs zytotoxischen T-Lymphozyten präsentieren kann und ist an der Immunantwort nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* beteiligt (Pamer *et al.*, 1992).

Das bereits untersuchte *RT1.M3*-Gen (Wang *et al.*, 1991) zeigt ebenfalls nur im Bereich des Exon 2 eine 92%ige Homologie zu anderen Klasse-I-Gene der Ratte.

Die *H2-M3*- und *H2-M2*-Gene sind in dieser Anordnung am distalsten Ende des MHC kartiert (Jones *et al.*, 1999), umgeben von olfaktorischen-Rezeptor-Gene. Ein entsprechender Abschnitt mit olfaktorischen-Rezeptor-Gene existiert auch am telomeren Ende des Menschen MHC, jedoch fehlen homologe Gene zum *H2-M3* und *H2-M2*.

Die Übersicht der physikalischen Karte der *RT1.C/M* Region des Ratten MHC ist in Abb. 36 zu sehen. Beim Contig 1 ist erkennbar, das zwischen zwei Regionen konservierter Gene, eine 350 kb lange Region von Klasse-I-Genen sich erstreckt. In die centromere Region konservierter Gene gehören das *Tnf* und *Bat1* Gen, mit denen das Contig in der Klasse-III-region verankert ist. In der telomerwärts liegende Region konservierter Gene, wurden die Gene *Pou5f1*, *Tcf19*, *S*, *Gtf2* und *Cak* kartiert. Zwischen dem Contig 1 und dem Contig 2 besteht noch eine zu schließende Lücke. Im Contig 2 ist auch ebenfalls deutlich zu sehen, daß zwischen Blöcken aus konservierten Gene, sich unterschiedlich lange Klasse-I-Gen-Regionen ausdehnen. Die Länge dieses Contigs beträgt ca. 1500 kb. Es folgen zwei Contigs, die jeweils eine Länge von 150 kb betragen. Das Contig 3 trägt jeweils ein *RT1-M3* und ein *RT1-M2*-Gen/Genfragment. Auf dem Contig 4 befindet sich ein *RT1-M2* Gen/Genfragment.

Eine detaillierte Gesamtübersicht der erstellten physikalischen Karte befindet sich im Anhang 3, deren ausführliche beschreibung ist dem Kapitel 4.3 zu entnehmen..

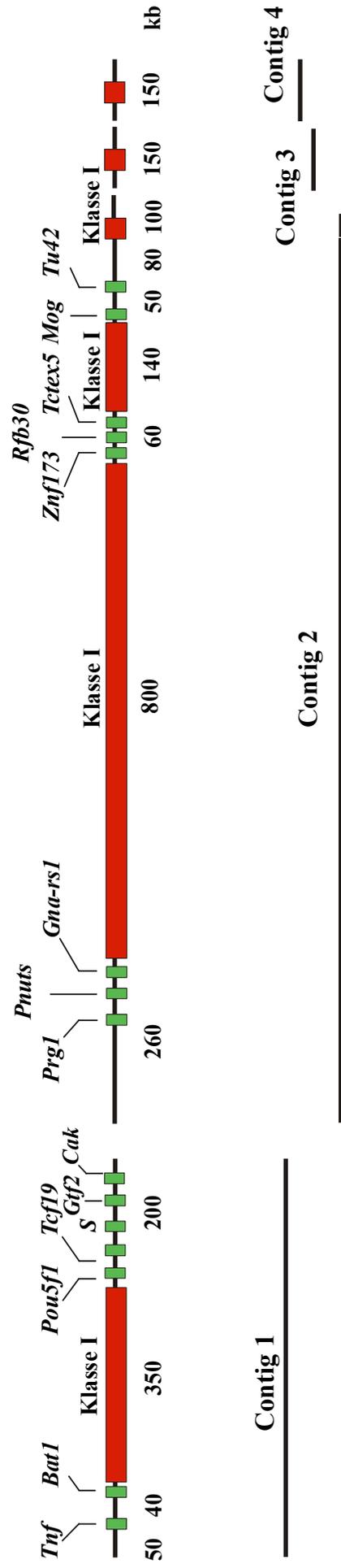


Abb. 36: Überblick der physikalischen Karte der telomeren Klasse-I-Region. In hellgrau sind in der Evolution konservierte Gene dargestellt (Anker Gene) und in dunkelgrau die Klasse-I-Regionen.

5.4 Vergleich zwischen RT1-, H2- und HLA-Komplex in den Klasse-I-Regionen

Es wurde bereits erwähnt, daß bei Maus und Ratte centromerwärts der Klasse-II-Region zusätzlich eine Klasse-I-Region existiert. Diese Bereiche, genannt H2-K und RT1-A, liegen bei diesen beiden Spezies an orthologer Position (Walter und Günther, 2000). Diese Regionen werden hier allerdings nicht detailliert behandelt, da sie nicht Inhalt der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sind. Es sollte jedoch erwähnt werden, daß diese Klasse-I-Bereiche innerhalb von Blöcken aus konservierten und orthologen Genen lokalisiert sind.

Nach einer Hypothese, die sich auf die Evolution der Klasse-I-Region des MHC bezieht, wird das *framework* durch konservierte Gene mit essentieller Funktion gebildet (Amadou *et al.*, 1995; Amadou, 1999). Innerhalb dieser ursprünglichen Struktur gibt es permissive Regionen, in denen Duplikationen oder Deletionen von Klasse-I-Genen erlaubt sind. Die Diskrepanzen in der Länge der Klasse-I-Regionen werden als Expansionen oder Kontraktionen im Bezug zum ursprünglichen *framework* und nicht zwischen den Spezies angesehen.

Die Abbildung 37 ist eine Darstellung der *framework* Genregionen und der variablen Klasse-I-Regionen in Länge und Anzahl an Klasse-I Gene/Genfragmente. Die identifizierten *framework* Gene kommen an orthologen Positionen auch bei Mensch und Maus vor. Zwischen den Blöcken orthologer konservierter Gene befinden sich Regionen von Klasse-I-Gene ebenfalls an orthologen Stellen. Dies bedeutet allerdings nicht, daß die Klasse-I-Gene an sich ortholog sind. Die RT1.C-Region zeigt Orthologie zu entsprechenden H2-D/L, H2-Q Region des MHC der Maus. Auch Orthologie scheint zu existieren zu Genen der H2-T-Region. Als Beispiel kann das RT1. BM1-Gen genannt werden, welches zu Beginn des Contig 2 kartiert wurde und Ortholog dem H-2T23 der Maus ist (Parker *et al.*, 1991).

Hochkonserviert scheinen die Klasse-I-gene der RT1.M-Region zu sein. Bei der Ratte wie in Maus wurden in dieser Region ebenfalls drei Gene kartiert, wobei das RT1-M4 genau identifiziert werden konnte. Auch RT1.M2-, RT1-M3-Gene konnten an orthologer Region zu den Maus H2-M2- und H2-M3-Gene identifiziert werden. Allerdings scheinen in der Ratte diese Gene dupliziert zu sein im Gegensatz zur Maus (Abb. 37). Beim Menschen existieren solche Gene nicht. Hervorzuheben ist, daß die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten in dem *framework* Modell passen. Die Regionen hochkonservierter Gene („Anker-Gene“) sowie die Klasse-I-Regionen in dem hier untersuchten Bereich befinden sich an orthologen Positionen bei Mensch, Ratte und Maus. Variationen sind in der Anzahl der Klasse-I-Gene und der Länge der Klasse-I-Regionen zu beobachten.

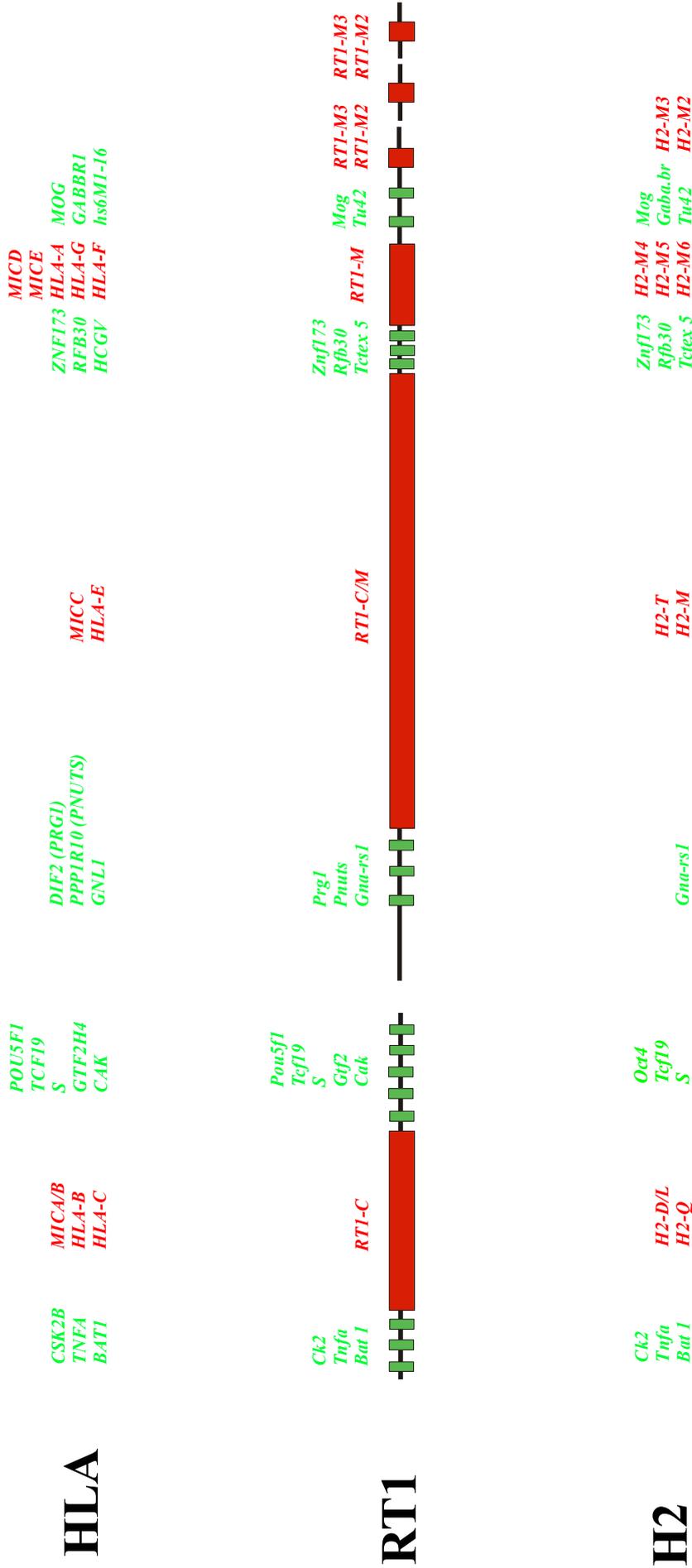


Abb. 37: Vergleich der erstellten RT1.C/M Karte mit den vorhandenen Daten aus dem HLA-Komplex (Forbes und Trowsdale, 1999) und H2-komplex (Amadou et al., 1999). In hellgrau wurden die aus konservierten Genen bestehenden *framework*-Abschnitte und in dunkelgrau die dazwischen liegenden Klasse-I-Regionen dargestellt.

5.5 Ausblick

Durch die vorgelegten Ergebnissen, wurde fast im ganzen die strukturelle Organisation der telomeren Klasse-I-Genregion, des Ratten MHC in einem Umfang von über 2 Mb aufgeklärt. Die Informationen aus den erstellten kontinuierlichen genomischen Contigs und die Identifizierung der gesamten auf diesen befindenden Klasse-I-Gene/Genfragmente sowie die Identifizierung und Feinkartierung einer hohen Anzahl von nicht Klasse-I-Genen, die in der Evolution konserviert geblieben sind, gewähren nun einen klaren Einblick in die Anordnung dieser besonders interessanten genomischen Region.

Der Vollständigkeithaber sollte in einem nächsten Schritt die noch bestehende Lücke zwischen dem Contig 1 und Contig 2 geschlossen werden. Die Zugehörigkeit der Contigs 3 und 4, welche eventuell das distalste Ende des Ratten MHC darstellen, sollte ebenfalls festgestellt werden.

Die vorgestellte Arbeit bildet den Meilenstein für das Starten systematischer Untersuchungen, welche nun zur Beantwortung langwierig gestellter Fragen auf einen schnelleren Weg weiterführen können. Z.B Fragen der Evolution des Haupthistokompatibilitätssystems, nachdem auch ausführliche Informationen aus der Analyse des MHC weiterer Spezies wie Mensch, Maus, usw. vorhanden sind. Aber auch genetische Vorgänge, die innerhalb der Spezies stattgefunden haben, könnten besser verstanden werden.

Die Verfeinerung unserer Kenntnisse über die Struktur des Ratten MHC hat präzisere Voraussetzungen verschafft zur Analyse von MHC-assoziierten Krankheitsbildern. Dazu könnte die transiente Transfektion von Zelllinien evt. mit ganzen PACs, die nun bekannte Gene tragen, behilflich sein. Ein zusätzliches weiterführendes Experiment wäre die Expressionanalyse, der identifizierten in der Evolution konservierten Gene.

Ganz präzise Informationen über die genaue Reihenfolge und Anzahl der Klasse-I-Gene wird natürlich die bevorstehende Sequenzierung dieser Region, anhand eines minimal Contigs liefern. Klasse-I-Gene können auf ihrer Restriktionsfunktion überprüft werden, um die Klasse-Ia bzw. Klasse-Ib-Gene bestimmen zu können.

Eine Reihe der beschriebenen weiterführenden Experimenten werden momentan in der Abteilung Immungenetik durchgeführt.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine genomische BAC-Bank aus der LEW.1W/Gun-Ratte erstellt, die aus 128.760 Klonen besteht. 50% dieser Klone haben kurze Inserts (\varnothing 6 kb), die restlichen 50% haben Inserts einer Durchschnittslänge von 50 kb. Zusätzlich wurden 33.600 Klone einer Durchschnittslänge von 30 kb etabliert. Insgesamt wurden 1,4 Genomäquivalente kloniert.

Nachdem eine PAC-Bank der BN-Ratte mit 10 Genomäquivalenten verfügbar war, wurde diese Bank genutzt, um die eigentliche Fragestellung, die Klonierung der RT1-C/M-Region des Ratten-MHC (*major histocompatibility complex*) zu beobachten. Insgesamt wurden 122 PAC-Klone der RT1-C/M-Region isoliert und in 4 Contigs angeordnet, die insgesamt ca. 2,3 Mb umfassen.

Das Contig 1 hat eine Größe von ca. 630 kb und ist in der Klasse-III-Region des MHC verankert. Es enthält einen ca. 350 kb langen, Klasse-I-Gene-tragenden Bereich, den sich eine weitere Region von in der Evolution konservierten Genen anschließt, wie z.B. *Pou5f1*, *Tcf19*, *S*, *Cak* und *Gtf2*. Diese Region entspricht der Lage nach der H2-D/L und H2-Q-Region des Maus-MHC.

Zwischen dem Contig 1 und dem folgenden Contig 2 besteht z.Z. noch eine Lücke, deren Größe auf ca. 200 kb geschätzt wird.

Das Contig 2 hat eine Größe von ca. 1500 kb, dessen erster Abschnitt ebenfalls aus einer Reihe konservierter Gene besteht, wie z.B. *Prg1*, *Pnuts* und *Gna-rs1*. In der darauffolgenden Region von ca. 800 kb finden sich Klasse-I-Gene. Auffällig ist in diesem Bereich ein Abschnitt von ca. 250 kb, welcher nur Klasse-I-Genfragmente enthält, die aus dem 3'-Ende eines Exon 2 bestehen. Am Beginn des Klasse-I-Abschnittes konnte die *grc*-Region (*growth und reproduction complex*) kartiert werden und benachbart das schon bekannte Gen *RT.BM1*. Durch weitere Sequenz-Informationen konnte die Orthologie zu der H2-T-Region des Maus-MHC abgeleitet werden. Das telomere Ende dieser Klasse-I-Region stellt offensichtlich den Beginn einer zur H2-M homologen Region dar, denn STS-Marker aus dem entsprechenden Bereich des Maus-MHC konnten hier kartiert werden. Im Anschluß wurden die konservierten Gene *Znf173*, *Rfb30* und *Tctex5* innerhalb von 60 kb kartiert. Es folgt eine kürzere Klasse-I-Region, bestehend aus drei Klasse-I-Genen in einem Abstand von ca. 140 kb unter denen das *RT1-M4* identifiziert wurde. Telomerwärts dieser zweiten Klasse-I-Region befinden sich zwei

weitere konservierte Gene, *Mog* und *Tu42*, und am äußersten Ende des Contigs 2 zwei RT1-M3-Gene.

Die folgenden Contigs 3 und 4 haben eine Länge von jeweils ca. 150 kb, wobei im Contig 3 ein *RT1-M3*- und ein *RT1-M2*-Gen und im Contig 4 ein weiteres *RT1-M2*-Gen identifiziert wurden. Im Gegensatz zur Maus sind entsprechend die *RT1-M2*- und *RT1-M3*-Gene bei der Ratte dupliziert.

Auch in der Ratte, wie beim Menschen und dem Maus-MHC, sind die Klasse-I-Regionen zwischen Blöcken konservierter Gene an orthologen Positionen gelegen. Durch diese Erkenntnisse über die Organisation der *RT1.C/M* Region des Ratten-MHC wird eindeutig, daß auch diese in dem von Amadou 1999 postulierten *framework* Modell paßt.

7. Literaturverzeichnis

Amadou C. (1999): Evolution of the Mhc class I region: the framework hypothesis. *Immunogenetics* **49**:362-367

Amadou C., Kumanovics A., Lambracht-Washington D., Yoshino M., Fischer Lindahl K. (1999): The mouse major histocompatibility complex: some assembly required. *Immunol Rev* **167**:211-221

Amadou C., Ribouchon M.T., Mattei M.G., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Copeland N.G., Avoustin P., Pontarotti P. (1995): Localization of new genes and markers to the distal part of the human major histocompatibility complex (MHC) region and comparison with the mouse: new insights into the evolution of mammalian genomes. *Genomics* **26**:9-20

Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J., Lanier L.L., Spies T. (1999): Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**:727-729

Beck S., Abdulla S., Alderton R.P., Glynne R.J., Gut I.G., Hosking L.K., Jackson A., Kelly A., Newell W.R., Sanseau P., Radley E., Thorpe K.L., Trowsdale J. (1996): Evolutionary dynamics of non-coding sequences within the class II region of the human MHC. *J Mol Biol* **255**:1-13

Bjørkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Benett W.S., Strominger J.L., Wiley D.C. (1987): The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* **329**:512-518

Bihoreau M.T., Gauguier D., Kato N., Hyne G., Lindpaintner K., Rapp J.P., James M.R., Lathrop G.M. (1997): A linkage map of the rat genome derived from three F2 crosses. *Genome Res* **7**:434-440

Birren B., Lai E. (1994): Rapid pulsed field separation of DNA molecules up to 250 kb. *Nucleic Acids Res* **22**:5366-5370

Boldyreff B., Issinger O.G. (1995): Structure of the gene encoding the murine protein kinase CK2 beta subunit. *Genomics* **29**:253-256

Brorson K.A., Richards S., Hunt S.W., Cheroutre H., Fischer Lindahl K., Hood L. (1989): Analysis of a new class I gene mapping to the Hmt region of the mouse. *Immunogenetics* **30**:273-283

Butcher G.W., Howard J.C. (1979): A recombinant in the major histocompatibility complex of the rat. *Nature* **266**:362-364

Cai L., Taylor J.F., Wing R.A., Gallagher D.S., Woo S.-S., Davis S.K. (1995): Construction and characterization of a bovine bacterial artificial chromosome library. *Genomics* **29**:413-425

Charles C., Yoon J.K., Simske J. S., Lau L. (1993): Genomic structure, cDNA sequence, and expression of gly96, a growth factor-inducible immediate-early gene encoding a short-lived glycosylated protein. *Oncogene* **8**:797-801

Chu T.W., Capossela A., Coleman R., Goei V.L., Nallur G., Gruen J.R. (1995): Cloning of a new „Finger“ protein gene (ZNF173) within the class I region of the human MHC. *Genomics* **29**:229-239

Colle E., Guttman R.D., Fuks A. (1986): Insulin-dependent diabetes mellitus is associated with genes that map to the right of the class I RT1.A locus of the major histocompatibility complex of the rat. *Diabetes* **35**:454-458

Cortese Hassett A.L.C., Locker J., Rupp G., Kunz H.W., Gill T. J. III (1989): Molecular analysis of the rat MHC II. Isolation of genes that map to the RT1.E-grc region. *J Immunol* **142**:2089-2096

Devlin J.J., Weiss E.H., Paulson M., Flavell R.A. (1985): Duplicated gene pairs and alleles of the class I genes in the Qa2 region of the murine major histocompatibility complex: a comparison. *EMBO J* **4**:3203-3207

- Diamond A. G., Hood L.E., Howard J.C., Windle M., Winoto A.** (1989): The class II genes of the rat MHC. *J Immunol* **142**:3268-3274
- Dominov J., Miller J.B.** (1996): POU homeodomain genes and myogenesis. *Dev Genet* **19**:108-118
- Dower W., Miller J.F., Ragsdale C.W.** (1988): High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**:6127-6145
- Drivas G.T., Shih A., Coutavas E.E., Rush M.G., D'Eustachio P.** (1990): Characterisation of four novel ras-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line. *Mol Cell Biol* **10**:1793-1798
- Duffy A.J., Coltman D.W., Wright J.M.** (1996): Microsatellites at a common site in the second ORF of L1 elements in mammalian genomes. *Mamm Genome* **7**:386-387
- Duran L.W., Zeller J.C., Lundy J.K., Chang-Miller A., Krco C.J., David C.S., Pease L.R.** (1987): Genetic analysis of the H-2D region using a new intra-D-region recombinant mouse stain. *J Immunol* **139**:2818-2824
- Fisher S.E., Vargja-Khadem F., Watkins K.E., Monaco A.P., Pembury M.E.** (1998): Localisation of a gene implicated in a severe speech and language disorder. *Nature Genet* **18**:168-170
- Forbes S.A., Trowsdale J.** (1999): The MHC quarterly report. *Immunogenetics* **50**:152-159
- Frohman M.A.** (1993): Rapid amplification of cDNA for generation of full-length cDNA ends: Thermal RACE. *Methods Enzymol* **218**:340-356
- Frohman M. A., Martin G.R.** (1988): Rapid amplification of cDNA ends using nested primers. *Technique* **1**:165

- Gill T.J. III, Salgar S.K., Yuan X.-J., Kunz H.W.** (1997): Current status of the genetic and physical maps of the major histocompatibility complex in the rat. *Transplant Proc* **29**:1657-1659
- Gorer P.A.** (1936): The detection of antigenic differences in mouse erythrocytes by the employment of immune sera. *Br J Exp Path* **17**:42-50
- Grant S.G.N., Jessee J., Bloom F.R., Hanahan D.** (1990): Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:4645-4649
- Groh V., Bahram S., Bauer S., Herman A., Beauchamp M., Spies T.** (1996): Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:12445-12450
- Gruen J.R., Weissman S.M.** (1997): Evolving views of the MHC. *Blood* **90**:4252-4265
- Guerrin M., Simon M., Montezin M., Haftek M., Vincent C., Serre G.** (1998): Expression cloning of human corneodesmosin proves its identity with the product of the S gene and allows improved characterisation of its processing during keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* **274**:22640-22647
- Guillaudeux T., Janer M., Wong G. K-S., Spies T., Geraghty D.E.** (1998): The complete genomic sequence of 424,015 bp at the centromeric end of the HLA class I region: Gene content and polymorphism. *Proc. Natl Acad Sci USA* **95**:9494-9499
- Günther E.** (1985): Immunogenetic aspects of organ transplantation in the rat. In: Thiede A., Deltz E., Engemann R, und Hamelmann H. (Hrsg) *Microsurgical Models in Rats for Transplantation Research*, Berlin, Springer pp. 83-94
- Günther E.** (1990): Immunological markers. In: Hedrich H.J. (Hrsg) *Genetic Monitoring of Inbred Strains of Rats*, Stuttgart New York, Fischer pp. 23-35

Günther E. (1996): Current status of the molecular genetic analysis of the rat major histocompatibility complex. *Folia Biol (Praha)* **42**:129-145

Günther E., Kiesel U., Kolb H., Krawczak M., Rothermel E., Wurst W. (1991): Genetic analysis of susceptibility to diabetes meletus in F2-hybrids between diabetes-prone BB and various MHC-recombinant congenic rat strains. *J Autoimmun* **4**:543-551

Günther E., Wurst W. (1984): Cytotoxic T lymphocytes of the rat are predominantly restricted by RT1.A and not RT1.C-determined major histocompatibility complex class I antigens. *Immunogenetics* **20**:1-12

Günther E., Wurst W., Wonigeit K., Epplen J. T. (1985): Analysis of the rat major histocompatibility complex by Southern blot hybridization. *J Immunol* **134**:1257-1261

Günther E., Butcher G., Gill T.J. III, Kunz H.W., Natori T. (1997): Report on rat chromosome 20. *Rat Genome* **3**:97-107

Hänze J., Fischer L., Koenen M., Worgall S., Rascher W. (1998): Electroporation of nucleic acids into prokaryotic and eukaryotic cells by square wave pulses. *Biotechnology Techniques* **12**:159-163

Helou K., Walter L., Günther E., Levan G. (1998): Cytogenetic orientation of the rat major histocompatibility complex (MHC) on chromosome 20. *Immunogenetics* **47**:166-169

Henry J., Ribouchon M.T., Depetris D., Mattei M.G., Offer C., Tazi-Ahnini R., Pontarotti P. (1997): Cloning, structural analysis, and mapping of the B30 and B7 multigenic families to the major histocompatibility complex (MHC) and other chromosomal regions. *Immunogenetics* **46**:383-395

Hosida F., Nishimura S., Uchida H., Ohki M. (1990): An F factor based cloning system for large DNA fragments. *Nucleic Acids Res* **18**:3863-3869

Hunt III S. W., Cook M. E., Ecklund S.R. (1993): Fine map of the region homologous to the rat grc complex in the TL region of the mouse. *Immunogenetics* **37**:386-389

Jameson S. C., Tope W.D., Tregett E. M., Windle J.M., Diamond A. G., Howard J.C. (1992): Cloning and expression of class I major histocompatibility complex genes of the rat. *J Exp Med* **175**:1749-1757

Janer M., Geraghty D.E. (1998): The human major histocompatibility complex: 42,221 bp of genomic sequence, high-density sequence-tagged site map, evolution, and polymorphism for HLA class I. *Genomics* **51**:35-44

Jensen (1903): zitiert nach Klein J. (1986)

Joly E., Clarkson C., Howard J.C., Butcher G.W. (1995): Isolation of a functional cDNA encoding the RT1.A^u MHC class I heavy chain by a novel PCR-based method. *Immunogenetics* **41**:326-328

Jones E.P., Kumanovics A., Yoshino M., Fischer Lindahl K. (1999): Mhc class I and non-class I gene organization in the proximal H2-M region of mouse. *Immunogenetics* **49**:183-195

Jones E.P., Xiao H., Schultz R.A., Flaherty L., Trachtulec Z., Vincek V., Larin Z., Lehrach H., Fischer Lindahl K. (1995): MHC class I gene organization in >1.5 Mb YAC contigs from the H2-M region. *Genomics* **27**:40-51

Kim U-J., Birren B.W., Slepak T., Mancino V., Boysen C., Kang H.-L., Simon M.I., Shizuya H. (1996): Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* **34**:213-218

Klein J. (1986): Natural History of the Major Histocompatibility Complex. Wiley, New York

Klein J., Figueroa F. (1986): Evolution of the major histocompatibility complex. *CRC Crit Rev Immunol* **6**:295-387

Klein J., Sato A., O'hUigin C. (1998): Evolution by gene duplication in the major histocompatibility complex. *Cytogenet Cell Genet* **80**:123-127

- Kirisits M.J., Vardimon D., Kunz H.W., Gill T.J. III** (1994): Mapping of the TNFA locus in the rat. *Immunogenetics* **39**:59-60
- Kobayashi T., Hirayama Y., Kobayashi E., Kubo Y., Hino O.** (1995): A germline insertion in the tuberous sclerosis (Tsc2) gene gives rise to the Eker rat model of dominantly inherited cancer. *Nature Genet* **9**:70-74
- Krishnan B.R., Jamry I., Chaplin D.D.** (1995): Feature mapping of the HLA class I region: localization of the POU5F1 and TCF19 genes. *Genomics* **30**:53-58
- Kunz H.W., Gill T.J. III, Dixon B.D., Taylor F.H., Greiner D.L.** (1980): Growth and reproduction complex in the rat: genes linked to the major histocompatibility complex that affect development. *J Exp Med.* **152**:1506-1518
- Kwon J., Chung I.Y., Benveniste E.N.** (1993): Cloning and sequence analysis of the rat tumor necrosis factor-encoding genes. *Gene* **132**:227-236
- Lambracht D., Hänisch L., Wurst W., Günther E., Wonigeit K.** (1990): Restriction fragment-length polymorphism analysis of a second laboratory-derived mutant RT1 haplotype. *Transplant Proc* **22**:2512-2513
- Lambracht D., Prokop C., Hedrich H.J., Fischer Lindahl K., Wonigeit K.** (1995): Mapping of the H2-M homolog and MOG genes in the rat MHC. *Immunogenetics* **42**:418-421
- Lambracht-Washington D., Shisa H., Butcher G.W., Fischer Lindahl K.** (1998): A polymorphic microsatellite marker in the rat major histocompatibility complex class I gene, RT1.M4, and a new recombinant RT1 haplotype, r39. *Immunogenetics* **48**:420-421
- Lambracht D., Wonigeit K., Howard J.C., Fischer Lindahl K.** (1997): Markers for interspecies relationship in the RT1 complex. *Transplant Proc* **29**:1665-1667
- Laval S., Butler R., Shelling a.N., Handy A.M., Poulson R., Ganesan T.S.** (1994): Isolation and characterization of an epithelial-specific receptor tyrosine kinase from an ovarian cancer cell line. *Cell Growth Diff.* **5**:1173-1183

Leong L.Y., Le Rolle A.F., Deverson E.V., Powis S.J., Larkins A.P., Vaage J.T., Stokland A., Lambracht-Washington D., Rolstad B., Joly E., Butcher G.W. (1999): RT1-U: identification of a novel, active, class Ib alloantigen of the rat MHC. *J Immunol* **162**:743-52

Marinoni J.C., Roy R., Vermeulen W., Miniou P., Lutz Y., Weeda G., Seroz T., Gomez D.M., Hoeijmakers J.H., Egly J.M. (1997): Cloning and characterization of p52, the fifth subunit of the core of the transcription/DNA repair factor TFIIH. *EMBO J* **16**:1093-1102

Matsuura A., Takayama S., Kinebuchi M., Hashimoto Y., Kasai K., Kozutsumi D., Ichimiya S., Honda R., Natori T., Kikuchi K. (1997): RT1.P, rat class Ib genes related to mouse TL: evidence that CD1 molecules but not authentic TL antigens are expressed by rat thymus. *Immunogenetics* **46**:293-306

Miller J.F., Dower W.J., Tompkins L.S. (1988): High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**:856-860

Monaco A.P., Larin Z. (1994): YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *TIBTECH* **12**:280-286

Müller U., Jongeneel C.V., Nedospasov S.A., Fischer Lindahl K., Steinmetz M. (1987): Tumor necrosis factor and lymphotoxin genes map close to H-2D in the mouse major histocompatibility complex. *Nature* **325**:265-267

Nair S., Dey R., Sanford J.P., Doyle D. (1992): Molecular cloning and analysis of an eIF-4A-related rat liver nuclear protein. *J Biol Chem* **267**:12928-12935

Osoegawa K., Woon P.Y., Zhao B., Frengen E., Tateno M., Catanese J.J., de Jong P.J. (1998): An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries. *Genomics* **52**:1-8

Pamer E.G., Wang C.R., Flaherty L., Fischer Lindahl K. und Bevan M.J. (1992): H-2M3 presents a *listeria monocytogenes* peptide to CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Cell* **70**:215-223

Parker K., Carter C.A., Fabre J.W. (1990): A rat class I cDNA clone with an Alu-like sequence and mapping to two genes in RT1.C/E. *Immunogenetics* **31**:211-214

Parker K.E., Carter C.A. Murphy G., Fabre J.W. (1991): The rat RT.BM1 MHC class I cDNA shows a high level of sequence similarity to the mouse H-2T23d gene. *Immunogenetics* **34**:211-3

Pham-Dinh D., Jones E.P., Pitiot G., Della Gaspera B., Daubas P., Mallet J., Le Paslier D., Fischer Lindahl K., Dautigny A. (1995): Physical mapping of the human and mouse MOG gene at the distal end of the MHC class Ib region. *Immunogenetics* **42**:386-391

Pham-Dinh D., Mattei M-G., Nussbaum J.L., Roussel G., Pontarotti P., Roeckel N., Mather I.H., Artzt K., Fischer Lindahl K., Dautigny A. (1993): Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:7990-7994

Pierce J.C., Sternberg N., Sauer B. (1992): A mouse genomic library in the bacteriophage P1 cloning system: organization and characterisation. *Mamm Genome* **3**:550-558

Pietzsch A., Büchler C., Schmitz G. (1998): Genomic organization, promoter cloning, and chromosomal localization of the Dif-2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **245**:651-657

Rolstad B., Vaage J.T., Naper C., Lambracht D., Wonigeit K., Joly E., Butcher G.W. (1997): Positive and negative recognition by rat NK cells. *Immunol Rev* **155**:91-104

Rosner M.H., Vigaro M.A., Ozato K., Timmons P.M., Poirier F., Rigny P.W.J., Staudt L.M. (1990): A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* **345**:686-692

Rothermel E., Heine L., Wurst W., Günther E. (1993): Characterization of a class Ib gene of the rat major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **38**:82-91

- Rubocki R.J., Lee D.R., Lie W.-R. Myers N.B. Hansen T.H.** (1990): Molecular evidence that the H-2D and H-2L genes arose by duplication. Differences between the evolution of the class I genes in mice and humans. *J Exp Med* **171**:2043-2061
- Salgar S.K., Kunz H.W., Gill T. J. III** (1995): Nucleotide sequence and structural analysis of the rat RT1.Eu and RT1.Aw3 genes, and of genes related to RT1.O and RT1.C. *Immunogenetics* **42**:244-53
- Salgar S.K., Kunz H.W., Gill T.J. III** (1998): Structural organization, sequence analysis, and physical mapping of the Grc-linked class Ib gene RT1.S3 in the rat. *Immunogenetics* **48**:76-81
- Salgar S., Yuan X., Kunz H.W., Gill T.J. III** (1997): Physical mapping and structural analysis of new gene families RT1.S and Rps2r in the grc region of the rat major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **45**:353-364
- Schäfer H., Trauzold A., Siegel E.G., Fölsch U.R., Schmidt W.E.** (1996): PRG1: a novel early-response gene transcriptionally induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in a pancreatic carcinoma cell line. *Cancer Res* **56**:2641-2648
- Schöler H.R., Dressler G.R., Balling R., Rohdewohld H., Gruss P.** (1990): Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* **9**:2185-2195
- Schöler H.R., Ruppert S., Suzuki N., Chowdhury K., Gruss P.** (1990): New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* **344**:435-439
- Sheng Y., Mancino V., Birren B.** (1995): Transformation of Escherichia coli with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res* **23**:1990-1996
- Shiina T., Kikkawa E., Saito W., Tamiya G., Oka A., Watanabe K., Yamazaki M., Tashiro H., Okumura K., Ando A., Kimura M., Soeda E., Pontarotti P., Inoko H.** (1998): Physical mapping between the S and HLA-E genes in the human MHC class I region: construction of a BAC, PAC, and cosmid contig. *Immunogenetics* **48**:402-407

Shiina T., Tamiya G., Oka A., Takishima N., Inoko H. (1999): Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region. *Immunol Rev* **167**:193-199

Shiina T., Tamiya G., Oka A., Yamagata T., Yamagata N., Kikkawa E., Goto K., Mizuki N., Watanabe K., Fukuzumi Y., Taguchi S., Sugawara C., Ono A., Chen L., Yamazaki M., Tashiro H., Ando A., Ikemura T., Kimura M., Inoko H. (1998): Nucleotide sequencing analysis of the 146-kilobase segment around the IkBL and MICA genes at the centromeric end of the HLA class I region. *Genomics* **47**:372-382

Shizuya H., Birren B., Kim U.J., Marcino V., Slepak T., Tachiiri Y., Simon M. (1992): Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:8794-8797

Snell G.D. (1948): Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genetics* **49**:87-108

Stark O., Günther E., Kohoutova M., Vojcik L. (1977): Genetic recombination in the major histocompatibility complex (H-1, AgB) of the rat. *Immunogenetics* **5**:183-187

Steinmetz M., Stephan D., Fischer Lindahl K. (1986): Gene organization and recombinational hotspots in the murine major histocompatibility complex. *Cell* **44**:895-904

Steinmetz M., Winoto A., Minard K., Hood L. (1982): Clusters of genes encoding mouse transplantation antigens. *Cell* **28**:125-134

Stephan D., Fischer Lindahl K., Meyer E., Hämmerling G., Hood L., Steinmetz M. (1986). Organization and evolution of D region class I genes in the mouse major histocompatibility complex. *J Exp Med* **163**:1227-1244

Sternberg N. (1990): Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**:103-107

The MHC sequencing consortium (1999): Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* **401**:921-923

Thomson G. (1995) HLA disease associations: models for the study of complex genetic disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* **32**:183-195

Totaro A., Grifa A., Carella M., Rommens J.M., Valentino M.A., Roetto A., Zelante L., Gasparini P. (1998): Cloning of a new gene (FB19) within HLA class I region. *Chem Biophys Res Commun* **250**:555-557

Trowsdale J. (1995): ‚Both man & bird & beast‘: comparative organization of MHC genes. *Immunogenetics* **41**:1-17

Uehara H. (1991): Mouse Oct-3 maps between the tcl12 embryonic lethal gene and the Qa gene in the H-2 complex. *Immunogenetics* **34**:266-269

Vardimon D., Locker J., Kunz H.W., Gill T. J. III (1992): Physical mapping of the MHC and grc by pulsed field electrophoresis. *Immunogenetics* **35**:166-175

Vernet C., Ribouchon M-T., Chimini G., Pontarotti P. (1994): Structure and evolution of a member of a new subfamily of GTP-binding proteins mapping to the human MHC class I region. *Mamm Genome* **5**:100-105

Wai L. T., King-C. Chow (1995): A modified medium for efficient electrotransformation of E.coli. *Trends Genet* **1**:128-129

Walter L., Günther E. (1995): Cosmid cloning of the RT1.A encompassing region of the rat major histocompatibility complex. *Transplant Proc* **27**:1501

Walter L., Günther E. (1997): Clonal contigs of the class I regions of the rat major histocompatibility complex. *Transplant Proc* **29**:1660

Walter L., Günther E. (1998): Identification of a novel highly conserved gene in the centromeric part of the major histocompatibility complex. *Genomics* **52**:298-304

Walter L., Günther E. (2000): Physical mapping and evolution of the centromeric class I gene-containing region in the rat MHC. *Immunogenetics*, im Druck.

Walter L., Fischer K., Günther E. (1996): Physical mapping of the Ring1, Ring2, Ke6, Rxrb, Col11a2, and RT1.Hb genes in the rat major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **44**:218-221

Walter L., Heine L., Günther E. (1994a): Sequence, expression, and mapping of a rat Mhc class Ib gene. *Immunogenetics* **39**:351-354

Walter L., Rauh F., Günther E. (1994b): Comparative analysis of the three major histocompatibility complex-linked heat shock protein 70 (Hsp70) genes of the rat. *Immunogenetics* **40**:325-330

Walter L., Tiemann C., Heine L., Günther E. (1995): Genomic organization and sequence of the rat major histocompatibility complex class Ia gene RT1.Au. *Immunogenetics* **41**:332

Wang C.R., Fischer Lindahl K. (1993): Organization and structure of the H-2M4-M8 class I genes in the mouse major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **38**:258-271

Wang C.R., Loveland B.E., Fischer Lindahl K. (1991): H-2M3 encodes the MHC class I molecule presenting the maternally transmitted antigen of the mouse. *Cell* **66**:335-345

Wang C.R., Lambracht D., Wonigeit K., Howard J.C., Fischer Lindahl K. (1995): Rat RT1 orthologs of the mouse H2-M class Ib genes. *Immunogenetics* **42**:63-67

Wang G.L., Holsten T.E., Song W-Y., Wang H-P., Ronald P.C. (1995): Construction of a rice bacterial artificial chromosome library and identification of clones linked to the Xa-21 disease resistance locus. *Plant J* **7**:525-533

Wang M., Chen X-N., Shouse S., Manson J., Wu Q., Li R., Wrestler J., Noya D., Sun Z.G., Korenberg J., Lai E. (1994): Construction and characterization of a human chromosome 2-specific BAC library. *Genomics* **24**:527-534

Wang M., Stepkowski S.M., Tian L., Langowski J.L., Hebert J.S., Kloc M., Yu J., Kahan B.D. (1996): Nucleotide sequences of the distinct cDNA clones coding for the rat class I heavy chain RT1ⁿ antigen. *Immunogenetics* **45**:73-75

Watts S., Davis A.C., Goodenow R.S. (1989): Sequence analysis of the C3H H-2K1k gene: relationship to the H-2 loci. *Immunogenetics* **29**:355-357

Weiss E.H., Golden L., Fahrner K., Mellor A.L., Devlin J.J., Bullman H., Tiddens H., Bud H., Flavell R.A. (1984): Organization and evolution of the class I gene family in the major histocompatibility complex of the C57BL/10 mouse. *Nature* **310**:650-655

Widmark E., Ronne H., Hämmerling U., Servenius B., Larhammar D., Gustafsson K., Böhme J., Peterson P., Rask L. (1988): Family relationships of murine major histocompatibility complex class I genes sequence of the T2A pseudogene, a member of the gene family 3. *J Biol Chem* **263**:7055-7059

Woo S.S., Jiang J., Gill B.S., Paterson A. H., Wing R.A. (1994): Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorgum bicolor*. *Nucleic Acids Res* **22**:22-49

Woodcock M., Crowther P.J., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S.S., Michael M., Graham M.W. (1989): Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**:3469-3478

Woon P.Y., Osoegawa K., Kaisaki P.J., Zhao B., Catanese J.J., Gauguier D., Cox R., Levy E.R., Lathrop G.M., Monaco A.P., de Jong P.J. (1998): Construction and characterization of a 10-fold genome equivalent rat P1-derived artificial chromosome library. *Genomics* **50**:306-316

Wroblewski J.M., Kaminsky S.G., Milisauskas V.K., Pittman A.M., Chaplin D.D., Spies T., Nakamura I. (1990): The B144-H-2D^b interval and the location of the mouse homologue of the human D6S81E locus. *Immunogenetics* **32**:200-204

Wroblewski J. M., Kaminsky S. G., Nakamura I. (1994): Bat-1 genes and the origin of multiple class I loci in the H-2D region. *Immunogenetics* **39**:276-280

Young I.Y., Abe K., Bennett D., Artzt K. (1992): Testis-/embryo-expressed genes are clustered in the mouse H-2K region. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:773-777

Yuan X.J., Salgar S., Cortese Hassett A.L., McHugh K.P., Kunz H.W., Gill T.J. III (1996): Physical mapping of the E/C and grc regions of the rat major histocompatibility complex. *Immunogenetics* **44**:9-18

Yuan X.-J., Kunz H.W., Gill T.J. III (1999): Physical mapping and sequencing of class I genes in a 150-kb contig in the EC region. *Transplant Proc* **31**:1507-1512

Zhou Y., Chaplin D.D. (1993): Identification in the HLA class I region of a gene expressed late in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:9470-9474

Zimmer R., Verrinder Gibbins A.M. (1997): Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics* **42**:217-226

8. Anhang 1

8.1 Zusammenstellung der insgesamt erhaltenen PAC-Klone aus mehreren *Screenings* der Ratten-Bank

Tab. 9: PAC-Klone aus dem α 1-*Screening*

	PAC	Filter Nummer	Koordinaten	Contig
1	P13303	110-5-138	179 164, 180 161	1
2	L10324	110-5-138	192 103, 192 101	1
3	A22327	110-5-138	134 238, 131 239	1
4	O17511	110-7-158	39 86, 36 86	1
5	L12516	110-7-158	184 101, 181 101	1
6	O10516	110-7-158	194 86, 191 86	2-1
7	E22540	110-7-158	132 138, 132 136	2-1
8	E23540	110-7-158	127 138, 127 136	2-1
9	C05559	110-7-158	100 148, 97 147	2-1
10	A22571	110-7-158	15 157, 13 156	2-1
11	C2331	110-1-116	7 146, 7 148	1
12	C2431	110-1-116	2 146, 2 148	1

13	J1031	110-1-116	72 111, 72 113	2-1
14	B1340	110-1-116	59 73, 56 74	2-1
15	G0249	110-1 116	113 130, 111 128	2-2
16	I2086	110-2-127	144 39, 145 36	2-1
17	B16100	110-2-127	42 75, 45 74	2-1
18	L22115	110-2-127	15 105, 12 104	2-1
19	M11116	110-2-127	190 20, 187 19	2-1
20	J02139	110-2-127	115 112, 113 111	2-1
21	J12142	110-2-127	65 32, 63 31	1
22	E05168	110-3-110	219 140, 218 137	1
23	K03168	110-3-110	229 110, 228 107	1
24	D07219	110-4-122	206 225, 206 222	1
25	K18224	110-4-122	154 26, 151 26	1
26	J18229	110-4-122	34 114, 35 111	1
27	K05363	110-6-116	216 190, 216 187	2-2
28	E16374	110-6-116	164 59	2-1
29	F01374	110-6-116	239 54	2-1

30	H04473	110-6-161	104 203, 101 204	1
31	K19473	110-6-161	29 188, 26 189	1
32	L08487	110-6-161	85 103, 82 102	1
33	F05583	110-9-122	99 131, 96 131	2-1
34	H12587	110-9-122	64 201, 61 201	2-2
35	B18613	110-9-122	34 153, 31 154	2-1
36	C1796	110-2-127	159 150, 158 147	2-1
37	N01508	110-7-158	116 15, 116 12	RT1-A (<i>RingI+</i>)
38	J23517	110-7-158	9 114, 10 111	RT1-A (<i>RingI+</i>)
39	O18535	110-7-158	32 88, 32 86	RT1-A
40	G11561	110-7-158	190 208, 187 207	RT1-A (<i>RingI+</i>)
41	O02564	110-7-158	235 88, 232 87	RT1-A (<i>RingI+</i>)
42	N03344	110-5-138	230 13, 227 12	RT1-A
43	P09456	110-6-161	199 85, 198 82	RT1-A
44	D07348*	110-5-138	210 143, 207 142	Falsch positiv
45	C15354*	110-5-138	169 147, 168 149	Falsch positiv
46	A17269	110-4-122	38 240, 36 238	Falsch positiv

47	M04281	110-4-122	103 179, 104 177	Falsch positiv
48	N04397	110-6-116	104 93, 101 94	Falsch positiv
49	I09407	110-6-116	80 200, 77 199	Falsch positiv
50	L19588*	110-9-122	149 101, 146 101	Falsch positiv
51	M19588*	110-9-122	149 96, 146 96	Falsch positiv
52	E01596	110-9-122	120 58, 117 57	Falsch positiv
53	G16598	110-9-122	165 128, 162 127	Falsch positiv
54	F24606	110-9-122	125 52, 123 51	Falsch positiv
55	A17612	110-9-122	157 158, 157 156	Falsch positiv
56	J04363	110-6-116	221 195, 221 192	Falsch positiv
57	L0831			Dieser Klon muß überprüft werden

Kommentar zu Tab. 9:

Die mit Sternchen gekennzeichneten falsch-positiven Klone zeigten mittelstarke Signale in dem Filter-*screening*. Die übrigen falsch positive Klone waren im Filter-*Screening* nur sehr schwach positiv.

Von den 12 falsch-positiven Klonen, zeigten 8 sehr schwache Signale auf dem Hybridisierungs-Filter. Diese könnten bei der prozentualen Berechnung der falsch-positiven Klone vernachlässigt werden. Vier der falsch-positiven Klone sind mit Sternchen gekennzeichnet und zeigen auf dem Hybridisierungs-Filter mittelstarke Signale.

Klon L0831 muß erneut überprüft werden, ob er als positiv oder falsch-positiv eingeordnet werden muß.

Aus dem α 1-*Screening* wurden 44 positive Klone erhalten. Siebenunddreißig wurden der *RTI-C*-Region zugeordnet und sind in den konstruierten Contigs wiederzufinden. Sieben gehören der *RTI-A*-Region an.

Tab. 10: PAC-Klone aus dem α 3-Screening

	PAC	Filter Nummer	Koordinaten	Contig
1	K145	110-1-116	51 190, 51 187	2-3
2	A1426	110-1-116	175 79, 172 80	2-2
3	A1638	110-1-116	164 78, 161 79	3
4	A2052	110-1-116	23 80, 21 78	2-2
5	N1554	110-1-116	168 95, 166 93	2-2
6	N1654	110-1-116	163 95, 161 93	2-2
7	B2066	110-1-116	143 154, 144 152	2-2
8	J0567	110-1-116	100 112, 98 111	2-3
9	J2298	110-2-127	135 34, 132 35	2-2
10	A23104	110-2-127	127 78, 127 76	2-3
11	N20105	110-2-127	142 173, 142 171	2-3
12	I19108	110-2-127	147 118, 147 116	2-1
13	L03108	110-2-127	227 103, 227 101	2-2
14	P05116	110-2-127	220 5, 217 4	2-1
15	P15129	110-2-127	170 163, 167 162	2-2

16	J01132	110-2-127	240 113, 237 112	2-2
17	P20143	110-2-127	25 162, 23 161	3
18	A05218	110-4-122	216 80, 216 77	2-3
19	J20226	110-4-122	24 31, 21 31	2-2
20	I12230	110-4-122	184 39, 185 36	4
21	H18232	110-4-122	35 41, 34 44	2-3
22	M18242	110-4-122	155 19, 152 20	3
23	M23252	110-4-122	127 98, 127 96	4
24	C04253	110-4-122	204 228, 202 227	2-2
25	E04256	110-4-122	104 58, 102 59	2-2
26	C08258	110-4-122	204 148, 201 149	2-2
27	M02271	110-4-122	115 98, 112 97	2-2
28	C08273	110-4-122	205 228, 202 227	4
29	I13315	110-5-134	180 199, 177 200	3
30	N13332	110-5-134	180 15, 177 14	4
31	D15335	110-5-134	50 225, 47 224	2-2
32	A10338	110-5-134	193 80, 191 78	2-2

33	K09358	110-5-134	80 27, 78 26	2-3
34	E12360	110-5-134	185 137, 183 136	2-1
35	K20363	110-6-116	141 190, 141 187	3
36	A18367	110-6-116	34 156, 31 156	2-2
37	K15386	110-6-116	170 29, 167 30	2-3
38	L19417	110-6-116	150 183, 147 182	2-3
39	D13419	110-6-116	60 223, 57 222	2-3
40	E04428	110-6-116	225 57, 223 56	2-2
41	D03460	110-6-161	110 64, 107 65	2-2
42	P08462	110-6-161	205 84, 202 85	2-2
43	J21470	110-6-161	139 33, 136 34	2-3
44	H11471	110-6-161	189 203, 186 204	2-3
45	O02480	110-6-161	235 90, 232 89	2-3
46	K06484	110-6-161	93 30, 91 28	3
47	E19510	110-7-158	146 140, 146 137	2-3
48	E21511	110-7-158	19 136, 16 136	2-3
49	I10519	110-7-158	194 199, 195 196	2-2

50	G07520	110-7-158	89 49, 90 46	3
51	G01543	110-7-158	239 208, 236 209	2-1
52	B02559	110-7-158	115 153, 112 152	2-2
53	J06559	110-7-158	95 113, 92 112	4
54	P05384	110-9-122	205 152, 203 151	2-1
55	K0988	110-2-127	80 26, 79 29	2-1
56	I16274	110-4-122	45 38, 42 37	2-1
57	B08610	110-9-138	205 152, 203 151	2-2
58	J08559	110-7-158	85 113, 82 112	4
59	O02611	110-9-122	112 168, 112 166	3
60	O11597	110-9-122	189 170, 188 167	3
61	G03460	110-6-161	110 49, 107 50	2-2
62	G03251*	110-4-122	107 208, 107 206	Starkes Signal
63	P20279*	110-4-122		Starkes Signal
64	H24281	110-4-122		Sehr schwaches Signal
65	M13574	110-7-158	60 17, 58 16	Sehr schwaches Signal
66	A08445	110-6-161	85 156, 84 159	Sehr schwaches Signal

Kommentar zu Tab. 10:

Von den 66 positiven Reaktionen waren bei der Überprüfung der Klone selbst 5 negativ, wobei drei davon beim Filter-*Screening* sehr schwache Signale ergeben haben. Die Klone G03251 und P20279 zeigten im ursprünglichen Filter-*Screening* starke Signale, waren jedoch im Southernblot negativ.

Tab. 11: Erhaltene PAC-Klone aus dem *Screening* mit der *Bat1*-Probe

	PAC	Koordinaten	Contig
1	A14588	171 78, 173 80	1
2	G17337	36 128, 38 130	1
3	O06367	91 86, 94 86	1

Tab. 12: PAC-Klone aus dem gleichzeitigen *Screening* mit den Proben TCF19, Gna-rs1, RFB30, Tctex5 und Tu42.

	PAC	Filter Nummer	Koordinaten	Contig	Hybridisierung mit der Probe
1	I16223	110-4-122	44 116, 41 116	2-1	Gna-rs1
2	O22140	110-2-127	135 7, 133 6	2-3	Tctex5
3	K08519	110-7-158	204 189, 205 186	2-3	Tctex5
4	O21242	110-4-122	140 9, 137 10	2-3	Tu42
5	H10232	110-4-122	75 41, 74 44	2-3	Tu42

Tab. 13: Klone aus dem *Screening* mit RFB30.

	PAC	Filter Nummer	Koordinaten	Contig
1	P20499	110-7-107	25 82, 23 81	2-3

Tab. 14: Klone aus dem gleichzeitigen *Screening* mit 255D16 und H2-M2.

	PAC	Filter Nummer	Koordinaten	Contig	Hybridisierung mit der Probe
1	I1448	110-10-132	175 120, 172 119	2-2	255D16
2	L1748	110-10-132	160 105, 157 104	3	H2-M2

Tab. 15: Positive Klone aus dem Prg1-Screening

	PAC	Filter Nummer	Koordinaten	Contig
1	E06479	110-7-107	95 220, 92 219	2-1
2	F05479	110-7-107	100 215, 97 214	2-1

Tab. 16: Positive Klone aus dem H125T Screening

	PAC	Filter Nummer	Koordinaten	Contig
1	C15160	110-3-119	49 69, 50 66	2-2
2	P04519	110-8-104	225 161, 224 164	2-1
3	N12311	110-5-143	64 175, 63 172	2-1
4	E17538	110-8-104	37 58, 37 56	2-2
5	E14284	110-4-131	175 57, 173 56	2-1
6	B08610	110-9-138	205 152, 203 151	2-1
7	A02552	110-8-104	235 160, 232 159	2-1

Tab. 17: Positive Klone aus dem CAK und GTF Screening*

	PAC	Filter Nummer	Koordinaten	Contig
1	A24506	110-8-108	121 80, 121 77	1
2	K11482	110-7-111	188 30, 186 28	1
3	N0751	110-9-155	208 175, 206 173	1
4	H13218	110-4-135	176 45, 176 42	1
5	D20510	110-8-108	141 145, 141 142	1

*Die Hybridisierung des Southernblots mit den entsprechenden Proben wurde nach Fertigstellung der experimentellen Arbeiten in der Abteilung Immungenetik durchgeführt.

In der Abbildung 38 wurde übersichtlich die Anzahl der aus den verschiedenen *Screenings* erhaltenen PAC-Klone.

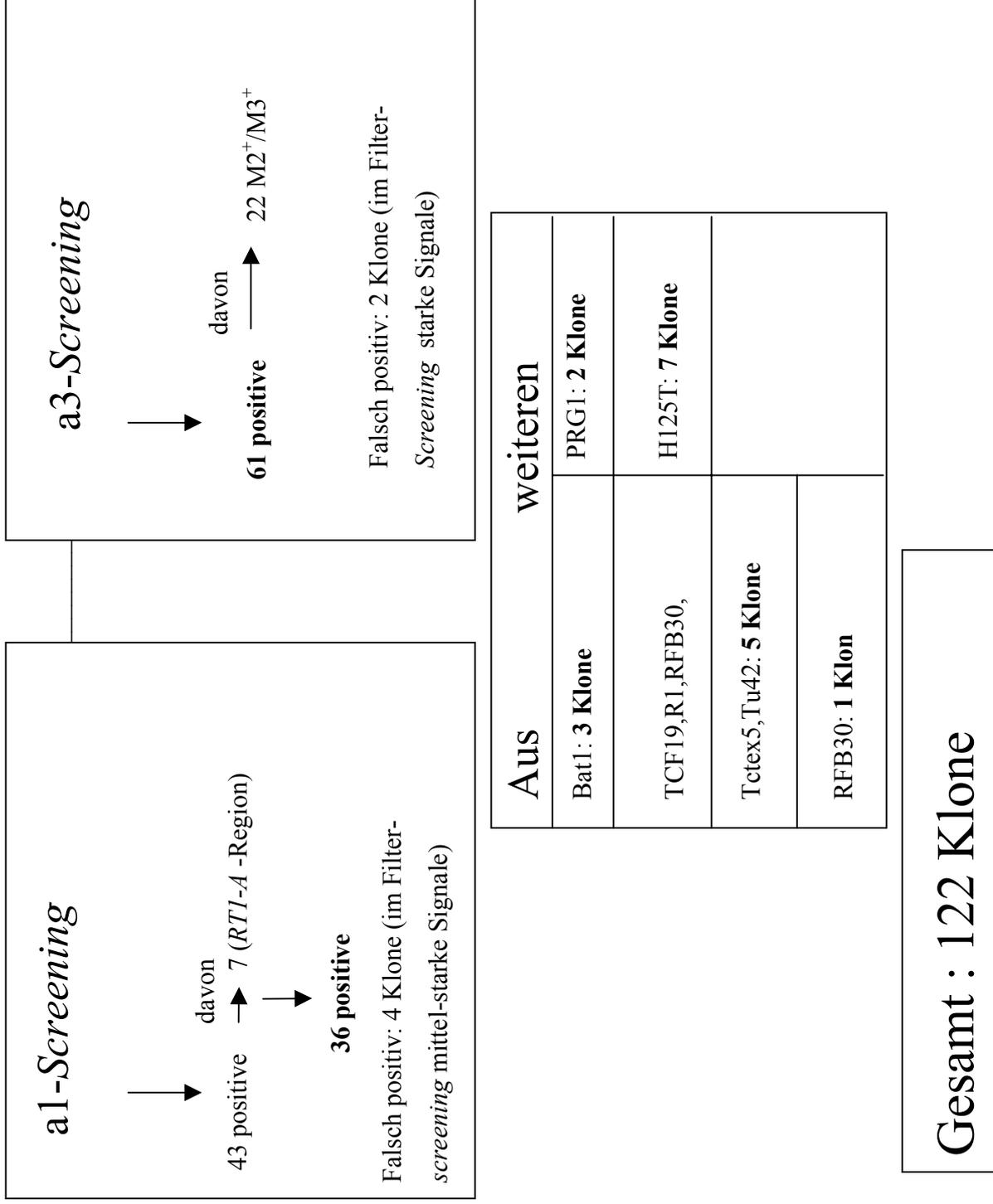


Abb. 38: Übersicht der PAC-Klone aus den verschiedenen

8.2 Sequenzdaten aus PAC-Endsequenzierung

>A14588 (CK2)

TGGGCGACCCCATTTAGGTGACACTATAGAAGGATCACAcTTTTTTGANCTTCAGAGGNACCCATGGGTTAGACAGGCAGTCTGAGCAGAAACTGCTGTGGGTGCAGAGGTGCACTCCTGTCTGAGGCAGGGTCCTGACCAGAGGAGGAAGTTATCTATTGGCAGGAAGAATGGCCCGTCCTCACCCACACTGTCTGGTTTCCATGTGGGCCACAGCCGAGTACCAGCTGGCTTTATCAGGTGTCTTTATNCCAGACACTGCCTTGAAAGGCCCATGCCACCTCAGGGACCACCGCTTAGTCTGTCTCTGGCACTGCCTGCTGTCACCTACACAGCAGGNTTGGTCCCCATTATTCGGGGAGAGGTTGGCcAGAGACAAAGCCTCCCAACCTTTCCAGATGTGTCTCTGNGTCTCGGTCTCCAAGAAGGGGGCACACAGACCACTGAGCAACTGGGACTNTTGCCTCCTTACAGCTNATTNCTGANGGGAGAGCCTTACAGACAGCTAAGGANTTNCATGAACCCAGAGAAAGCAA

>G17337

GGTGACACTATAGAAGGATCTTAGGAGGGGAGAATTGAGGCCCTGTGGAAAACGACCCAAATGCCTCAGGTCCCAGGCTCTATGGCCAGCAGGGGGCAGCATGTACCTGCCATGGCACCTGGGTCCCACATCCTCCACTTAGCTACCTTAAGGAGAAGGCCTCTCTCAAGAGTTCACTTGGTGGCCAGATGGCCTGGTGAGGCTTCCAGGTAGTGTGGGAGTAGTTTGGGAGGGACGTAGCATGGAAACGCTCCAAGCCAGCCTTCTTAACAATGAGTTATTGGTTCTTCAACAGAGTCATGAGTCACTGCATGGGAAGCAACTGCACAGTTACAGAACAGAGCTCCACACAGACACAAGGAGGGGGAAAATGCGTAACTTTAAAAGATGGGGTTGGTGGGAGGGTGGAGAGATAGCTANCAGTTAAGACACTGCTGTCTTCAGAGGTCTGAGT

>I16223 (STS-Marker)

AAGCCCAGCTCTGACTTTTACGACTGCACTTCTGGCAGGAGGAGCGACTCAAGCCTTCGCGAAAGAAAATAACCAAAAAGCATACAAAGAAACGTACGGCGTCTCTCATATTACACGCCATGATATGCTGCAGTACAGGAGACAACTGTGACGCCAGGTCTAAGACCCTTCCTTACCTTGTGTACAAGAGGTGAGAAGAGACCTTAGTAATTAGGATCTTAGATATTTGTGGGCTTCTATTTTGTTTTAGATTCTTTTCTGTGTGTTTTCCCTGCA TGTATGTATGTCTCTGGTTCCTGCCGAGGACAGAGAGAGCAGTAGATCCCCTGAA GTTGGGGTTGTGGACTGTTGCAAGCCACTGTGGGTCCCTGGGAACAGACTTGGNGG TCCTGCAAGGCCTGAGACTTCTCTTAACCCCGAGTCACCCTTTTGTCTGCAGTTT

GATCTTAGTGGAATGACAGGACCTGGTTTATTAGAAGTCTGTCTTATGAGTGAAG
TAGGTGGTGG

>I16223 (PRG1)

GCATCCTCCGCCCGCCAGGGCCTGCGACACACCTTCTTCAGCCATCAAAATCTAGG
CAGAAGATGATGGCNTGCAGGAGAAAGAGGATCCTCTTGGCAATGTTG

>E16374 (PNUTS)

CTTGCATGCCTGCAGGCGGGGCAGCATCGCCTGGAGCAGCTGNGGCACTGCAAA
GGAAAGGCAGTCAAAAATCTCCCAACTCCCCTTCTCTCAAAGGCCAGGCTCC
TTGGAAACCTACACCAGTGCCCATACCTNTGCCGCTTGAGGGGGATGGGCTTNA
GTTGTACTTGTCTGACACAACCACAGNGCTGGAGTTCTTCTTCACAGGCACCAA
NATGGGGTGTCCAGCTCCAGTCCTGAGGANAAACATGTTGAC

>E16374 (H2-T)

GTGGCAGGCCTGGCGGCCGCTGGCCGTCGACATTTAGGTGACACTATAGAAGGAT
CCAACACTTCCTCACTTTGCTCCCTTTCCTTCTTTGAAACACAATTGTACCCCT
GGCCATGTGTGGTAGAAGCATGGGACCTGTACCTTCATTTTCTCTCTAGAAAGG
TTGCAATTAGGACATTGTCCTGAGTCTCAGAAGAGACTATGAATTCTGAACTTTT
AAGGTGTTGGAGACTGACAGATTATGGGGACTTTGGAAGCTGGATTGAATGTTTG
ACATTATGATAGGGCTACAACTGTTGGACCAGGTATGTTAATTTGAATGAAAAT
GGCCCCCATTGGCCTATAGACTTGAAGGCGTGGTCATTAGGGAGGGGTCTATTA
AAGGGATTAGGAGGTGTGTCCTGAGGGGGTGGCTTAGAAGTTCCAAANCAGAGCC
AGTCCAGAGGNTTTTTTCTGCTGCCTAGGACCA

>O10516 (RT.BM1)

CTCCTGAGCGTTTGGATTAAAGGCTTGTGCCCCACCACCACCCATGAAGCAGCAA
ACACTCTTAACCACTGAGCTATCTCTCCAGTCACCATCCACCCAGTCCTTTAAT
GACCTTGTGTGGACTCTAAAGACACTGGATGTCTAGAGATAAACAGACAGCAGA
GTTGACCATGGTGTGCCCTATTCATTTAAAAAATATTTTTTAGATTTATTTATCAT
ATATAGCTGTGTTTCAGACACATCAGAAGAGAGCATCANGATCTCATTACATATGG
TTGTGAGCCACCATGTGGTTGCTGGGATTTGAACCAGGACCTCTGTAAGAGAAGT
CAGTGCTCTTAACACTGAGCCATCTCTCCAGCATTTGNTTTGTTTAAAACAATGAC
CATAAGAGGAATGGTGGACTTCTAGCTTGTCTGGCTCAGNAA

>O10516 (RT.BM1) 102

CCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATTGGCGCGCC
AAAGCTTGCATGCCTGCAGGCAGCAAGGCTTCCAGATCTCTGACTGGCCTCAGA
AGGCATGAAAAGGTATGAAAACCCATGGGGGCCTGGGATCGGACCTGAGGCAAT
AGGGAAGAACAGGGCC

>H12587 (ORF) 107

AGTAGGCTTTTCCCAGGCATGCAGGGATGGTTTAATATATGGAAAACCATCAATG
TGATCCATTATATAAAACAAACTGAAAGAACAAAACCACATGATCATTTCATTAGA
CGCTCNNNAAGCATTTAAGAAATTCAACACCCCTTCATGATAAAGGTCCTGGAAA
GAACAGGNATTCAAGGCCATACTAACACAGCAAATGCC

>H12587 (ORF) 108

GCCCTTGNTTNCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATNACT
ATTGGCGCGCCAAAGCTTGCATGCCTGCANTCTAACTTCTTGAGTTCTTTCTATAT
TTTTGATATAAGCCCTCTATCAGTTGTAGGATTGCTAAAGATCTTTTCCCAATCTG
TTGGTTGTNGTTTTGCCTAACCACAATGTCCTTT

>H12587 (ano) 109

CCTGGCGGCCGCCTGGCCGTCGACATTTAGGTGACACTATAGAAGGATCATTGTG
GCCTCCACTGTCCCTCTGACAAAGCAGACGCCTGCTCCTTCCTTCCTTCCTGGAC
TCTGCCTTGTCTTTAAGAACTTCCTTCTCTATGAAGCAAGGGATGCTTTCCTAACT
CTTGATTTTTTTTTCTGCCCTTAGGATATTTCTCCCTCAGGCTGAGACTTCTTTGG
TCTTTTCCAGTCGTAGACCTTGGGAGACTGCAGCATATCATGGCGTGTAATATG
AGAGACGCCGTACGTTTCTTTGTATGCTTTTTGGTTATTTTCTTTCGCGAAGGCTT
GAGCCGCTCCTCCTGCCAGAAGTGCAGTCGTAAGAGTCAGAACTGTGGCTTGNTT
TACAATTTTTTTGATGTCATGTCATGCTCT

>H12587 Subklon 24

GATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTGACATTCTTAGAATCAGATCTGATGATA
GGAATGAATAGTTAGGGTGCTATAAGTGGGGCCATTGTATGCACACTGCAGGTAC
CCGGGTAGGAGACTCCTTTTTGGGCCCAAGTCACAGTCAGATTTCCACTGTGTGG
GAGTCCCCAGGAGCCCGAGGACATGCCTGCCAGCCATCCTTCCTAGAAATCCTC

TCAACTGAATGTGAAAGAGGGTCCCAGGCCAGAGTCCCCCAGGTCCTTAAAG
GTGGGGAAGAACCTCAGACATGGGTCATGAGGCCTCTCAGTCCCTTACCTAGTGA
AGCAGAGAGGTCCTGGCCCTGGCTCTGGTTGTAGTAACTTAAGCAGGGACCTCAG
GTTCACTCCTAAGGTCTGCTCTTACCTTTTCCACTCTGTGTCTCTTGCTCCAAAAC
CTGGACCCTTGTGCTCACCAGCAGCGCGAAGGCTCATCCTNGACTTCTGATC

>J2298 (Mikrosatellit D20Gun1)

GAATAGTCCNGCTTGTTTAGAGGATAAGCGATGTGAGGAAGTCGTTAGAACAG
GTCAGAGAATCCTTGCAGAGCATCAAGAAAGTATGTCAGAGGGAGAAAAGGTCC
CAAAGAAAGAAAGGAAAAGAAAAGGAGACANAAGGAACAGAGAGAAGGCAGA
GANTAAAAAAGGAGATAATCAGGACCAGGAAATAGATAAGATATATCCCTCCTT
AAAAGCCTTGACTTTAGAAATGTCAGATGAGTCATGAGCTTANTGAGGATGGTGA
GGCTTGACCTTGAAGANGAGGCTGCTCANNTTGAGGGGGAGAGATGTGATCCGG
ACTGTCCACACGCTAACACCACGTGCA

>A18367 LINE 172

TGGCCGCGACATTTAGGTGACACCATAGAAGGATCGCTTTTGGTAAAATGGCCAT
TTTTACTATATTAATCCTGCCATTCCATGAGCATGGGAGATCTTTCCATCTTCTAN
GGTCTTCTTCAATTTCTTTCTTTCAGTGTCTTGAAGTTCTTATTGACAGATCTTTACT
TGCTTGGTTAAAGNCACACCGGGGGACTTTATATTATTTGGG

>A18367 LINE 173

TACGACTGCACTTCTGGCAGGAGGAGCGACTTAAGCCTTCGCGAAAGAAAATAA
CCAAAAGCATACAAAGAAACGTACGGCGTCTCTCAAATTACACGCCATGATAT
GCTGCAGAAAGAAACAGNAAGAGCATATGCCAGCAGCTTGCAGCACACCTAAAA
GCTCTNGGAGNNAAGAAAGCAAATACACCCAGGAGGAGTAGAAGGCAGGAAA
TAATCAAACCTCAGAGCTGAAATCAACCAAGTAGAAACAAAAAGGGACCATAGAA
AGAATCAACAGAACCAAAAAGTTGGTTCTTTCTGAAATTCAACANGATAAACCTT
AGCCAGACTAATGAGAGGGACCCAGAGAGGTGGTGTCCAAATTTAACCAAATC
AGAAATTGAAAA

>A18367 (592j14, 76k14) 170

CCTGTGATCCCAGCTTTGATATTAGGGAAAAAGAGAGGTCTTTGAGGAACTACTT
GTCTCTGAAAATGACAAGGATAAAAATTTACAAACAGCGCAAATCCCCATTAATT

GGAACAAGTGTCTTCAGATCCACAAGACTTATTTTGACCCAGGTTGAAATTATTTT
ATATTATTTTCATTTTCATAAGGGTCTCAAAATGAGTTCCCAACATAGTATGAAAG
AATATATTACACATANGAAAATTTACCTTGGAGAAACAT

>A18367 171

CTCATGAACGTTACCTACCACTTGCATCCCAGGAATGAATACCGGCCCTTCCTA
CTCTTTGAGTAGTGTTTTNTCACCTTGTACCACAGAAGTATAATACCCAATGCTG
ATTTGCAATCTGAGCCAGTTTGTAGCTCTTTGATCATTCTACATGGTAACATTTT
CAATTTAATACAATAGACCTCAAGAAATAAGAGTTAAATTTAGTGGTCAATTCA
GAGCCCAGTTCCACAGTTGGAGACAGGGAGAGTCCAGTTGAGTTAAAATAGAAA
TGTAGTTTTCCAGGTTATGCACCTTAGGCAGTCTGAACACTGGCCACTGTATGAG
GTTCTTTCCCTCCTGAACTCTGGACTCATGCATATGATTCTGTGTCAAGGAAAGGA
TCAGAGGGTTAAGGGGTGGAGAGGCCCAANTTTACTTCAGCACCTTCAAATTACT
ATCCTGGAGCATGGCTGGGGAAAGTTNNTTACCTGATCATGCTNCTGG

>P08462 (20h22)

GGTAGGCCTGGCGGCCGCTGGCCGTCGATTGAGTTGTCGCCGACCTTTTGATAAA
ACATGTAGATTGTTGTGTCATCAGCGTCTTCCGGGCTTCCCGCAAGAGCAAACAC
AACGTGATAGCCGTTGTATTTCAGCTACTGTTCCGTCAGCGTTTTGCAGCGGCCAG
CTGTCCCACACATCAAGTCCTTTTGCAGACCTAATATTTTTAANCGGTTGATTGAT
CCGAATTGAGGCACTTGGTATTTTTTCGTTTTGCTGCTGTTTAGGGATCTGCAGCAT
ATCATGGCGTGTAATATGAGAGACGCCGTACGTTCTTTGTATGCTTTTTGGGTATT
TTCTTTCGCGAAAGGCTTGAGTCGGT

>P0846T (STS-Marker)

ACTTAACTCACACTCAGCATCCCCCTGCCTCCGTTTTCCAACATTAGGATCAAGGA
CTAAGTACCACCAGAGCTGGCCTCGAGTCTTATGACTCCTGCTTCGTTCCCCAGA
GATGGTGACCAGGGTTTTCCCCATTCTCATGTATCATCAAAGGTCAGGACTTTGC
CTCCCTCTTTGAGCCCCCTTTTTTCAGGTTAAATTACTACTTTCTTCTGCATCACCT
ACGGTCTGAGCTCCACGTGTTCCCTGAGTGAAAATGAAATTCTCTCACCCAGAGGG
GAAAAAATG

>H10232 (217)

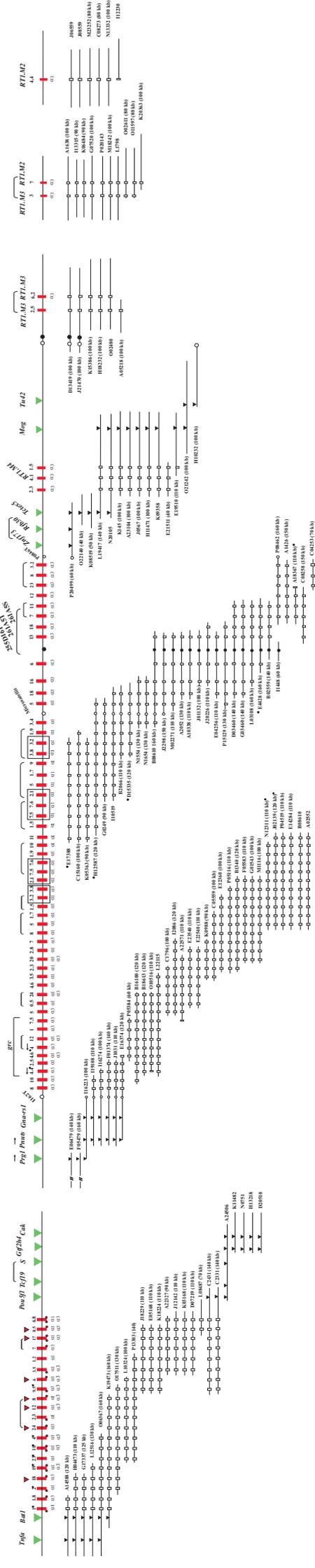
GTCAAGAACCAAATNTCAGTAAGAAGTCAAGAAGCTGGTCTGACAATAACCCAG
GACAATAGGAACATGATGAGAAAGACCTGATTCTATTCTATCTTCTAATGGAGAG
TATATTACAGGATTCTNTCTAAAGTAATTTATTATTGCTGTTATCGTGTGTATGTTT
ATAAAATTACTTATGACATTTTCATTTTGTGGGAAATCANCNCGCAGTTCCACCAT
AAAATTTGCATGCTCAAACCAATATACACAATAGGGATTTAGCCCTTCCAATGGT
CATACTGCA

>I12230 (RT1.M2)

CTTTTAAGATTGAAATATTTGTGGTTATGACATTCTGAATTGTGCCTTTGGGAATA
ACAGGCCATATCCCTTCCAACAAGGAGGCAGAGAAGACTTATCTGGAGATTGG
AGTTCCTCAGTTGGAAAGAAATCTCAGGCTACCCCTTCCACCACCTGAGCTCTTCT
TNCAAATGACAAGTGTAACCACAGAAGCTCCCAGGAGAACCAGGCCAACAGCAA
CCACTATTGTGGGAATGAACGACTGAGGAGGTCTACCTGGAAAGAAATGAAAAT
ATGTAGGACCCTGACCCAGATCTCAAGCCTTGACCCTGCTCAAGGTCTCCAGAA
GGGCTTCTGCTTTCTTAACCCAGAATATGTGCCCACTTCCTACTTACTCCATCTC
AGGGTGAGGGGTCAGGCAGCCCCTCATGTTCTACATAGCATGTATAATTCTGCTC
TTCCCCGAAGGCACCACCACAGCTGCCCACTTCTGGANGGTTCCATCCCTGAGCA
TATCATGGCG

9. Anhang II

Physikalische Karte der RT1/CM-Region des Hauptsternkompatibilitätskomplexes der Räte



Danksagung

Herrn Prof. Dr. Eberhard Günther möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, für seine stetige Diskussionsbereitschaft und die vielfältigen Anregungen danken.

Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Fritz danke ich für seine Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen.

Herrn Dr. Lutz Walter danke ich für zahlreiche fruchtbare Diskussionen und Anregungen.

Frau Diana Otto danke ich für fleissige technische Assistenz insbesondere für das fast unermüdliche Präparieren von Plasmid-DNA.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Immungenetik danke ich für die Kollegialität und die Hilfsbereitschaft.

Meine „Kollegin“ Frau Dr. Heike Olbrich möchte ich für „wahre Freundschaft, die die Schreibfehler des anderen korrigiert“ danken.

Mein Dank gilt ebenfalls dem Ressourcen-Zentrum im Deutschen Human Genom-Projekt in Berlin für die Zurverfügungstellung der Bank-Filter und der Klone.

Der Europäischen Union danke ich für die Finanzierung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Name: Sofia Ioannidu

Staatsangehörigkeit: griechisch

Geburtsdatum: 08.05.1961

Geburtsort: Vergina/Griechenland

Familienstand: verheiratet, zwei Kinder (9 und 12 Jahre)

Schulbesuch: 1967-1973 Grundschule Vergina/Griechenland
1973-1976 Gymnasium Veria/Griechenland
1976-1979 Lyzeum Veria/Griechenland
1979 Abitur Veria/Griechenland
1980-1981 Inlingua Sprachschule Hannover
1982-1983 Niedersächsisches Studienkolleg Hannover
1983 Feststellung der Hochschulreife Hannover

Studium: 1983-1988 Chemiestudium an der Universität Göttingen
1988-1996 Studium der Biologie an der Universität Göttingen
28.04.1995 mündliche Diplomprüfung
1995-1996 Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.-J. Fritz

Tätigkeit: 06.08.1996-31.01.1997 Tätigkeit als wiss. Mitarbeiterin im Institut für Molekulare Genetik
01.02.1997-31.12.1999 Tätigkeit als wiss. Angestellte in der Abteilung Immungenetik am Zentrum für Hygiene und Humangenetik der Universität Göttingen

Promotion: 1997-2000 Anfertigung der Dissertation zum Thema „Physikalische Kartierung der RT1-C/M-Region des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Ratte“