

Lehrstuhl für Tierzucht
der Technischen Universität München

**Erstellung und Charakterisierung einer bovinen BAC-Bank und
deren Anwendung zur physischen Kartierung
von Chromosom 20 des Rindes**

Sonja Kollers

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat., Dr. rer. nat. habil. Gerhard Wenzel

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. sc. techn. ETH, Dr. agr. habil. Hans-Rudolf Fries
2. Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Meitinger

Die Dissertation wurde am 30.04.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09.09.2002 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Genomanalyse bei Nutztieren.....	1
1.2.	Methoden der Genomkartierung.....	1
1.2.1.	Kopplungsanalyse	1
1.2.2.	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	2
1.2.3.	Kartierung mittels Analyse von <i>Radiation Hybrid Panels</i>	4
1.2.4.	Marker für die Erstellung von Genomkarten	4
1.2.4.1.	Mikrosatelliten.....	5
1.2.4.2.	Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs).....	5
1.3.	<i>Quantitative Trait Locus (QTL)</i> –Kartierung.....	6
1.3.1.	Einfluss der Markerdichte auf die Schätzung der QTL-Position mittels Kopplungsanalyse	7
1.3.2.	Feinkartierung von QTL.....	7
1.4.	Genomkarten des Rindes	9
1.4.1.	Genetische Karte	9
1.4.2.	<i>Radiation Hybrid</i> Karte	10
1.4.3.	Zytogenetische Karte.....	11
1.5.	Chromosom 20 des Rindes (BTA20)	12
1.5.1.	Die QTL-Region auf BTA20	12
1.5.2.	Homologie zwischen Chromosom 20 des Rindes (BTA20) und Chromosom 5 des Menschen (HSA5).....	13
1.6.	Physische Charakterisierung einer Genomregion	14
1.6.1.	<i>Large Insert Libraries</i>	15
1.6.2.	Klonierungsvektoren für die Erstellung von <i>Large Insert Libraries</i>	15
1.6.2.1.	Cosmid-Vektoren	15
1.6.2.2.	Yeast Artificial Chromosome (YAC)-Vektoren.....	15
1.6.2.3.	P1-derived Artificial Chromosome (PAC)-Vektoren.....	16
1.6.3.	<i>Bacterial Artificial Chromosome (BAC)</i> -Banken.....	16
1.7.	Ziele der Arbeit.....	19
2.	Material und Methoden	21
2.1.	Herstellung von bovinen BAC-Klonen	21
2.1.1.	Erzeugung von DNA-Fragmenten für die Klonierung.....	21
2.1.1.1.	Isolierung von Leukozyten und Einbettung in Agarosegel	21
2.1.1.2.	Partialverdau der Leukozyten-DNA.....	22
2.1.1.3.	Auftrennung langer DNA-Fragmente mittels Puls-Feld- Gelelektrophorese (PFGE)	23
2.1.1.4.	Extraktion der DNA-Fragmente aus dem Gel durch Elektroelution	25

2.1.2.	Klonierung der DNA-Fragmente in <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) DH10B.....	26
2.1.2.1.	Vorbereitung des Vektors auf die Ligation	26
2.1.2.2.	Ligation von Vektor- und <i>Insert</i> -DNA	28
2.1.2.3.	Transformation von <i>E. coli</i> DH10B durch Elektroporation	28
2.2.	Erstellung der BAC-Bank.....	29
2.3.	Präparation von BAC-DNA	29
2.3.1.	Mini-Präparation	30
2.3.2.	Midi-Präparation	31
2.3.3.	Maxi-Präparation.....	32
2.3.4.	Konzentrationsmessung von BAC-DNA	33
2.4.	Charakterisierung der erstellten BAC-Bank.....	33
2.4.1.	Ermittlung der durchschnittlichen Insertgröße.....	33
2.4.2.	Bestimmung des Anteils chimärischer Klone	34
2.4.3.	Untersuchung der BAC-Bank auf die Genomabdeckung	34
2.5.	Isolierung von BAC-Klonen für die Kartierung von BTA20	34
2.5.1.	Erstellung von locusspezifischen DNA-Sonden	34
2.5.1.1.	Entwicklung von PCR-Primersystemen	34
2.5.1.2.	Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA	35
2.5.1.3.	Sequenzierung der amplifizierten DNA-Fragmente.....	36
2.5.2.	Screenen von <i>high density</i> Filtern	37
2.5.2.1.	Markierung der DNA-Sonde	37
2.5.2.2.	Überprüfung von Sondenmarkierung und Hybridisierung.....	38
2.5.2.3.	Hybridisierung und Waschen der Filter.....	39
2.5.2.4.	Signaldetektion mittels Autoradiographie	39
2.5.2.5.	Auswertung der Signale	40
2.5.3.	Screenen von BAC-DNA- <i>Pools</i>	41
2.6.	Überprüfung und Charakterisierung der isolierten BAC-Klone	43
2.6.1.	Ermittlung der Insertgröße	43
2.6.2.	Überprüfung der Spezifität der isolierten Klone	43
2.6.3.	Überprüfung der BAC-Klone auf Identität	44
2.7.	Physische Kartierung von BAC-Klonen mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	45
2.7.1.	Gewinnung von Metaphasechromosomen aus Kulturen boviner Fibroblasten	45
2.7.2.	Präparation von Metaphasechromosomen	45
2.7.3.	Markierung der BAC-DNA mittels <i>Nick</i> -Translation.....	46
2.7.4.	Ansatz der Hybridisierungslösung	46
2.7.5.	Hybridisierung und Signaldetektion.....	47
2.7.6.	Mikroskopie und digitale Bildverarbeitung	48
2.7.7.	Auswertung	49
2.7.7.1.	Chromosomenidentifikation	49
2.7.7.2.	Bestimmung der Signalposition	50
2.7.7.3.	Auswertung der Anordnung der BAC-Klone.....	50

2.8.	„Radiation Hybrid Panel“-Kartierung von BTA20.....	50
2.9.	Untersuchung von vier Kandidatengenegen auf <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNPs).....	51
2.9.1.	Sequenzierung eines Testpanels.....	51
2.9.2.	Identifikation der SNPs.....	52
3.	Ergebnisse.....	53
3.1	Erstellung der BAC-Bank.....	53
3.2.	Charakterisierung der erstellten bovinen BAC-Bank.....	53
3.2.1.	Die durchschnittliche Insertgröße.....	53
3.2.2.	Physische Kartierung 35 zufällig ausgewählter BAC-Klone zur Ermittlung des Anteils chimärischer Klone.....	55
3.2.3.	Die Genomabdeckung der erstellten BAC-Bank.....	58
3.3.	Auswahl der Loci für die Kartierung von BTA20.....	58
3.4.	Isolierung locuspezifischer BAC-Klone.....	60
3.4.1.	Entwicklung von PCR-Systemen.....	60
3.4.2.	Screenen der BAC-Banken.....	62
3.4.2.1.	Durch Screenen von <i>high density</i> Filtern identifizierte Klone.....	62
3.4.2.2.	Durch Screenen von <i>DNA-Pools</i> identifizierte Klone.....	63
3.5.	Überprüfung und Charakterisierung der isolierten Klone.....	66
3.5.1.	Insertlänge der isolierten Klone.....	66
3.5.2.	Die Spezifität der BAC-Klone.....	67
3.5.3.	Überprüfung der Identität mehrerer, für einen Locus identifizierte Klone.....	67
3.6.	Physische Kartierung von BTA20.....	68
3.6.1.	Kartierung mittels Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH).....	68
3.6.1.1.	Chromosomale Position der BAC-Klone.....	68
3.6.1.2.	Anordnung der BAC-Klone auf BTA20.....	71
3.6.2.	Kartierung von BTA20 mittels Analyse eines <i>Radiation Hybrid Panels</i>	76
3.7.	Anordnung der ausgewählten Loci auf BTA20 und HSA5.....	77
3.8.	Identifizierung von <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (SNPs).....	79
4.	Diskussion.....	82
4.1.	Erstellung der BAC-Bank.....	82
4.1.1.	Durchschnittliche Insertgrößen.....	83
4.1.1.1.	Partialverdau.....	83
4.1.1.2.	Größenfraktionierung der erzeugten DNA-Fragmente.....	84
4.1.1.3.	Elektroporation.....	85
4.1.2.	Chimärismusgrad.....	85
4.1.3.	Genomabdeckung.....	86

4.2.	Charakterisierung der QTL-Region auf BTA20	87
4.2.1.	Physische Begrenzung der QTL-Region.....	87
4.2.2.	Kartierung der Loci <i>BMS521</i> , <i>BMS703</i> , <i>GHR</i> und <i>PRLR</i>	87
4.2.3.	Kartierung weiterer positioneller Kandidatengene	88
4.2.4.	Anordnung der BAC-Klone mit Zwei-Farben-FISH	88
4.2.5.	Kartierung von Loci mittels Analyse des <i>Radiation Hybrid Panels</i> BOVRH5	89
4.2.6.	Integration der Genomkarten des Rindes	91
4.2.7.	Die Anordnung der Loci auf BTA20 und HSA5	91
4.2.8.	Kandidatengenanalyse.....	92
4.3.	Schlussfolgerungen.....	95
5.	Literaturverzeichnis	96
6.	Anhang.....	111

Abbildungen

Abb. 1:	Genomkarten von BTA20	11
Abb. 2:	Die QTL-Region auf BTA20.....	13
Abb. 3:	Der BAC-Vektor pBACe3.6.....	18
Abb. 4:	Arbeitsschritte bei der Herstellung von BAC-Klonen.....	21
Abb. 5:	Größenfraktionierung der DNA-Fragmente mittels Puls-Feld Gelelektrophorese	24
Abb. 6:	Strategie für die Erstellung von PCR-Primersystemen.	35
Abb. 7:	Aufbau eines <i>high density</i> Filters.	38
Abb. 8:	Versuchsanordnung für die Autoradiographie	40
Abb. 9:	Strategie des DNA-Poolens für die <i>Primary Pools</i>	42
Abb. 10:	Strategie des DNA-Poolens für die <i>Secondary Pools</i>	43
Abb. 11:	Durchschnittliche Insertgrößen von 253 BAC-Klonen.....	54
Abb. 12:	Chromosomale Position von 32 zufällig ausgewählten BAC-Klonen.....	56
Abb. 13:	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung des BACs mit zentromerischen <i>Repeats</i> und eines chimärischen BACs.....	56A
Abb. 14:	FISH-Kartierung zufällig ausgewählter BACs.	56B
Abb. 15:	Chromosom 5 des Menschen (HSA5).....	60
Abb. 16:	Puls-Feld-Gelelektrophorese von 18 BACs	67
Abb. 17:	Um 9 Loci erweiterte zytogenetische Karte von BTA20.....	70
Abb. 18:	Q-Bänderung der verwendeten Zelllinie mit einer Zentromerfusion einer Kopie von BTA14 mit einer Kopie von BTA20.	70A
Abb. 19:	Chromosomale Position eines BACs mit Kolonie-PCR-Produkt und eines BACs ohne Kolonie-PCR-Produkt	70B
Abb. 20:	Position von vier BACs auf BTA20.....	70C
Abb. 21:	Zwei-Farben-FISH der Loci <i>BMS521</i> und <i>BMS703</i> , sowie der Loci <i>GHR</i> und <i>PRLR</i>	72A
Abb. 22:	Zwei-Farben-FISH der Loci <i>BMS521</i> und <i>BMS703</i> und <i>GHR</i> , sowie <i>BMS521</i> und <i>BMS703</i> und <i>PRLR</i>	72B
Abb. 23:	Darstellung der drei wahrscheinlichsten Anordnungen von 11 Loci auf BTA20.	75
Abb. 24:	<i>Radiation Hybrid</i> Karte von BTA20 nach dem Einfügen von 7 Loci.	77
Abb. 25:	Anordnung der kartierten Loci auf BTA20 und HSA5.....	78

Tabellen

Tab. 1:	Eigenschaften veröffentlichter boviner BAC-Banken.....	19
Tab. 2:	Antikörpermischungen für die Signaldetektion.....	48
Tab. 3:	Filtersätze für die Fluoreszenzmikroskopie.....	49
Tab. 4:	Zusammensetzung des Testpanels zum Auffinden von SNPs.....	52
Tab. 5:	Ergebnisse der Erstellung der BAC-Bank.....	53
Tab. 6:	Charakteristika von Teil 1 und 2 der erstellten BAC-Bank.....	54
Tab. 7:	Chromosomale Position von 35 zufällig ausgewählten BAC-Klonen	57
Tab. 8:	Ausgewählte Loci für die physische Kartierung von BTA20	59
Tab. 9:	PCR-Primersysteme für die Kartierung von BTA20.....	61
Tab. 10:	Effizienz der Strategie zur Entwicklung von Primersystemen.....	62
Tab. 11:	Anzahl von BAC-Klonen, die durch das Screenen der <i>high density</i> Filter der beiden BAC-Banken identifiziert wurden.....	63
Tab. 12:	Anzahl von BAC-Klonen, die durch das Screenen der DNA-Pools der beiden BAC-Banken identifiziert wurden.....	64
Tab. 13:	Effizienz des Screenens von <i>high density</i> Filtern und DNA-Pools	64
Tab. 14:	Anzahl von Signalen und ermittelten BAC-Klonen aus dem Screenen der DNA-Pools	65
Tab. 15:	Insertlänge der für die physische Kartierung von BTA20 verwendeten BAC-Klone	66
Tab. 16:	Charakterisierung der BAC-Klone, die unter Anwendung von <i>a priori</i> Wissen isoliert wurden.....	69
Tab. 17:	Zwei-Farben-FISH-Experimente zur Anordnung der Loci auf BTA20.....	73
Tab. 18:	Die 15 wahrscheinlichsten Anordnungen von 11 Loci auf BTA20	74
Tab. 19:	Die 15 wahrscheinlichsten Reihenfolgen der Loci auf BTA20, ermittelt unter „Zusammenfassen“ der drei Loci <i>IL7R</i> , <i>LIFR</i> und <i>SLC1A3</i>	75
Tab. 20:	Ergebnisse des Screenens des <i>Radiation Hybrid Panels</i> BOVRH5	76
Tab. 21:	FLcen-Werte der Loci auf BTA20	79
Tab. 22:	SNPs in Exonen von vier Kandidatengenen	80
Tab.23A:	Lösungen und Puffer.....	111
Tab.24A:	Enzyme.....	112
Tab.25A:	<i>Kits</i>	112
Tab.26A:	Antikörper.....	112
Tab.27A:	Reaktionsgefäße.....	112
Tab.28A:	Details zur Entwicklung der PCR-Primersysteme.....	113
Tab.29A:	Spezifität der BAC-Klone, die unter der Verwendung von <i>a priori</i> Wissen isoliert wurden.....	114

Zusammenfassung

Die Genomanalyse von Nutztieren hat einen festen Platz in der Tierzuchtforschung eingenommen. Genome landwirtschaftlicher Nutztiere werden untersucht, um genetische Variation auf molekularer Ebene aufzuklären. Merkmale, die in der Tierzucht von Interesse sind, sind häufig quantitativer Natur. Die quantitative Genetik untersucht die Vererbung solcher Merkmale, wobei die kontinuierliche Variation unter anderem durch die Aufspaltung von Allelen an verschiedenen Loci erklärt wird. Solche Loci werden als *Quantitative Trait Loci* (QTL) bezeichnet. Ein Ziel ist es, den das Merkmal hauptsächlich beeinflussenden Locus zu identifizieren, und seine Variationen auf physiologischer Ebene zu erklären. Hierzu ist es erforderlich, die Genomregionen, die wahrscheinlich das betreffende Gen enthalten, physisch zu charakterisieren. Zu diesem Zweck werden Genbibliotheken eingesetzt. In den letzten Jahren haben sich die im Rahmen des Humanen Genomprojektes entwickelten *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) - Banken als am besten geeignet für viele Fragestellungen herausgestellt.

In der vorliegenden Arbeit wird die Erstellung einer BAC-Bank als Ressource für die Erforschung des Rindergenoms beschrieben. Die angestrebte Insertlänge von über 100 Kilobasensequenzen (kb) erforderte eine Optimierung der einzelnen Arbeitsschritte, um eine Schädigung der zu klonierenden DNA zu vermeiden und eine ausreichende Ligationseffizienz zu gewährleisten. Die zu klonierende DNA wurde aus dem Blut eines männlichen Tieres gewonnen. An die Einbettung der isolierten Leukozyten in Agarosegel schloss sich ein Partialverdau der in ihnen enthaltenen DNA an. Mit diesem Restriktionsverdau wurden große DNA-Fragmente mit den passenden Enden für die Klonierung erzeugt. Eine Größenfraktionierung der erzeugten DNA-Fragmente wurde mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) vorgenommen. Die Optimierung dieses Arbeitsschrittes stellte sich als ein entscheidender Faktor für das Erreichen der angestrebten Insertlänge heraus. Für die Ligation wurde der Vektor pBACe3.6 verwendet. Mittels Elektroporation wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) DH10B transformiert. Die auf diese Weise erzeugten BAC-Klone wurden vom Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) in Berlin zu einer BAC-Bank angeordnet, die unter dem Namen „Bovine BAC II“ und der Nr. 754 in Form von *high density* Filtern und DNA-Pools der Öffentlichkeit zur Verfügung gestellt wird. Bis Januar 2002 wurden 6 Kopien der BAC-Bank in Form von *high density* Filtern und 378 Kopien in Form von *Primary Pools*, sowie 1860 *Secondary Pools* angefordert.

Für die Charakterisierung der BAC-Bank wurden die Parameter Chimärismusgrad, durchschnittliche Insertlänge und die Genomabdeckung untersucht. Der Chimärismusgrad liegt mit 4,5 % auf dem für BAC-Banken erwarteten niedrigen Niveau. Die durchschnittliche Insertlänge der 82944 BAC-Klone beträgt 112 kb. Damit beträgt die Wahrscheinlichkeit, eine bestimmte Sequenz in der Klonpopulation aufzufinden, 95 %. Theoretisch deckt die erstellte BAC-Bank das Rindergenom dreifach ab. Basierend auf der Durchmusterung der BAC-Bank mit Sonden für Loci auf Chromosom 20 des Rindes (BTA20) wurde mit $2 \pm 0,5$ Signalen pro Probe ein etwas geringerer Wert für die Genomabdeckung ermittelt.

Die erstellte BAC-Bank wurde für die physische Kartierung von BTA20 in einer zuvor kartierten QTL-Region angewendet. Die Loci für die physische Kartierung wurden aus Genomkarten von BTA20 und des humanen Chromosoms 5 (HSA5), das homolog zu BTA20 ist, ausgewählt. Für die Isolierung von BAC-Klonen, die diese Loci enthalten, wurden Primersysteme für die Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) für 14 Loci, basierend auf bovinen und humanen Sequenzen aus öffentlichen Datenbanken, entwickelt. Die Primersysteme wurden durch Sequenzierung der von ihnen amplifizierten DNA-Fragmente auf ihre Spezifität überprüft. Die *high density* Filter und DNA-Pools wurden mit 9 bzw. 12 Sonden durchmustert. Es wurden 24 BAC-Klone für 11 Loci isoliert. Die BAC-Klone wurden mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) auf Metaphasechromosomen einer Zelllinie mit einer Zentromerfusion einer Kopie von BTA14 mit einer Kopie von BTA20, kartiert. Eine Anordnung der Klone zueinander erfolgte unter Verwendung von Zwei-Farben-FISH. Es wurden insgesamt 13 Loci (10 positionelle Kandidatengene und 3 Mikrosatelliten) physisch kartiert. Die zytogenetische Karte von BTA20 wurde um 9 Loci erweitert. Vier Loci wurden erstmalig beim Rind kartiert. Die Integration der Genomkarten (zytogenetische Karte, Kopplungskarte und *Radiation Hybrid* Karte) wurde im QTL-Bereich durch die physische Kartierung mittels FISH und die Kartierung von 7 Loci mit einem bovinen *Radiation Hybrid Panel*, weiterentwickelt. Durch die physische Kartierung der Loci *BMS2461* (boviner Mikrosatellit) und *MAP1B* (*microtubule-associated protein 1B*) wurde die QTL-Region zum Zentromer begrenzt. Alle kartierten Gene konnten durch die Anordnung der BAC-Klone auf BTA20 als positionelle Kandidatengene identifiziert werden. In Exonen der Loci Follistatin (*FST*), Wachstumshormonrezeptor (*GHR*), Interleukin 7 Rezeptor (*IL7R*) und Prolaktinrezeptor (*PRLR*) wurden Marker in Form von *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) identifiziert. Einige dieser Basenaustausche haben Aminosäureaustausche zur Folge.

Mit der Anwendung der erstellten BAC-Bank, durch die Isolierung von BAC-Klonen und deren Kartierung und Anordnung mittels FISH, konnte ein Beitrag zur Erweiterung der zytogenetischen Karte von BTA20 und zur Integration der Genomkarten in der QTL-Region geleistet werden.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	MTP	Mikrotiterplatte
BAC	Bacterial Artificial Chromosome	n. b.	nicht bestellt
		n. g.	nicht gescreent
BBi	Babraham Institute	n. H.	nicht hybridisiert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	NIH	National Institutes of Health
		no	number
BTA	Bos taurus	Nr.	Nummer
bzw.	beziehungsweise	OMIA	Online Mendelian Inheritance in Animals
ca.	circa		
CATS	Comparative Anchored Tagged Sequences	OMIM	Online Mendelian Inheritance in Men
CCD	Charge Coupled Device	PAC	P1 Artificial Chromosome
CISS	Chromosomal <i>in situ</i> Suppression	PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
d. h.	das heißt	PFGE	Puls-Feld-Gelelektrophorese
DMEM	Dulbeccos Minimum Essential Medium	QTL	Quantitative Trait Locus/Loci
DNA	Deoxyribonucleic Acid	RBC	Red Blood Cells
E. coli	Escherichia coli	RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
etc.	etcetera	RPCI	Roswell Park Cancer Institute
EtOH	Ethanol	RZPD	Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH
FITC	fluoresceinisothiocyanat		
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	S.	Seite
		s.	siehe
FLcen	Fractional Length Centromer	SNP	Single Nucleotide Polymorphism
FLter	Fractional Length Telomer	STRP	Short Tandem Repeat Polymorphism
GCG	Genetics Computer Group	Tab.	Tabelle
HSA	Homo sapiens	TIFF	Tag(ged) Image File Format
ID	Identifikation	TUM	Technische Universität München
ISCNDA	International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals	u. a.	unter anderem
		UK	United Kingdom
LOD	Logarithm of the Odds	USA	United States of Amerika
mind.	mindestens	UTR	untranslatierte Region
MIT	Massachusetts Institute of Technology	VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
		YAC	Yeast Artificial Chromosome
		z. B.	zum Beispiel

Einheiten

(hier nicht aufgeführte Einheiten wurden nach dem SI-Einheiten-System gebraucht)

bp	Basenpaare	M	molar
cfu	colony-forming-unit (Kolonie-bildende Einheit)	Mb	Megabasenpaar(e)
cM	centiMorgan	mM	millimolar
cR	centiRay	μF	mikro-farraday
kb	Kilobasenpaar(e)	rpm	Rounds per Minute

Loci

(Genbezeichnungen, wie sie in OMIM [Online Mendelian Inheritance in Man, URL 1¹] oder in OMIA [Online Mendelian Inheritance in Animals, URL 2] verwendet werden)

ALK-6	bone morphogenetic protein IB receptor	mh mhs	muscular hypertrophy malignant hyperthermia syndrome
ANPRC (= NPR3)	natriuretic peptide receptor C	MTRR	5-methyltetrahydrofolatehomocysteine methyltransferase reductase
BMS521	boviner Mikrosatellit		
BMS703	boviner Mikrosatellit		
BMS1120	boviner Mikrosatellit	MYO10	myosin x
BMS2461	boviner Mikrosatellit	OXCT	3-oxoacid Coenzyme A transferase
C6	complement component 6		
C7	complement component 7		
CLPG	callipyge	PRLR	prolactin receptor
FecB	Booroola fecundity gene	PTGER2	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kD
FST	follicle-stimulating hormone receptor	RN	rendement napole
GHR	growth hormone receptor	RYR	ryanodine receptor
HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A synthase(soluble)	SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
HTR1A	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A	SLC1A3	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3
IL7R	interleukin 7 receptor		
LIFR	leukemia inhibitory factor receptor	SMN	survival of motor neuron
MAP1B	microtubule-associated protein 1 B	TGF- β	transforming growth factor- β
		TK	thymidine kinase
		TRIO	triple functional domain (PTPRF interacting)

Mikrosatelliten-Bezeichnungen

AF	AFRC, Babraham, UK	HEL	University of Helsinki, Finland
AGLA	Genmark Inc., USA	ILSTS	ILRAD, Kenya
BM	MARC, USDA, USA	RM	University of Georgia, USA
BMS	MARC, USDA, USA	TGLA	Genmark Inc., USA
ETH	ETH, Zürich, Schweiz	UWCA	University of Wisconsin, USA

¹ URLS finden sich im Literaturverzeichnis (S. 110)

1 Einleitung

1.1 Genomanalyse bei Nutztieren

Die Genomanalyse landwirtschaftlicher Nutztiere hat inzwischen in der Tierzuchtforschung einen festen Platz eingenommen. Mit ihrer Hilfe sollen die molekularen Grundlagen der genetischen Variation von Merkmalen, die in der Tierzucht von Interesse sind, aufgeklärt werden. Viele dieser Merkmale sind quantitativ, d. h. ihre Ausprägung variiert kontinuierlich. Als eine Ursache der kontinuierlichen Variation wird die Segregation von Allelen an vielen Loci angenommen (Falconer und Mackay 1996). Die Effekte dieser Gene sind im Verhältnis zur Gesamtvariation gering. Daher werden die klassischen Mendelschen Verhältnisse von Genotypklassen und Phänotypen nicht beobachtet und die Untersuchung individueller Loci, die an der Ausprägung eines quantitativen Merkmals beteiligt sind, ist nicht über die Methoden der klassischen Mendelschen Genetik möglich (Falconer und Mackay 1996). Die quantitative Genetik befasst sich daher mit der Erweiterung der Vererbungslehre nach Gregor Mendel auf ganze Populationen und auf die simultane Segregation von Allelen an verschiedenen Loci. Durch die Analyse von Populationen werden nicht die einzelnen Loci, sondern die Gesamteffekte aller Gene, die die Variation verursachen, berücksichtigt. Die vollständige Beschreibung eines Merkmals muss aber die Eigenschaften der Einzelgene beinhalten (Falconer und Mackay 1996). Fassbar werden solche Gene, die konzeptionell als *Quantitative Trait Loci* (QTL) bezeichnet werden (Geldermann 1975), über die chromosomale Kartierung.

1.2 Methoden der Genomkartierung

Genomkarten beschreiben die Anordnung von Markern und Genen und die Distanz zwischen ihnen auf dem Chromosom (URL 3). Dichte Karten polymorpher Marker sind eine wichtige Voraussetzung für die Kartierung von QTL (Terwilliger 1995).

1.2.1 Kopplungsanalyse

Die Kopplungsanalyse basiert auf der Ko-Vererbung von DNA-Varianten. Diese Ko-Vererbung wird durch die Beobachtung von Rekombinationen, die in dem verwendeten Stammbaum zwischen den DNA-Varianten stattfinden, verfolgt (Elston 1998).

Zwei Loci werden als gekoppelt bezeichnet, wenn sie auf demselben Chromosom lokalisiert sind und ihre Rekombinationsrate geringer als 50 % ist. Die Rekombinationsrate ist das Maß der genetischen Rekombination und bezeichnet das Verhältnis von rekombinierten Gameten zur Gesamtzahl von Gameten. In ihrer einfachsten Form besteht die Kopplungsanalyse darin, rekombinante und parentale Gameten zu zählen, die Rekombinationsrate zu schätzen und zu testen, ob diese signifikant geringer als 50 % ist (Elston 1998). Der Test auf Kopplung ist dabei equivalent zu einem Test der Nullhypothese, die Rekombinationsrate beträgt 50 %, ge-

gen die Alternativhypothese, die Rekombinationsrate ist kleiner als 50%. Morton (1955) schlug vor, diesen Test über den *LOD score* Test vorzunehmen. Der *LOD score* bezeichnet den Logarithmus zur Basis 10 des Verhältnisses der Wahrscheinlichkeiten einer Rekombinationsrate gleich 50 % und geringer als 50 %. Der *LOD score* Test ist zweiseitig, wobei ein Wert von -2 zur Annahme der Nullhypothese und ein Wert von $+3$ zur Annahme der Alternativhypothese führt.

Die Rekombinationsrate entlang eines Chromosoms ist nicht additiv. Zwischen benachbarten Loci sind die Rekombinationsraten größer oder gleich denen zwischen weiter entfernten Loci, da doppelte Rekombinationen große Intervalle kürzer erscheinen lassen. Bei kleineren Intervallen kann es zu Interferenz kommen. Um dies zu korrigieren wurden Kartierungsfunktionen entwickelt, die es erlauben, die Distanz zweier Loci als Funktion der Rekombinationsrate zu berechnen. Die beiden meistverwendeten Kartierungsfunktionen sind diejenigen von Haldane (1919) und Kosambi (1944), wobei die Kartierungsfunktion von Haldane (1919) auf der Annahme basiert, dass keine Interferenz vorkommt, während die von Kosambi (1944) Interferenz berücksichtigt. Die Abstände zwischen den Loci werden mit der Einheit centiMorgan (cM) angegeben, wobei die Einheit 1 cM bei eng gekoppelten Loci dem Auftreten von einem Rekombinationsereignis zwischen diesen Loci bei der Betrachtung von 100 Meiosen entspricht. Die physische Distanz in Kilobasenpaaren (kb) zwischen den Loci kann nur approximativ von der genetischen Distanz abgeleitet werden. Wird eine konstante Verteilung der Rekombinationsereignisse angenommen, entspricht 1 cM etwa 1 Megabasenpaar (Mb, Kappes et al. 1997).

Die Kartierung eines Locus mittels Kopplungsanalyse beruht auf der Verfolgung der Segregation des von ihm verursachten Phänotypen innerhalb eines Stammbaums (Terwilliger 1995). Wird ein diskreter Polymorphismus betrachtet, können die rekombinanten Gameten unzweifelhaft erkannt und jeder Locus identifiziert werden. Wird allerdings ein quantitatives Merkmal betrachtet, ist der phänotypische Wert die Summe aller Effekte der verschiedenen Gene, die das Merkmal beeinflussen, wovon einige gekoppelt sein können und andere unabhängig segregieren, sowie zusätzlicher nicht-linearer genetischer Effekte und Umwelteffekte (Barendse und Fries 1999). Da der phänotypische Wert keinem bestimmten Gen zugewiesen werden kann, können die rekombinanten Gameten nicht gezählt werden (Barendse und Fries 1999).

Die Auflösung von genetischen Karten ist begrenzt durch die Anzahl der Rekombinationsereignisse im typisierten Stammbaum. Regionen, die durch Kopplung entdeckt werden, sind sehr groß, da Kopplung fokussiert ist auf kürzliche, in der Regel zu beobachtende Abstammung, in der sich noch nicht sehr viele Rekombinationen ereignet haben (Liu 1998).

1.2.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

FISH ist die direkteste Methode, die chromosomale Position einer Probe darzustellen (Pinkel et al. 1986). Ideale DNA-Sonden, die eine hohe Hybridisierungseffizienz ermöglichen, sind größere klonierte Abschnitte genomischer DNA wie z. B. Cosmide und *Bacterial Artificial*

Chromosomes (BACs). Unspezifische Signale, hervorgerufen durch repetitive Sequenzen der Sonden-DNA, die auch außerhalb des Ziel-Locus auftreten, können durch Ko-Hybridisierung mit nichtmarkierter genomischer DNA supprimiert werden (nach dem Prinzip der *chromosomal in situ suppression* (CISS, Lichter et al. 1990). Die Darstellung der hybridisierten Sonde mit Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die Lokalisation von Genorten auf Metaphasechromosomen mit einer Auflösung von 1-3 Mb (Lichter et al. 1990). Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren Licht eines definierten Wellenspektrums und senden einen Teil der Energie als längerwelliges Licht wieder aus. Jeder Fluoreszenzfarbstoff ist durch ein spezifisches Anregungs- und Emissionsspektrum gekennzeichnet. Durch gleichzeitige Hybridisierung unterschiedlich markierter Sonden können mehrere Loci gleichzeitig dargestellt werden. Eine allgemein gebrauchte Methode, die physische Lokalisation auf dem Chromosom anzugeben, sind Messungen, die die Position der Probe als einen Teil der Distanz vom Telomer des kurzen Arms (*fractional length* = 0) bis zum Telomer des langen Arms (*fractional length* = 1) angeben (Lichter et al. 1990). In dieser Arbeit wurde die Distanz der Position der Probe zum jeweils weiter entfernten Ende des Chromosoms gemessen und somit entweder als *fractional length centromer* (FLcen) – bis auf BTax und BTay sind die bovinen Chromosomen akrozentrisch- oder *fractional length telomer* (FLter) ermittelt. Angegeben werden alle Werte in dieser Arbeit als FLcen.

Von entscheidender Bedeutung für die Erstellung von Genomkarten basierend auf FISH war die Standardisierung des bovinen Karyotypen, die eine Identifikation und einheitliche Bezeichnung der Chromosomen ermöglichte. Die Anwendung von Methoden zur Chromosomenbänderung in den 70er Jahren schuf verschiedene Systeme zytogenetischer Nomenklatur. Im Rahmen einer Konferenz in Reading, UK, 1976 (Ford et al. 1980), wurde das G-Bandmuster der Rinderchromosomen erstmals detailliert beschrieben, um eine Identifikation einzelner Chromosomen zu ermöglichen. Diese Konferenz bildete die Basis der folgenden Beschreibungen von Chromosomenanomalien und -varianten domestizierter Tiere. Im Rahmen weiterer Konferenzen (Second Conference for Standardization of Domestic Animal Karyotypes, Jouy-en-Josas, Frankreich, 1989; 9th North American Colloquium on Domestic Animal Cytogenetics and Gene Mapping, Texas, USA, 1995; 14. Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals, Brno, Tschechische Republik, 2000) wurde der Standardkaryotyp des Rindes schematisch dargestellt, Nomenklatorsysteme für Chromosomenbänderungen etabliert, Genkartierungen, sowie die humanen homologen Chromosomen präsentiert und die exakte Korrespondenz der G-/Q- und R-Bandenmuster der bovinen Chromosomen etabliert, sowie eine generelle Übereinstimmung zwischen Karyotyp und Idiogrammen erreicht (Di Berardino et al. 1990, Cribiu et al. 2001, Popescu et al. 1996).

Von Bedeutung für die Untersuchung von QTL-Regionen, vor allem im Hinblick auf die positionelle Klonierung (1.6), ist die Integration der Informationen aus verschiedenen Kartierungsexperimenten (Womack und Kata 1995). Dazu ist die physische Integration von Markerkarten und Genkarten nötig. Diese Genomkarten sind nicht direkt vergleichbar, da der Abstand der Loci auf den verschiedenen Karten in unterschiedlichen Einheiten angegeben ist, basierend auf den Methoden, die der Kartierung der Loci zugrundeliegen. Ein direkter Vergleich ist daher nur über die Kartierung derselben Loci (vor allem TypI-Loci, 1.2.4, O'Brien

1991) auf allen Arten von Karten möglich. Die Integration der Informationen der dichten Kopplungskarten in die physischen Karten geschieht über die Kartierung der entsprechenden Loci durch FISH oder die Kartierung mittels Analyse von *Radiation Hybrid Panels* (Womack und Kata 1995).

1.2.3 Kartierung mittels Analyse von *Radiation Hybrid Panels*

Das grundlegende Prinzip der Genkartierung mittels *Radiation Hybrid Panels* ist die Zuordnung der zu untersuchenden Sequenz zu einem Fragment des Genoms. Eine Fragmentierung wird durch radioaktive Bestrahlung erreicht. Die auf diese Weise erhaltenen Bruchstücke werden mit Zellen einer anderen Spezies, meist werden Nagerzellen verwendet, fusioniert. Die Nagerzellen behalten Bruchstücke des Donor-Genoms. Dies wird als Retention bezeichnet. Aus der entstandenen Zellpopulation werden die Zellen selektiert, die nur noch eins der Bruchstücke enthalten. Von diesen Zellen werden Kulturen angelegt und charakterisiert. Die Charakterisierung besteht darin, herauszufinden, welches Stück des Zielgenoms sich in welcher Zelle befindet. Eine Möglichkeit der Charakterisierung ist das Screenen der Zellpopulationen mit PCR-Systemen für DNA-Marker. Da die Position der Marker aus den Kopplungskarten bekannt ist, können die in den Zellkulturen enthaltenen Bruchstücke auf diese Weise identifiziert werden.

Für eine Kartierung werden die einzelnen Hybridzelllinien daraufhin untersucht, ob sie einen bestimmten Locus enthalten oder nicht (Cox et al. 1990). Im Rahmen dieser Arbeit geschah dies über PCR. Je weiter zwei Loci voneinander entfernt sind, desto wahrscheinlicher führt eine bestimmte Bestrahlungsdosis zu einem Bruch des Chromosoms zwischen ihnen und platziert die beiden Loci auf diese Weise auf unterschiedlichen Fragmenten, die in verschiedenen Hybridzellen enthalten sind (Cox et al. 1990). Das bedeutet, Loci die eng zusammenliegen zeigen ähnliche PCR-Ergebnisse, während solche, die weit voneinander entfernt sind, als unabhängig in den Hybridzellen erscheinen. Auf diese Weise können neue Loci im Verhältnis zu bereits kartierten Loci in die bestehende *Radiation Hybrid* Karte eingeordnet werden.

Die Abstände auf der erstellten Karte werden in centiRay (cR) angegeben, wobei 1 cR die Wahrscheinlichkeit von 1% darstellt, dass zwischen diesen beiden Loci bei der verwendeten Strahlungsdosis (diese wird als Basis der Einheit cR angegeben) ein Bruch des Chromosoms erfolgt. Je höher die verwendete Strahlungsdosis, desto höher die Wahrscheinlichkeit des Brechens und desto kleiner die entstehenden Fragmente. Das bedeutet, der Abstand 1 cR ist kleiner (in Basenpaaren) bei einer höheren verwendeten Strahlungsdosis (Jones 1997). Daher sind nur *Radiation Hybrid* Karten die aus der Analyse desselben *Panels* resultieren direkt miteinander vergleichbar.

1.2.4 Marker für die Erstellung von Genomkarten

Eine dichte Karte polymorpher Marker ist ein Hilfsmittel, um für jeden Locus von Interesse einen gekoppelten Marker zu finden. O'Brien (1991) unterscheidet zwei Arten von Markern. TypI-Marker sind Gene, die zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert und häufig

wenig polymorph sind. TypII-Marker sind hoch polymorphe spezies-spezifische DNA-Segmente wie z. B. Mikrosatelliten.

Die dominierenden genetischen Marker in der Nutztierzucht sind Mikrosatelliten (Barendse und Fries 1999), die im Folgenden ausführlicher beschrieben werden. Eine weitere Klasse polymorpher Marker sind *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs). SNPs wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Charakterisierung von Kandidatengen entwickelt.

1.2.4.1 Mikrosatelliten

Mikrosatelliten wurden erstmals parallel von drei verschiedenen Gruppen beschrieben (Litt und Luty 1989, Tautz 1989, Weber und May 1989). Sie werden zu den *variable number of tandem repeats* (VNTRs) gezählt und sind gekennzeichnet durch tandemartig wiederholte Sequenzen von Di- bis Hexanukleotiden. Das häufigste Motif ist das Dinukleotid CA, bzw. GT (Stone et al. 1995). Sie werden auch als *short tandem repeat polymorphism* (STRP) bezeichnet. Der Polymorphismus dieser Klasse von Markern wird durch unterschiedliche Anzahlen der Sequenzwiederholungen verursacht. Die Sequenzwiederholungen betragen meist weniger als 100, damit sind die meisten Mikrosatelliten nicht länger als 100-200 Nukleotide. Aufgrund dieser Größenverhältnisse ist eine Amplifikation über PCR möglich (Weber und May 1989).

Stone et al. (1995) schätzten die Zahl von Mikrosatelliten mit dem Motif (CA)_n beim Rind auf 44000. Davon würden aber nur etwa 20 % (= 8800) als Marker zu verwenden sein (Stone et al. 1995, Vaiman et al. 1994). Unter der Annahme einer zufälligen Verteilung sind somit beim Rind als Marker zu verwendende Mikrosatelliten im Abstand von 340 kb lokalisiert. Die Variation von Mikrosatelliten kann durch Amplifikation der Wiederholungen mittels PCR und die Auftrennung der unterschiedlich großen Fragmente auf einem Polyacrylamidgel detektiert werden. Mit der gelbasierten Darstellung von Mikrosatelliten sind allerdings Schwierigkeiten verbunden, da sich auf diese Weise eine Genotypisierung kaum standardisieren läßt (Kruglyak 1997). Die Darstellung dieser Polymorphismen über die elektrophoretische Mobilität und damit die Abhängigkeit von den Bedingungen der Elektrophorese hat nicht nur Unterschiede bei der wiederholten Darstellung derselben Allele zwischen verschiedenen Labors zur Folge, sondern auch von Gel zu Gel in einem Labor.

1.2.4.2 *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs)

SNPs sind Positionen im Genom, an denen zwei alternative Basen mit Frequenzen über 1 % in der Population vorhanden sind (Wang et al. 1998). Diese Einzelbasenaustausche stellen die häufigste Form von DNA-Variation dar (Chakravarti 1999).

SNPs haben große Bedeutung in ihrer Funktion als Marker erlangt. Ein Nachteil ist ihr geringer Informationsgehalt (Kruglyak 1997, Wang et al. 1998), der aufgrund ihrer biallelen Natur nicht so hoch ist wie der von Mikrosatelliten. Daher sind mehr SNPs nötig, um dieselben Aussagen treffen zu können, wie dies bei Mikrosatelliten der Fall ist. Eine Karte von 700-

900 SNPs sollte equivalent sein zu einer Karte bestehend aus 300-400 Mikrosatelliten (Kruglyak 1997). Eine Karte von 1500-3000 SNPs sollte einer solchen Mikrosatelliten-Karte überlegen sein (Kruglyak 1997). Steele und Georges (1991) schätzten an Tieren der Rasse Holstein-Friesian, dass ein zufällig aus der Population ausgewähltes Tier für mindestens 1 Base von 1500 Basenpaaren heterozygot sein wird. Beim Menschen wird von einem Basenaustausch pro 1000 Basenpaaren ausgegangen (Chakravarti 1999).

Ein Vorteil von SNPs ist die Möglichkeit, sie mit unterschiedlichen Methoden zu typisieren. Daher können zu ihrer Charakterisierung die jeweils neuesten Techniken verwendet werden, womit ihre Untersuchung in Zukunft billiger werden dürfte als die der bislang verwendeten Mikrosatelliten. Der große Vorteil von SNPs liegt in ihrer Fähigkeit zur Automatisierung (Kruglyak 1997).

1.3 *Quantitative Trait Locus (QTL) –Kartierung*

QTL können in entsprechenden Versuchsanlagen kartiert werden. Über Kopplungsbeziehungen zu Markern kann ihre chromosomale Position ermittelt und es können Effekte geschätzt werden. Dabei werden nicht alle beteiligten Gene detektiert (Mackay 2001). Beim Rind stehen dichte Markerkarten in Form der Kopplungskarten zur Verfügung. Mit statistischen Methoden ist es möglich, einen QTL Markern zuzuordnen. Dabei wird die Annahme getroffen, dass ein Elterntier sowohl für einen Marker als auch für einen gekoppelten QTL heterozygot ist. Die Überlegung, die der Kartierung zugrundeliegt ist die, dass Nachkommen dieser Elterntiere, die ein alternatives Markerallel erhalten, mit einer größeren Wahrscheinlichkeit das gekoppelte QTL-Allel erhalten (Weller et al. 1990). Je größer der QTL-Effekt und je näher sich der QTL am Marker befindet, desto größer ist die erwartete Differenz der phänotypischen Werte zwischen den verschiedenen Markerklassen. Der anonyme Marker, an dem die größte Differenz zu beobachten ist, ist am wahrscheinlichsten mit dem QTL assoziiert (Falconer und Mackay 1996).

In experimentellen und natürlichen Populationen wurden QTL kartiert, die der genetischen Variation kontinuierlich verteilter Merkmale zugrundeliegen (Flint und Mott 2001, Haley 1995). Erste Versuchsanlagen wurden für Rückkreuzungen oder F₂-Kreuzungen entwickelt. Dabei lag die Annahme zugrunde, dass die Parentalgenerationen für verschiedene Allele des QTL fixiert waren. Alternative Versuchsdesigns für bovine Populationen sind das *Daughter-Design* (Neimann-Sorensen und Robertson 1961) und das *Granddaughter-Design* (Weller et al. 1990). Ein wesentlicher Vorteil des *Granddaughter-Designs* gegenüber einem *Daughter-Design* beruht darauf dass für die Detektion eines QTL nur die Hälfte der Anzahl an Genotypisierungen nötig ist (Weller et al. 1990). Auch ist die DNA-Beschaffung von Bullen, die meist in Besamungsstationen stehen, einfacher, als von vielen Töchtern, die verteilt auf verschiedenen Betrieben stehen. Das *Granddaughter -Design* wurde in praktischen Studien erfolgreich zur Kartierung von QTL verwendet (Elo et al. 1999, Georges et al. 1995, Heyen et al. 1999, Zhang et al. 1998).

Für weitere Untersuchungen ist eine möglichst genaue Schätzung der QTL-Position erforderlich. Eine wichtige Kenngröße für diese Position ist das Konfidenzintervall (Darvasi et al. 1993). Lander und Botstein (1989) schlugen vor, hierfür ein *support interval*, beruhend auf dem *Lod score*, zu schätzen. Simulationsstudien zeigen, dass es mit dieser Methode bei QTL mit geringen Effekten häufig zur Überschätzung der Wahrscheinlichkeit kommt, mit der der QTL in dem ermittelten Intervall liegt (Mangin et al. 1994). Visscher et al. (1996) ermittelten mit *Bootstrapping* empirische Konfidenzintervalle, in denen der QTL, unabhängig von der Größe seines Effektes mit der angegebenen Wahrscheinlichkeit lokalisiert war.

Meuwissen und Goddard (2000) schlagen ein Stufenmodell für die Kartierung von QTL vor. In der ersten Stufe wird ein genomweiter *Scan* zur Detektion des QTL mittels Kopplungsanalyse durchgeführt. Die Position des QTL wird damit auf eine Region von etwa 20 cM festgelegt. Im zweiten Schritt wird diese Region in 1 cM-Intervallen mit Markern abgedeckt und unter Verwendung von Methoden wie der beschriebenen (Meuwissen und Goddard 2000) sollte es damit möglich sein, die QTL-Position auf 3 cM einzuengen. Im dritten Schritt wird die Region mit weiteren Markern im Abstand von 0,25 cM abgedeckt, was zu einer Einengung der QTL-Position auf 0,75 cM führen sollte (Meuwissen und Goddard 2000).

1.3.1 Einfluß der Markerdichte auf die Schätzung der QTL-Position mittels Kopplungsanalyse

In einer Simulationsstudie, die auf einem Rückkreuzungsdesign beruht, untersuchten Darvasi et al. (1993) den Einfluß der Populationsgröße, des QTL-Effektes und der Markerdichte auf die Genauigkeit der ermittelten QTL-Position. Diese wurde in Form von empirischen 95 %-Konfidenzintervallen für verschiedene Markerdichten angegeben. Darvasi et al. (1993) simulierten eine Situation, in der die Markerdichte nicht mehr limitierend für das Auflösungsvermögen der Kartierung war. Dazu platzierten sie Marker in Abständen von 0,1 cM. Ausgehend von dieser extrem dichten Markerkarte ermittelten sie 95 %-Konfidenzintervalle, deren Größe sich als abhängig von der Größe der untersuchten Population und dem QTL-Effekt herausstellte. Die minimale Größe des 95 %-Konfidenzintervalls wurde in dieser Studie als das optimale Markerintervall für die Kartierung von QTL ermittelt. Darvasi et al. (1993) kamen zu dem Schluß, dass es mit dieser Methode nicht möglich ist, Konfidenzintervalle für die QTL-Position zu erreichen, die kleiner als 10 cM sind. Somit würde eine Markerdichte von 10 cM für eine solche Studie ausreichen. Meuwissen und Goddard (2000) gehen davon aus, dass QTL-Positionen basierend auf Kopplungsanalysen in einem Bereich von 20 cM zu erwarten sind. In praktischen Untersuchungen verschiedener *Granddaughter-Designs* wurden Marker in Abständen von 10 cM bis 20 cM untersucht. Die ermittelten Konfidenzintervalle lagen hierbei zwischen 11 cM und 58 cM (Elo et al. 1999, Heyen et al. 1999, Zhang et al. 1998).

1.3.2 Feinkartierung von QTL

Die Auflösung der QTL-Position wird von der Anzahl Rekombinationen, die zwischen den zur Kartierung verwendeten Markern auftreten, beeinflusst (Darvasi 1998). Wenn keine Rekombinationen im betrachteten Intervall auftreten, sind auch höhere Markerdichten in dieser

Region für die Schätzung der QTL-Position nicht mehr nützlich. Ron et al. (2001) verwendeten für ihre Analyse ein *Daughter-Design* (Neimann-Sorensen und Robertson 1961). In dieser Versuchsanlage ist es durch gute Verfügbarkeit der Töchter möglich, viele Rekombinationen zu untersuchen. Für die Untersuchung einer entsprechenden Zahl von Rekombinationen in einem *Granddaughter-Design* müssten viele Söhne mit den entsprechenden Töchtern für die Zuchtwertschätzung zur Verfügung stehen. Ron et al. (2001) ermittelten ein 95 %-Konfidenzintervall von 4 cM für einen QTL auf BTA6, der den Proteingehalt der Milch beeinflusst.

Untersuchungen von Kopplungsungleichgewichten ermöglichen es, nicht nur die Rekombinationen, die in dem genotypisierten Stammbaum auftreten, zu untersuchen, sondern auch die Konsequenzen historischer Rekombinationen in die Analyse einzubeziehen (Farnir et al. 2000, Meuwissen und Goddard 2000). Im Rahmen solcher Untersuchungen werden Markerabstände benötigt, die der Distanz entsprechen, die im gegenwärtigen Kopplungsungleichgewicht zu beobachten ist. Ist das chromosomale Segment, das sich im Kopplungsungleichgewicht mit dem QTL befindet, kleiner als der Abstand der verwendeten Marker, wird kein Ungleichgewicht zwischen Marker und QTL beobachtet (Meuwissen und Goddard 2000). Vor allem beim Menschen gibt es Untersuchungen, die vermuten lassen, dass sich hier Kopplungsungleichgewichte über Distanzen von etwa 3 kb erstrecken (Kruglyak 1999). Das bedeutet, es ist ein Minimum von 500000 SNPs für eine QTL-Kartierung nötig. Die Zahl der SNPs muß eher größer sein, um zufällige Variationen im Ausmaß des Kopplungsungleichgewichtes auszugleichen und lokale Rekombinationsraten zu berücksichtigen (Kruglyak 1999).

Beim Rind könnten die derzeitigen Markerabstände (Kappes et al. 1997, 1.4.1) für eine erste Untersuchung des Genoms unter Nutzung des bestehenden Kopplungsungleichgewichtes, eng genug sein (Farnir et al. 2000). Dies zeigte sich in der Untersuchung einer holländischen Rinderpopulation, bei der Farnir et al. (2000) Kopplungsungleichgewichte beobachteten, die sich über mehrere Dekaden von centiMorgan erstreckten. Eine Folge von Kopplungsungleichgewichten, die über große Bereiche beobachtet werden, kann eine geringe Auflösung der geschätzten QTL-Position sein (Farnir et al. 2000). Wenn in dem chromosomalen Segment, das sich im Kopplungsungleichgewicht befindet und den QTL enthält, keine Rekombinationen stattgefunden haben, ist das Kopplungsungleichgewicht über die gesamte Markerregion einheitlich. Ein QTL kann zwar detektiert, aber nicht präzise lokalisiert werden (Meuwissen und Goddard 2000).

Meuwissen und Goddard (2000) führten eine Simulationsstudie für die Schätzung von QTL-Positionen beim Rind unter der Nutzung des Kopplungsungleichgewichtes durch. Die Positionsschätzungen waren dabei umso genauer, je kleiner das Intervall zwischen den untersuchten Markern war. Das kleinste verwendete Markerintervall betrug 0,25 cM. Angewendet wurde diese Methode bei einer Untersuchung von Zwillingsgeburten des Norwegischen Rindes (Karlsen 2000). Der zuvor identifizierte QTL auf BTA5 (Lien et al. 2000) konnte auf einen Bereich von 3 cM eingengt werden. Der durchschnittliche Abstand der verwendeten Marker betrug hierbei 5,6 cM. In einer Folgestudie, in der eine Kombination von Kopplungsanalyse

und der Analyse des Kopplungsungleichgewichtes verwendet wurde, konnte der QTL auf einen Bereich von 1,3 cM eingegrenzt werden, ohne dass zusätzliche Marker eingesetzt wurden (Karlsen 2000).

Möglicherweise ist auch eine Feinkartierung mit den oben beschriebenen Ansätzen nicht ausreichend, um Aussagen über kausale Zusammenhänge treffen zu können. Nickerson et al. (1998) vermuteten, dass die Analyse einiger weniger variabler Stellen in, oder in der Nähe von, Kandidatengenomen wichtige kausale Verhältnisse übersehen wird. Sie schlossen dies aus einer Untersuchung des Lipoprotein Lipase-Gens des Menschen, in der sie an 71 Individuen aus 3 Populationen 9,7 kb, 1/3 des Gens untersuchten. Dabei wurden 88 polymorphe Stellen, eine variable Stelle alle 2 kb im kodierenden Bereich und alle 476 bp im nicht-kodierenden Bereich, aufgefunden. Eine SNP-Karte mit 100000 SNPs (1 SNP pro 33 kb) hätte im gesamten Lipoprotein Lipase-Gen einen Marker platziert.

1.4 Genomkarten des Rindes

1.4.1 Genetische Karte

Die derzeit dichtesten Markerkarten des Rindes sind Kopplungskarten. Die ersten Kopplungskarten für das Rind wurden 1994 von Barendse et al. und Bishop et al. erstellt. Die Markerdichte dieser Karten ist zwar mit 15- bzw. 10,6 cM-Intervallen hoch genug für die Detektion der meisten QTL, erreicht aber nicht die potenzielle Auflösung, die für eine Feinkartierung oder positionelle Klonierung nötig ist (Kappes et al. 1997). 1997 wurde eine „second-generation linkage map“ von Kappes et al. veröffentlicht. Sie kartierten 627 neue Marker und 623 Marker mit denen die Informationen der 4 zuvor veröffentlichten Kopplungskarten (Barendse et al. 1994, Bishop et al. 1994, Georges et al. 1995, Ma et al. 1996) integriert werden konnten. Kappes et al. (1997) ermittelten eine Gesamtgenomlänge des Rindes von 2990 cM. Dies entspricht einer physischen Länge von 1 Megabasenpaar (Mb) pro 1 cM. Die durchschnittlichen Intervalle zwischen den Markern betragen 2,5 cM. Damit wird die potenzielle Auflösung kartierter QTL erhöht, vorausgesetzt, es sind genügend rekombinante Meiosen verfügbar (Kappes et al. 1997). Diese Markerdichte wird vermutlich nicht für die Feinkartierung von QTL ausreichen (1.3.2). Aus anderen Studien gingen ebenfalls Kopplungskarten hervor (Barendse et al. 1997, Thomsen et al. 2000), von denen aber keine die Markerdichte der Karte des Meat Animal Research Center (Kappes et al. 1997) aufweist.

In den beiden dichtesten Karten (Barendse et al. 1997, Kappes et al. 1997) existieren noch einige große Lücken, unter anderem eine auf der Karte von Barendse et al. (1997) subtelomerisch auf BTA20, die aber teilweise durch Vergleich mit der Karte von Kappes et al. (1997) geschlossen werden kann. Die Lücken, die konsistent zu beobachten sind, könnten möglicherweise geringe Dichten von Mikrosatelliten aufweisen, so dass zu ihrer Abdeckung andere Arten von Polymorphismen nötig sind (Barendse und Fries 1999).

Die genetische Karte nach Kappes et al. (1997) für BTA20 ist in Abb. 1 dargestellt. Angaben über die einzelnen Marker finden sich im Internet (URL 4). Das durchschnittliche Intervall zwischen den Markern beträgt 2,7 cM, wobei die größten Intervalle 11,2 cM (*BM713-BMS2361*) und 9,4 cM (*BMS703-BM5004*) betragen.

1.4.2 *Radiation Hybrid Karte*

Band et al. (2000) entwickelten eine komparative Karte von Mensch und Rind basierend auf Kartierungen mit dem *Radiation Hybrid Panel* BOVRH5 (Womack et al. 1997), der auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Sie ermittelten eine Gesamtlänge des bovinen Genoms von 9330 cR₅₀₀₀. Es wurden 768 Gene sowie 319 Mikrosatelliten kartiert, um diese Karte in existierende bovine Kopplungskarten zu integrieren. 580 Gene wiesen humane Homologe auf, die beim Menschen mit den *Radiation Hybrid Panels* GB4 (Schuler et al. 1996) und G3 (Gyapay et al. 1996) kartiert wurden. Aus der so entstandenen komparativen Karte identifizierten Band et al. (2000) über 105 konservierte Segmente, darunter 1 neues Segment auf BTA20 (zentromerisch), das einer Position von 632 cR₃₀₀₀ auf der „GB4 Karte“ des Menschen entspricht (HSA5q33, URL 5). BTA20 weist eine Länge von 206 cR₅₀₀₀ auf (Abb. 1).

Es wurde ein approximatives genomweites Verhältnis von 3 cR₅₀₀₀ : 1 cM ermittelt (Band et al. 2000). Allerdings wird dieses Verhältnis eine Unterschätzung darstellen, da die *Radiation Hybrid Karte* noch 31 Lücken aufweist (Band et al. 2000). Dieses Verhältnis entspricht einer physischen Distanz von 330 kb pro cR₅₀₀₀ (unter der Annahme, 1 Mb entspricht 1 cM, Kappes et al. 1997). Womack et al. (1997) ermittelten in einem praktischen Versuch, durch die Kartierung eines Locus relativ zu 2 Mikrosatellitenmarkern, deren Abstand auf der genetischen Karte 6 cM beträgt (Kappes et al. 1997), für den hier verwendeten *Radiation Hybrid Panel* ein Verhältnis von 9 cR₅₀₀₀: 1 cM. Dies entspricht einer physischen Distanz von 110 kb pro cR₅₀₀₀.

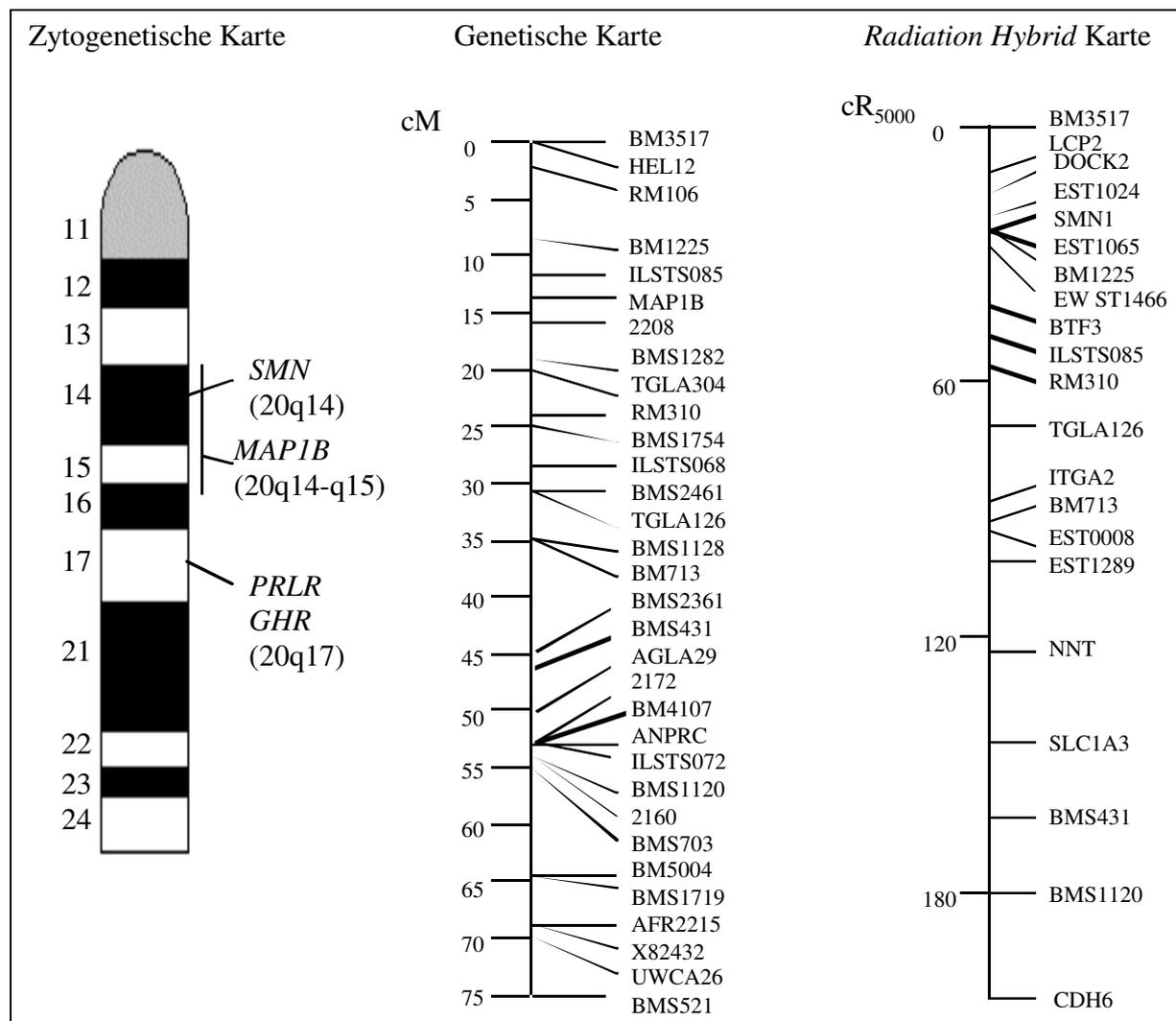


Abb.1: Genomkarten von BTA20. Links: zytogenetische Karte; *GHR*: Moody et al. 1995, *MAP1B*: Eggen et al. 1998b, *PRLR*: Hayes et al. 1996, *SMN*: Eggen et al. 1998a; der Balken gibt die Position von *MAP1B* als Mittelwert \pm Standardabweichung des FLcen-Wertes auf den Bändern des zytogenetischen Standards (Di Berardino et al. 1990) an, 2.7.7.2; der Locus *BMS521* wurde von De Donato et al. (1999) kartiert, es werden aber keine Positionsangaben gemacht und er ist nicht in der *BovMap* Datenbank (URL 6) enthalten. Mitte: genetische Karte des Meat Animal Research Center, Nebraska, USA (Kappes et al. 1997). Rechts: *Radiation Hybrid* Karte (Band et al. 2000).

1.4.3 Zytogenetische Karte

Die systematische Erstellung einer zytogenetischen Karte für das Rind basierend auf FISH wurde bislang nicht unternommen. 1995 faßten Eggen und Fries die Einzelergebnisse aus der *BovMap* Datenbank (URL 6) und der XXIV International Conference on Animal Genetics (Prag, 1994) zusammen und integrierten diese in die Kopplungskarten. Die resultierende Karte umfaßt 877 Loci, 314 davon Gene oder Pseudogene von denen 72 mittels *in situ* Hybridisierung kartiert wurden. 563 Loci sind anonyme Loci, von denen 51 mittels *in situ* Hybridisierung kartiert wurden. Die zytogenetische Karte von BTA20 enthält nur den Locus *MAP1B*

(Eggen und Fries 1995). Die zytogenetische Karte, die in Abb. 1 dargestellt ist, wurde ebenfalls basierend auf den Daten der *BovMap* Datenbank erstellt. Der Locus *IL7R* ist in dieser Darstellung nicht enthalten, da er im Rahmen dieser Arbeit kartiert wurde (Kollers und Fries 2000).

1.5 Chromosom 20 des Rindes (BTA20)

1.5.1 Die QTL-Region auf BTA20

Der erste, beim Rind durchgeführte *whole-genome scan* von Georges et al. (1995) führte zur Detektion von QTL für Milchleistung und Milch Inhaltsstoffe auf den Chromosomen BTA1, BTA6, BTA9, BTA10 und BTA20. Der QTL auf BTA20 beeinflusste das Milchvolumen positiv, ohne Protein- und Fettmenge signifikant zu erhöhen. Fettgehalt und Proteingehalt waren erniedrigt, wobei der Effekt auf den Milchproteingehalt signifikant war. Der QTL wurde, aufgrund des höchsten *LOD score* Wertes in diesem Intervall, zwischen die beiden Marker *TGLA126* (31,2 cM, Kappes et al. 1997, URL 4) und *AGLA29* (50,6 cM, Kappes et al. 1997, URL 4) kartiert.

Dieses Ergebnis wurde 1998 an unabhängigem Familienmaterial bestätigt (Arranz et al. 1998). Bei der Analyse für alle verwendeten Familien wurde der QTL auf das telomerische Ende von BTA20 kartiert (66-73 cM). Bei der Analyse innerhalb einer Einzelfamilie, deren „Großvater“ schon in der zuvor beschriebenen Analyse von Georges et al. (1995) Verwendung fand, wurde der QTL an die Position 32-43 cM kartiert, was dem Ergebnis der ersten Analyse entspricht. Die neueren Ergebnisse ließen Zweifel aufkommen, ob es sich nur um einen QTL handelt, oder ob in dem verwendeten Material zwei QTL auf BTA20 segregieren. Allerdings wird vermutet, dass es sich bei diesen Beobachtungen auch um Ungenauigkeiten bei der Schätzung der QTL-Position aufgrund der geringen Stichprobengröße handeln könnte.

Zhang et al. (1998) verwendeten dasselbe *Granddaughter-Design* wie zuvor Georges et al. (1995). Das *Granddaughter-Design* wurde in dieser Untersuchung um zusätzliche Söhne pro „Großvater“ und zusätzliche Marker erweitert. Auch diese Autoren fanden einen QTL auf BTA20, der vor allem den Fett- und Proteingehalt der Milch beeinflusste. Sie kartierten diesen QTL auf nahezu dieselbe chromosomale Position wie zuvor Georges et al. (1995). In dem erweiterten *Granddaughter-Design* wurde das Konfidenzintervall der QTL-Position durch *Bootstrapping* (Visscher et al. 1996) ermittelt. Es betrug 25 cM. Weiterhin wurde auf das Vorhandensein mehrerer gekoppelter QTL auf einem Chromosom getestet. Bis auf BTA17 war kein Ergebnis signifikant. Die Autoren vermuten, dies beruht auf der geringen Zahl von Familien mit informativen Markern für die jeweiligen Chromosomen (Zhang et al. 1998).

Von Coppieters et al. (1999) wurde ein zuvor für Chromosom 6 analysiertes *Granddaughter-Design* (Coppieters et al. 1998) für den QTL auf BTA20 ausgewertet (Abb. 2). Hierbei sollte ein 95%-Konfidenzintervall für den QTL durch *Bootstrapping* (1.3.1) ermittelt werden. Der schraffierte Bereich in Abb. 2 zeigt die Frequenzverteilung der häufigsten signifikanten Posi-

tionen für das Merkmal, das den höchsten Wert der Teststatistik erhielt, für den Milchprotein-gehalt. Ein 95 %-Konfidenzintervall wird in der Publikation jedoch nicht angegeben.

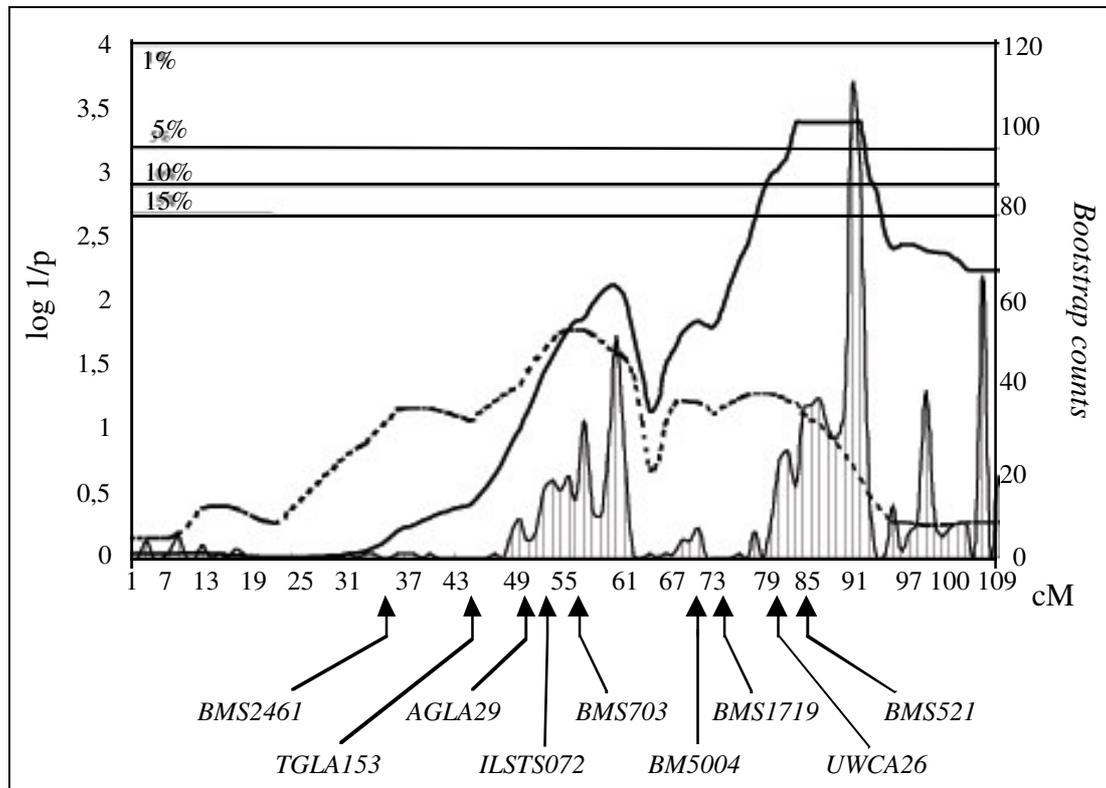


Abb.2: Die QTL-Region auf BTA20 (verändert nach Coppieters et al. 1999). Durchgezogene Linie: Teststatistik ($\log 1/p$) für das Merkmal Milchproteinprozent. Unterbrochene Linie: Teststatistik für das Merkmal Milchfettprozent. Schraffierter Bereich: Ergebnis der *Bootstrap*-Analyse. Horizontale Linien: durch Permutationstest (Churchill und Doerge 1994) ermittelte Signifikanzschwellen bei 1%, 5%, 10% und 15% Irrtumswahrscheinlichkeit. X-Achse: Positionen auf BTA20 angegeben in cM, darunter die typisierten Marker. Rechte Y-Achse: Anzahl der „Bootstrap counts“. Linke Y-Achse: Teststatistik als $\log 1/p$.

1.5.2 Homologie zwischen Chromosom 20 des Rindes (BTA20) und Chromosom 5 des Menschen (HSA5)

Womack und Kata (1995) zeigten eine Homologie zwischen HSA5 und BTA20 beruhend auf der Kartierung von Loci des Menschen, die beim Rind vorwiegend über die Verwendung somatischer Zellhybride kartiert wurden. Die Homologie zu BTA20 wurde durch die Loci *NPR3* (= *ANPRC*) und *MAP1B* begrenzt, womit ein Segment von HSA5p13-q13 festgelegt wurde. HSA5 zeigte in dieser Studie weiterhin Homologie zu BTA1, BTA7, BTA10 und BTA15. Für die vergleichende Kartierung von humanen und bovinen Chromosomen wurde ebenfalls *chromosome painting* eingesetzt. Mit dieser Technik wurden die Grenzen konservierter Syntänie auf einer genomweiten Basis ermittelt. Solinas-Toldo et al. (1995) ermittelten eine Homologie zwischen HSA5 und BTA20q12-q17. Es wurde kein Hybridisierungssignal im Bereich der terminalen Region von BTA20 beobachtet. Daher wurde vermutet, dass dieses Ende keine ausreichende Zahl von Genen enthält, um mit Proben irgendeiner Herkunft zu hybridisieren. Dagegen beobachteten Hayes (1995) und Chowdhary et al. (1996) auch in die-

ser Region eine Hybridisierung der Proben. Sowohl Solinas-Toldo et al. (1995) als auch Hayes (1995) zeigten weiterhin eine Homologie zwischen HSA5 und BTA7 und BTA10, wohingegen Chowdhary et al. (1996) nur noch eine Homologie zwischen HSA5 und BTA7 aufzeigten, keine zu BTA10. Band et al. (2000) zeigten eine Homologie zwischen HSA5 und BTA7, BTA19 und BTA20. Auch sie fanden keine Homologie zwischen HSA5 und BTA10.

1.6 Physische Charakterisierung einer Genomregion

Ein Ziel der Untersuchung von QTL-Regionen ist es, die den QTL beeinflussenden Gene zu identifizieren und die veränderten Funktionsweisen der Genprodukte, die, abhängig von Variationen in der DNA-Sequenz, zu dem veränderten Phänotypen führen, zu verstehen. Ist das Genprodukt mit seinen Varianten bekannt, kann davon ausgehend das verantwortliche Gen identifiziert und kartiert, und anschließend kloniert werden. Diese Vorgehensweise wird auch als funktionelle Klonierung bezeichnet (Collins 1992). Dazu ist es allerdings erforderlich, die biochemische Grundlage beobachteter polymorpher Phänotypen zu kennen. Bei vielen Phänotypen, vor allem bei solchen, die quantitativer Natur sind, ist dies meist nicht der Fall. Eine Methode, in solchen Fällen das Gen von Interesse zu klonieren und zu untersuchen ist die positionelle Klonierung. Diese wurde früher auch als „reverse genetics“ bezeichnet (Collins 1992). Hierbei wird das Gen aufgrund seiner Position im Genom kloniert und analysiert. Grundlegende Voraussetzung für diese Vorgehensweise ist die Kartierung des Locus an seine korrekte Position im Genom.

Bei Nutztieren sind einige Gene positionell kloniert worden. Das erste dieser Gene wurde 1991 beim Schwein kloniert (Fujii et al. 1991). Dabei handelt es sich um einen *calcium release channel*, den *ryanodine receptor (RYR)*, in dem ein Basenaustausch zum *malignant hyperthermia syndrome (mhs)* führt. Ebenfalls beim Schwein wurde 1995 das Gen für einen Fleischqualitätslocus (*rendement napole*, Milan et al. 1995) und 1996 ein Gen für die Resistenz gegen die Ödemkrankheit, der F-18-Rezeptor (Vogeli et al. 1996) kloniert. Beim Rind wurde bislang nur ein Gen positionell kloniert, das Doppellendergen (Grobet et al. 1997). Dieser Locus wurde mit dem Symbol *mh*, *muscular hypertrophy*, bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion im Myostatin-Gen verantwortlich für den beobachteten Phänotypen ist (Grobet et al. 1997). Das *Booroola fecundity gene (FecB)* erhöht Ovulationsrate und Wurfgröße des Schafes. 2001 zeigten Wilson et al. eine Ko-Segregation des *FecB*-Phänotypen mit einer Mutation im *bone morphogenetic protein receptor (ALK-6)*, einem Rezeptor, der Mitglieder der Familie *transforming growth factor- β (TGF- β)* bindet. Das *calipyge* Gen (*CLPG*) verursacht eine Muskelhypertrophie beim Schaf. 2001 kartierten Berghmans et al. ein 450 kb-Intervall, das wahrscheinlich das *CLPG* Gen enthält.

Als Substrate für die positionelle Klonierung und physische Charakterisierung einer Genomregion werden häufig *Contigs* von genomischen *Large Insert* Klonen verwendet. Diese Klone liegen in Form von *Large Insert Libraries* vor.

1.6.1 *Large Insert Libraries*

Als *Library* (auch Bibliothek oder Genbank) wird eine Sammlung klonierter DNA-Fragmente, die in Bakterien vermehrt wird, bezeichnet (Watson et al. 1993). Für die Herstellung solcher Banken werden Vektoren, die Klonierungsvektoren, benötigt. Diese ermöglichen das Einbringen und die Stabilität der Fremd-DNA im Wirtsorganismus, sowie ihre Replikation und die Aufteilung auf die Tochterzellen.

1.6.2 Klonierungsvektoren für die Erstellung von *Large Insert Libraries*

1.6.2.1 Cosmid-Vektoren

Einer der ersten Vektoren für die Klonierung großer DNA-Fragmente ist der Cosmid-Vektor, der Anfang der 80er Jahre von Meyerowitz et al. (1980) eingeführt wurde. Cosmid-Vektoren leiten sich von Plasmiden und λ -Phagen ab. In ihnen sind nur noch die Sequenzelemente des λ -Phagen enthalten („cos-sites“), die für die Verpackung der Fremd-DNA in die Phagenköpfe nötig sind. Dies reicht für die λ -Verpackungsenzyme aus, die jedes Molekül verpacken, das in einem Abstand von 37-52 kb die beiden *cos*-Stellen enthält. Weiterhin enthalten Cosmide selektierbare Marker und einen Plasmidreplikationsstartpunkt.

Bei der Herstellung von Cosmiden wird das einzuklonierende Zielgenom mit Restriktionsenzymen geschnitten und in den vorbereiteten Vektor ligiert. In der Ligationsreaktion entstehen Konkatemere, die an den *cos*-Stellen geschnitten und in die Phagenköpfe verpackt werden. Mit den auf diese Weise erzeugten rekombinanten Phagen werden *Escherichia coli*- (*E. coli*) Zellen infiziert. Sobald die Infektion erfolgt ist, verhält sich das Konstrukt wie ein Plasmid.

Da nur Vektoren, die etwa 45 kb Fremd-DNA enthalten verpackt werden, besitzen Cosmid-Banken relativ einheitliche Insertgrößen, die aber nicht dem Ziel entsprechen, wie es für die Klonierung von Nutztiergenomen gesetzt wird. Bei einer durchschnittlichen Insertlänge von 40 kb sind etwa 224700 Klone nötig, um eine bestimmte DNA-Sequenz mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % (1.6.3) in einer solchen Klonpopulation aufzufinden.

1.6.2.2 *Yeast Artificial Chromosome (YAC)-Vektoren*

Burke et al. erstellten 1987 die ersten YAC-Banken. Sie schätzten die Kapazität dieses Vektorsystems auf „mehrere 100 kb“. Inzwischen wurden YAC-Banken für viele Spezies hergestellt. Es wurden unter anderem vier YAC-Banken für das Rind erstellt die durchschnittliche Insertgrößen von 480 kb bis 730 kb aufweisen (Hills et al. 1999, Libert et al. 1993, Smith et al. 1996, Takeda et al. 1998).

YAC-Vektoren besitzen neben selektierbaren Markern und einem Replikationsstartpunkt eine Zentromer- und zwei Telomersequenzen, die vor der Klonierung über eine Verbindungssequenz zu einem zirkulären Plasmid verbunden sind. Durch Hydrolyse des Plasmids werden zwei Arme erzeugt, an deren Enden die Fremd-DNA „eingefügt“ wird. Beide Arme enthalten

eine Telomersequenz und einen selektierbaren Marker. Nach der Klonierung können, bedingt durch die selektiven Marker, nur solche Hefezellen wachsen, deren rekombinante Moleküle aus beiden Armen bestehen, also alle Elemente eines Chromosoms (Zentromer und zwei Telomere) enthalten (Burke et al. 1987).

Ein Nachteil von YAC-Banken ist der große Anteil an chimärischen Klonen. Dieser Chimärismus wird weniger auf Ko-Ligation zurückgeführt, als vielmehr auf Rekombination zwischen den YACs (Wada et al. 1994). Etwa 10 % der Hefeklonen enthalten mehr als 1 YAC (Watson et al. 1993). Außerdem ist die DNA-Präparation aufwändig, da die künstlichen Hefechromosomen von den natürlichen Chromosomen des Wirtes getrennt werden müssen.

1.6.2.3 *P1-derived Artificial Chromosome (PAC)-Vektoren*

Dieses Klonierungssystem wurde erstmals von Ioannou et al. (1994) verwendet. In ihm wurden die Vorteile des P1- und F-Faktor-Systems (BACs, 1.6.3) vereinigt. Ebenso wie F-Faktor-basierte Vektoren können mit diesem System Bakterien effizient durch Elektroporation transformiert werden. Die Vorteile des P1-Systems, Selektion auf Rekombinanten, zwei Replikationsstartpunkte, von denen einer die *multi-copy*-Vermehrung induziert, kennzeichnen auch dieses System. Bei der erstmaligen Verwendung wurde eine durchschnittliche Insertgröße von 145 kb beobachtet. Die längsten *Inserts* waren größer als 300 kb (Ioannou et al. 1994).

1.6.3 *Bacterial Artificial Chromosome (BAC)-Banken*

Im Rahmen des humanen Genomprojektes wurden Vektoren konstruiert, die auf dem F-Plasmid von *E. coli* basieren, die *Bacterial Artificial Chromosomes* (Shizuya et al. 1992). Diese Vektoren sind fähig, *Inserts* bis 300 kb aufzunehmen (Shizuya et al. 1992), und die DNA-Präparation ist, aufgrund der Ringform des Plasmids und des Größenunterschieds zum Bakterienchromosom, einfach.

Die erste BAC-Bank wurde 1992 für den Menschen erstellt (Shizuya et al. 1992). Verwendet wurde der Vektor pBAC108L. Es konnten Fragmente mit einer durchschnittlichen Insertlänge von 100 kb kloniert werden. Allerdings wurden Insertlängen bis zu 300 kb beobachtet. Über etwa 100 Generationen wurden keine Instabilitäten der *Inserts* festgestellt. Weiterhin wurde der Chimärismusgrad mittels FISH überprüft. Von 28 kartierten BAC-Klonen war keiner chimärisch (Shizuya et al. 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Vektor pBACe3.6 verwendet (Frenken et al. 1999, Abb. 3). Die wichtigsten Elemente dieses Vektors für die Erstellung genomischer BAC-Banken sind:

- *multiple cloning site*: hier schneiden 6 verschiedene Restriktionsenzyme, die innerhalb der Vektorsequenz nicht schneiden; mit diesen Enzymen werden die für die Klonierung erforderlichen Enden erzeugt

- kurzes Fragment (8 kb nach der Klonierung): leichte Handhabung; geringe Mehrkosten durch wiederholte Sequenzierung von Vektorelementen bei Sequenzierungsprojekten
- pUC-Link-Abschnitt: dient als Platzhalter für die *Insert*-DNA; er verhindert die Expression des *sacBII*- Gens, welches auch bei Abwesenheit von Sucrose zu vermindertem Wachstum der Bakterienkolonien führt; außerdem ist er erforderlich für die effiziente Vermehrung des Vektors: er enthält einen Replikationsursprung der die *multi-copy*-Vermehrung des Vektors ermöglicht
- Levansucrase (*sacBII*)-Gen: dient zur Selektion von BACs mit *Inserts*; Genprodukt ist das Enzym Levansucrase, das aus Sucrose, die dem Nährboden zugesetzt wird, zelltoxisches Levan produziert; durch ein *Insert* (pUC-Link-Abschnitt oder klonierte DNA) wird der Promotor vom Rest des Gens getrennt und das Gen wird nicht exprimiert
- *origin of replication*: hält die Kopienzahl des BACs auf 1-2 pro Zelle; dadurch werden Rekombinationen zwischen BACs vermieden.
- Chloramphenicolresistenz: zur Selektion von Bakterien, die den Vektor bei der Transformation aufgenommen haben

Die folgenden Eigenschaften von BAC-Banken werden im Hinblick auf ihre Verwendung untersucht:

- Genomabdeckung
- durchschnittliche Insertlänge
- gleichmäßige Repräsentation des einklonierten Genoms
- Chimärismusgrad

Der Repräsentationsgrad wird nach folgender Formel berechnet (verändert nach Sambrook et al. 1989):

$$P = 1 - e^{-N \cdot f}$$

mit: P = Wahrscheinlichkeit, mit der eine Sequenz in der Bank vorhanden ist

N = Anzahl von Klonen

f = Verhältnis der Größe der klonierten DNA-Fragmente zur klonierten Gesamtgenomgröße

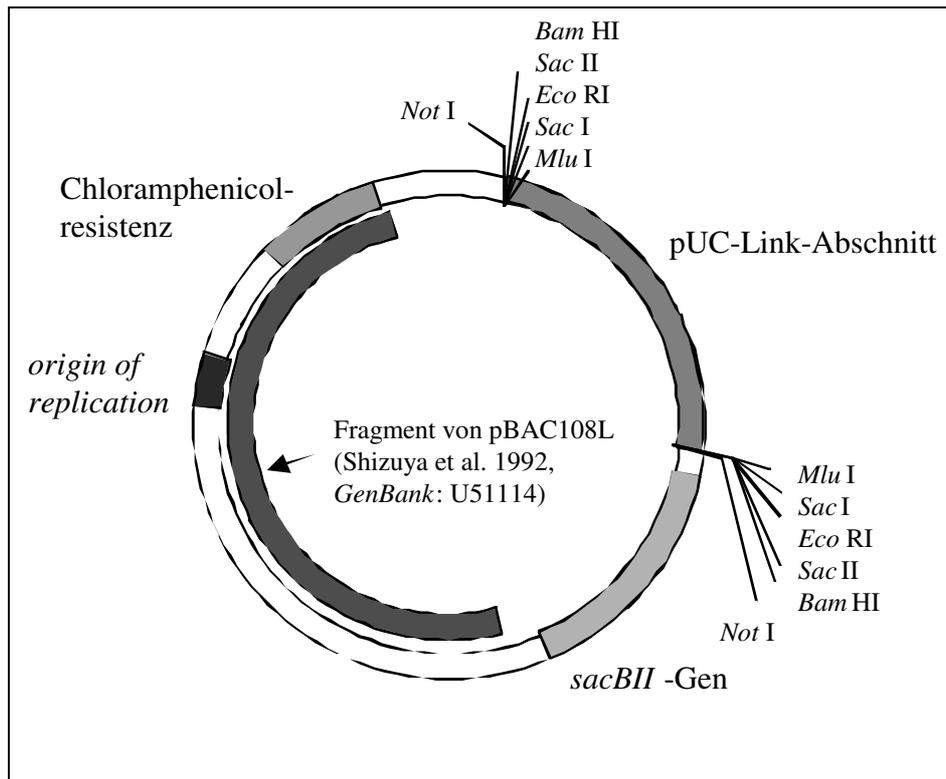


Abb.3: Der BAC-Vektor pBACe3.6 (verändert nach Frengen et al. 1999). Äußerer „Doppelring“: Vektor mit den Elementen (von links im Uhrzeigersinn) Replikationsursprung (*origin of replication*); Gen für die Chloramphenicolresistenz; *multiple cloning site*, in der die Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme *Not I*, *Bam HI*, *Sac II*, *Eco RI*, *Sac I* und *Mlu I* lokalisiert sind; pUC-Link-Abschnitt; *sacBII*-Gen. Inneres Segment: deutet den Bereich des Vektors an, der dem BAC-Vektor pBAC108L entstammt.

Bislang wurde die Erstellung von fünf bovinen BAC-Banken veröffentlicht (Tab. 1). Eine dieser BAC-Banken ist diejenige deren Erstellung und Anwendung in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird (Buitkamp et al. 2000). Die erste für das Rind erstellte BAC-Bank wurde 1995 von Cai et al. beschrieben. Sie besitzt eine einfache Genomabdeckung bei einer durchschnittlichen Insertlänge von 146 kb in 23040 BAC-Klonen (Tab. 1). 1999 wurde die Erweiterung dieser BAC-Bank von De Donato et al. beschrieben. Ebenfalls 1999 wurde die Erstellung einer BAC-Bank mit fünffacher Genomabdeckung von Zhu et al. veröffentlicht. Diese BAC-Bank wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Technischen Universität München am Babraham Institute (BBI), Cambridge, UK, hergestellt und soll von der BAC-Bank, deren Erstellung in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird, ergänzt werden. Sie ist ebenso wie die hier beschriebene BAC-Bank über das Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) in Berlin öffentlich verfügbar (URL 7). Eine weitere der Öffentlichkeit zugängliche BAC-Bank ist die von Warren et al. (2000) am Roswell Park Cancer Institute (RPCI), Buffalo, USA, erstellte BAC-Bank. Diese Bank besitzt eine zehnfache Genomabdeckung und ist in den USA erhältlich. Von Eggen et al. wurde 2001 die Erstellung einer bovinen BAC-Bank mit einer vierfachen Genomabdeckung veröffentlicht.

Tab.1: Eigenschaften veröffentlichter boviner BAC-Banken

	Cai et al. (1995) ¹	Zhu et al. (1999)	Warren et al. (2000)	Buitkamp et al. (2000)	Eggen et al. (2001)
Rasse	Angus	Jersey	Holstein-Friesian	Holstein-Friesian	Holstein-Friesian
Vektor	pBeloBACII	pBACe3.6	pBACe3.6	pBACe3.6	pBeloBACII
Genomabdeckung	1 x (3,5 x)	5 x	10 x	3 x	4 x
Anzahl Klone	23040 (81000)	157240	216439	82944	105984
Ø ² Insertlänge	146 kb (125 kb)	105 kb	164 kb	112 kb	120 kb
Chimärismusgrad	0 %	6 %	-- ³	4,6 %	0 %
R theoretisch ⁴	67 % (96,5 %)	99,5 %	99,9 %	95 %	0,98

¹Angaben in Klammern beziehen sich auf die Erweiterung der BAC-Bank wie sie von De Donato et al. (1999) beschrieben wird

²durchschnittlich

³keine Angaben

⁴Repräsentationsgrad definierter Sequenzen berechnet anhand der Formel nach Sambrook et al. (1989, S. 17)

1.7 Ziele der Arbeit

An unserem Institut wurde bereits eine Cosmid-Bank für das Huhn erstellt (Buitkamp et al. 1998). Die Erstellung einer Cosmid-Bank für das Rind schien aufgrund der Anzahl an Klonen, die schon für eine einfache Genomabdeckung nötig sind (1.6.2.1), nicht geeignet. Im Rahmen von Genomanalyse-Projekten wurde die erfolgreiche Anwendung von BAC-Banken beschrieben. Eine bovine BAC-Bank wurde von Cai et al. (1995) veröffentlicht. Diese war zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht öffentlich verfügbar.

Im Einzelnen wurden die folgenden Ziele verfolgt:

1. Erstellung der BAC-Bank

Das Ziel war es, eine genomische BAC-Bank als Ressource für die Genomuntersuchung des Rindes zu erstellen. Diese BAC-Bank sollte folgende Voraussetzungen erfüllen:

- Ergänzung der bereits bestehenden BAC-Bank (Cai et al. 1995), sowie der parallel erstellten BAC-Bank „Bovine BAC“ (RZPD, Nr. 750) des Babraham Institute, Cambridge, UK (Zhu et al. 1999)
- Zusätzliche Abdeckung des Rindergenoms mit *Large Insert* Klonen und damit Ermöglichung des Auffindens von spezifischen *single-copy* Sequenzen

- Öffentliche Verfügbarkeit (durch Zusammenarbeit mit dem Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH in Berlin)
- Eine durchschnittliche Insertlänge von mindestens 100 kb

2. Verwendung der BAC-Bank

Die Anwendung der erstellten BAC-Bank sollte durch die physische Kartierung und die Markerentwicklung in einer zuvor bestimmten Genomregion erfolgen. Gewählt wurde Chromosom 20 des Rindes (BTA20), da hier eine QTL-Region identifiziert wurde (Georges et al. 1995).

Folgende Ziele wurden angestrebt:

- Integration der zytogenetischen Karte mit Kopplungskarten durch die physische Kartierung von mikrosatellitenenthaltenden BAC-Klonen
- Integration der zytogenetischen Karte in die aktuellste *Radiation Hybrid* Karte (Band et al. 2000) durch Screenen des *Radiation Hybrid* Panels BOVRH5 von Womack et al. (1997)
- Physische Begrenzung der QTL-Region durch die physische Kartierung von BAC-Klonen, die Loci der genetischen und physischen Karten enthalten, um weitere BAC-Klone im Verhältnis zu diesen positionieren zu können
- Physische Kartierung von positionellen Kandidatengen, um zu ermitteln, ob sie in das abgegrenzte Intervall kartieren
- Überprüfung des Kandidatenstatus der bereits kartierten Gene *GHR* und *PRLR*
- Anordnung der BAC-Klone in der QTL-Region
- Entwicklung von SNP-Markern aus den BAC-Klonen zur Analyse der positionellen Kandidatengene

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung von bovinen BAC-Klonen

Das im Folgenden beschriebene Verfahren zur Herstellung von BAC-Klonen, dessen einzelne Schritte in Abb. 4 dargestellt sind, basiert auf dem Protokoll von Ioannou und de Jong (1996).

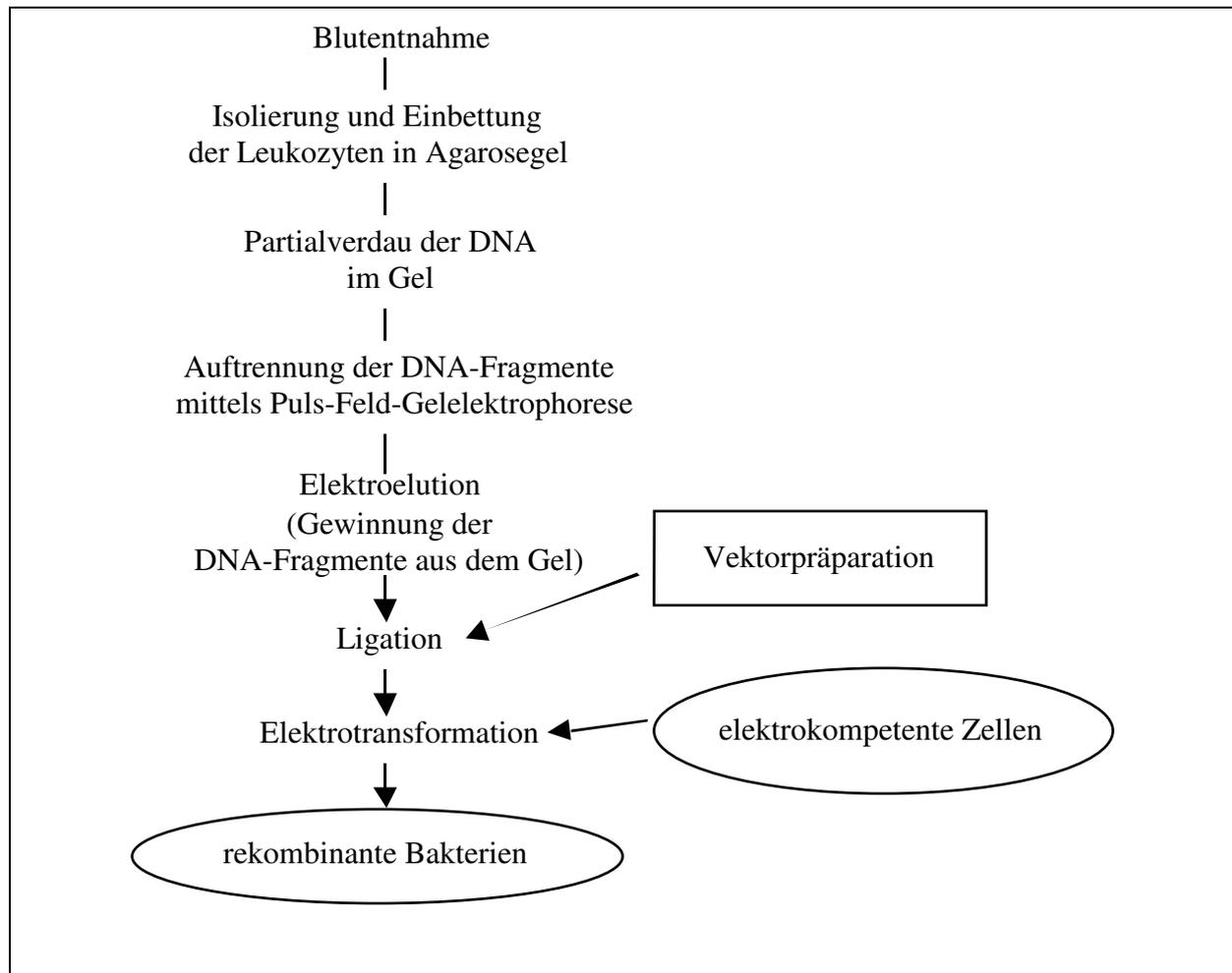


Abb.4: Arbeitsschritte bei der Herstellung von BAC-Klonen.

2.1.1 Erzeugung von DNA-Fragmenten für die Klonierung

Die Bereitstellung von intakten DNA-Fragmenten, die mehr als 100 Kilobasenpaare (kb) umfassen, erforderte es, insbesondere ein mechanisches Scheren der DNA zu vermeiden.

2.1.1.1 Isolierung von Leukozyten und Einbettung in Agarosegel

Ausgangsmaterial für die Erzeugung langer genomischer DNA-Fragmente waren Leukozyten, die aus Blut isoliert wurden. Dafür wurde das Blut eines 6 Wochen alten, männlichen Tieres der Rasse Holstein-Friesian verwendet.

Durchführung:

- Entnahme von etwa 300 ml Blut aus der Halsvene in 50 ml Reaktionsgefäße² mit 5 ml 0,5 M EDTA (Sigma, ED2SS) pH 8,0
- Gewinnung des Zellpellets durch Zentrifugation (Hermle, Z 513 K): 4000 g, 4°C, 10 Minuten
- Waschen des Zellpellets mit 1 x PBS
- Lösen des Zellpellets in 45 ml *RBC-lysis solution*, Schwenken des Röhrchens führt zur Lyse der Erythrozyten (Farbwechsel von hellrot-durchsichtig nach dunkelrot-trüb)
- Gewinnung des Zellpellets durch Zentrifugation
- Waschen des Zellpellets mit 1 x PBS
- Vereinigung jeweils zweier Zellpellets in einem 50 ml Reaktionsgefäß
- zweimaliges Waschen der Zellpellets mit 1 x PBS
- Beurteilung der Konzentration und Qualität der isolierten Leukozyten durch Auszählen in einer Zählkammer (Thoma)
- Einstellen der Zelldichte auf 2×10^7 Zellen pro ml 1 x PBS und Mischen dieser Zellsuspension bei 37°C mit 100 µl 0,5 % SeaPlaque®GTG® Agarose (FMC Bio Products, 50111)
- Das Leukozyten-Agarosegemisch wurde in Plastikformen (Disposable Plug Molds, Bio-rad Laboratories, 170-3713) gegossen, wodurch Blöckchen mit den Maßen 10 x 5 x 1,5 mm erzeugt wurden³. Diese wurden in 0,5 M EDTA pH 8,0 bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.1.1.2 Partialverdau der Leukozyten-DNA

Die Erzeugung langer DNA-Fragmente für die Klonierung erfolgte durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *Dpn II*. Dieser Verdau wurde zeitlich begrenzt und mit einer zuvor optimierten Enzymmenge durchgeführt.

Vor dem Verdau wurde die DNA mittels Proteinase K aus den Leukozyten freigesetzt. Die Proteinase K wurde anschließend durch Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF, Sigma, P7626) inaktiviert.

Durchführung:

- Umpuffern der Agarose-Blöckchen von 0,5 M EDTA pH 8,0 auf 1 x Proteinase K-Reaktionspuffer über Nacht
- zweimalige Proteinase K-Behandlung: 1 mg Proteinase K pro ml 1 x Reaktionspuffer, 1 % N-Lauroylsarkosin (Sigma, L5000), Inkubation bei 50 °C für 24 Stunden

² Labormaterial, sowie Lösungen, Medien, Puffer, Enzyme etc. finden sich im Anhang (Tab. 23A-27A).

³ Ein Blöckchen enthielt etwa 10 µg DNA.

- Inaktivierung der Proteinase K mit PMSF: Überführung der Agarose-Blöckchen in 1 x TE pH 7,6 mit 40 µg PMSF pro ml 1 x TE, zweimalige Inkubation bei 50°C für 1 Stunde mit Wechsel des Puffers
- Umpuffern der Blöckchen von 1 x TE pH 7,6 auf 1 x TE pH 8,0 über Nacht
- Vereinzeln der Blöckchen in 1,5 ml Reaktionsgefäße
- Umpuffern der vereinzelteten Blöckchen in 1 ml 1 x *Dpn* II-Reaktionspuffer für 2 Stunden
- Wechseln des Puffers und Zugabe von 7,5 U *Dpn* II
- nach 2 Stunden Zugabe von 10 µl einer 1 M MgCl₂-Lösung⁴ (Merck, 814733)
- Verdau der DNA in der Agarose für 1,5 Stunden bei 37°C
- Stoppen der Reaktion durch die Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 und Kühlen bei 4°C

2.1.1.3 Auftrennung langer DNA-Fragmente mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE)

Auch bei einem optimierten Partialverdau ist die Größenverteilung der entstandenen DNA-Fragmente nicht gleichmäßig. Um eine einheitliche Insertlänge in der BAC-Bank zu gewährleisten, war es daher erforderlich, die DNA-Fragmente vor der Klonierung nach ihrer Größe zu sortieren. Aufgrund der angestrebten Länge der *Insert*-DNA war dies durch PFGE möglich.

Da kleine DNA-Fragmente bei der Transformation bevorzugt in die Bakterien eingebracht werden, sollten diese möglichst vollständig entfernt werden. Zu diesem Zweck wurden die DNA-Fragmente durch zwei aufeinanderfolgende elektrophoretische Auftrennungen größenfraktioniert (Abb. 5). Nach der ersten Auftrennung wurde der „untere“ Teil des Gels mit den darin enthaltenen kleinen Fragmenten entfernt. Die verbleibenden DNA-Fragmente wurden ein zweites Mal aufgetrennt, indem der nicht-verworfenen Teil des ersten Gels umgekehrt in das zweite Gel eingesetzt wurde (Abb. 5). Das hatte zur Folge, dass die größten Fragmente, und vor diesen „gefangene“ kleine Fragmente, an den unteren Rand der Lauffront gebracht wurden. Da die unterschiedlichen Größenfraktionen der DNA-Fragmente unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten haben, kam es zur Ausbildung einer Kompressionszone, in der die großen DNA-Fragmente zusammenliefen, während die an den unteren Rand der Lauffront verbrachten, kleinen Fragmente aus dem Gel liefen.

Die BAC-Bank wurde in zwei Teilen erstellt. Für Teil 1 der Bank wurde der Teil des ersten Gels mit kleineren DNA-Fragmenten als 150 kb verworfen, für den zweiten Teil der Bank wurde die DNA-Größenfraktion unter 75 kb verworfen.

⁴ Das Enzym diffundiert wesentlich langsamer in die Agarose als MgCl₂. Daher wurde MgCl₂ erst zugegeben, nachdem das Enzym die DNA erreicht hatte. So wurde der Verdau gleichmäßig innerhalb des gesamten Agaroseblocks gestartet.

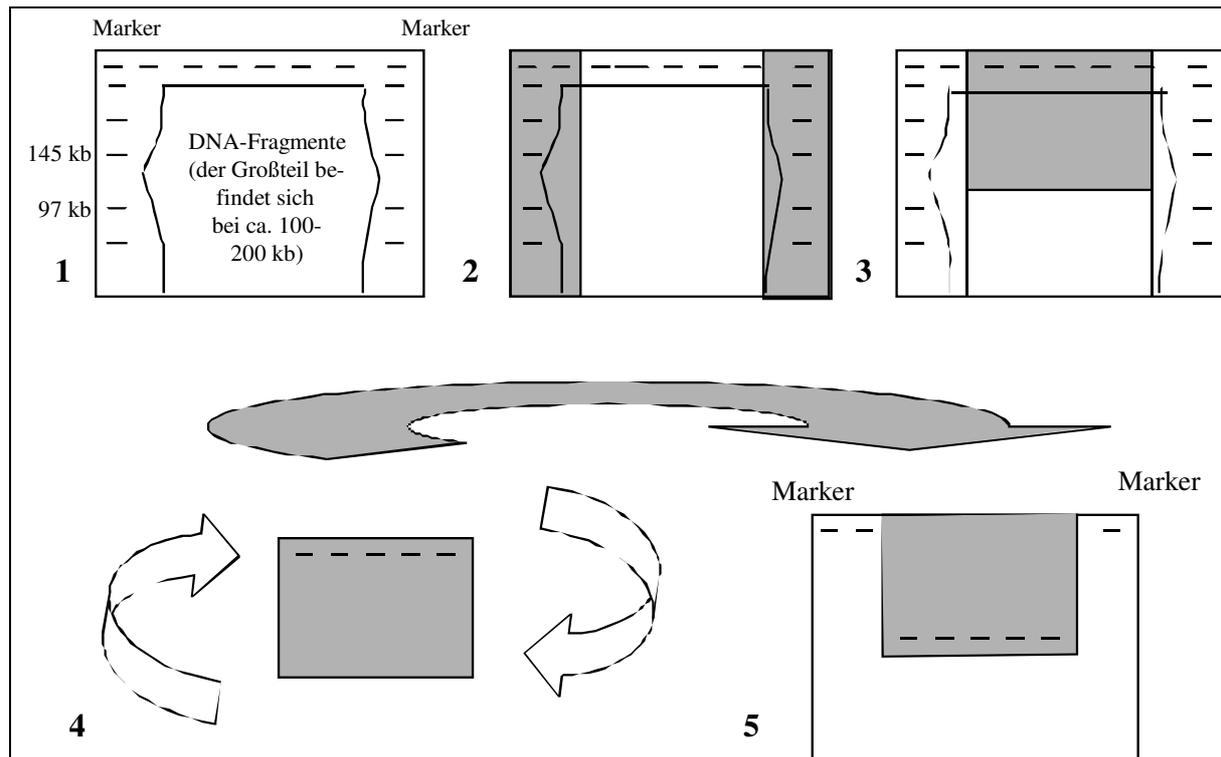


Abb.5: Größenfraktionierung der DNA-Fragmente mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese. 1: Gel nach der ersten Auftrennung; der Großteil der Fragmente befindet sich im Größenbereich von 100-200 kb. 2: die Teile des Gels, die zur Lokalisierung des angestrebten Größenbereichs der DNA-Fragmente ausgeschnitten und mit Ethidiumbromid gefärbt werden, sind grau unterlegt. 3: der Teil des ersten Gels, der in das zweite Gel eingesetzt wird, ist grau unterlegt. 4: Umdrehen des ersten Gels und 5: Einsetzen in das zweite Gel entgegengesetzt zur vorherigen Laufrichtung.

Durchführung:

- Einsetzen der Gelblöckchen mit den DNA-Fragmenten in den Kamm eines 0,8 % igen Agarose-Gels (Agarose III, Pulsed-Field Application, PFGE Grade: X174-2506, Amresco, CAS#9012-36-6)
- erste elektrophoretische Auftrennung mit einem CHEF-DR®II PFGE-Gerät (Bio-rad Laboratories) bei folgenden Laufbedingungen: 1 x TAE, 10°C, 6 V/cm, 24 Stunden, Anfangs-switchzeit 30 Sekunden, Endswitchzeit 60 Sekunden, Elektrodenwinkel 120°(Abb.5-1)
- Abschneiden der Randstreifen des Gels mit dem Marker (Lambda Ladder PFG Marker, New England Biolabs, 340), Anfärben mit Ethidiumbromid (Amresco, x-328) und Lokalisierung des angestrebten Größenbereichs von 100-200 kb, in dem sich der Hauptteil der DNA-Fragmente befindet⁵(Abb. 5-2)
- Entfernen des ungefärbten Gelteils, der die zu kleinen Fragmente enthält (Abb. 5-3)

⁵ Dadurch wird eine Schädigung der zu klonierenden DNA durch Ethidiumbromid und UV-Licht vermieden.

- Einsetzen des verbleibenden ungefärbten Gelteils in das zweite Puls-Feld-Gel, entgegengesetzt zur vorherigen Laufrichtung (Abb. 5-4 und 5-5)
- zweite elektrophoretische Auftrennung mit den Laufbedingungen der ersten Auftrennung, mit einer auf 16 Stunden verkürzten Laufzeit unter Verwendung von „Large DNA Low Melt“ Agarose (Biozym, 870084)
- Lokalisierung der DNA-Fragmente in der Kompressionszone wie oben beschrieben
- Ausschneiden von etwa 3 mm breiten Gelstreifen mit DNA-Fragmenten aus der Kompressionszone
- Aufbewahrung der Gelstreifen in 0,5 M EDTA pH 8,0 bis zur weiteren Verwendung bei + 4°C

2.1.1.4 Extraktion der DNA-Fragmente aus dem Gel durch Elektroelution

Zur Gewinnung der DNA-Fragmente aus dem Gel boten sich grundsätzlich zwei Methoden:

- Schmelzen des Gels und Verdau der Agarose mit β -Agarase
- Elektroelution

Versuche mit beiden Methoden zeigten eine geringere Schädigung der DNA bei Verwendung von Elektroelution (siehe auch Strong et al. 1997).

Durchführung:

- Umpuffern der Gelstreifen in 1 x TE pH 8,0 über einen Zeitraum von 2 Tagen mit viermaligem Wechsel des Puffers
- Überführen der Gelstreifen in Dialyseschlauch (ZelluTrans 10 V Pretreated High Grade Dialysis Tubing for DNA Applications, Roth, E889.1) mit 1 x TE pH 8,0
- Elution der DNA aus dem Gel in den Dialyseschlauch durch Elektrophorese in 1 x TAE, bei 4°C, 6 V/cm, 4 Stunden
- Umkehrung der Stromrichtung für 1 Minute⁶
- Überführung der in 1 x TE gelösten DNA aus dem Dialyseschlauch in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einer Pipettenspitze mit weiter Öffnung
- Quantifizierung der DNA in einem 0,8 % igen Agarosegel (Roth, 2267.3) durch Vergleich mit λ DNA (MBI Fermentas, SD0011)

⁶ um an die Wand des Dialyseschlauchs gebundene DNA wieder in Lösung zu bringen

2.1.2 Klonierung der DNA-Fragmente in *Escherichia coli* (*E. coli*) DH10B

2.1.2.1 Vorbereitung des Vektors auf die Ligation

Für die Klonierung der Fragmente wurde der Vektor pBACe3.6 (Abb. 3, Einleitung), der von E. Frengen (University of Oslo, Oslo, Norwegen) und P. de Jong (Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, USA) zur Verfügung gestellt wurde, verwendet.

Die Präparation des Vektors erfolgte in 5 Schritten.

Durchführung:

1. Entfernung des pUC-Link-Fragmentes durch Verdau der zirkulären Vektor-DNA mit dem Restriktionsenzym *Mlu* I:

Ansatz:

30 µl	10 x <i>Mlu</i> I-Reaktionspuffer
5 µl	<i>Mlu</i> I (50 U)
150 µl	Vektor-DNA (10 µg)
120 µl	Wasser

Der Ansatz wurde für 3 Stunden in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend durch Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten gestoppt.

2. Verdau der Vektorenden mit dem Klonierungsenzym *Bam*HI⁷:

Ansatz:

20 µl	10 x <i>Bam</i> HI-Reaktionspuffer
0,5 µl	<i>Bam</i> HI (10 U)
50 µl	<i>Mlu</i> I-verdaute Vektor-DNA (3,3 µg)
130 µl	Wasser

Der Verdau wurde für 2 Stunden in einem 37°C-Wasserbad durchgeführt und durch Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten gestoppt.

⁷ Die Entfernung des pUC-Link-Abschnittes musste vollständig geschehen. Durch den ersten Verdau der Vektor-DNA mit *Mlu* I konnte es daher zur Schädigung der Enden kommen. Deshalb wurde die Erzeugung der Vektorenden für die Klonierung mit einem weiteren Enzym unter strikter zeitlicher Begrenzung der Reaktion durchgeführt.

3. Chloroform-Phenol-Extraktion und Fällung der Vektor-DNA:

- Zufügen von 150 µl Chloroform/Isoamylalkohol (Merck, 102445/ 822255) im Verhältnis 24:1 und 150 µl Phenol (Merck, 100206) zum Ansatz aus 2.
- 2 Minuten schwenken, Zentrifugation (Eppendorf, Centrifuge 5415R) bei 11200 g für 5 Minuten
- Zufügen von 300 µl Chloroform/Isoamylalkohol zur oberen Phase nach Verwerfen der unteren Phase
- Zentrifugation: 11200 g, 5 Minuten
- für die Fällung der Vektor-DNA aus der oberen Phase: Zufügen von 2,5 µl 3 M NaAc pH 5,2 (Merck, 106268) und 630 µl 99 % EtOH (Merck, 108543), dieser Ansatz blieb 30 Minuten bei -20°C stehen
- Gewinnung des DNA-Pellets durch Zentrifugation bei 14700 g, 4°C , 30 Minuten
- Waschen des Pellets mit 500 µl 70 % EtOH und Aufnehmen der DNA in 200 µl TE pH 8,0

4. Die Aufreinigung der Vektor-DNA erfolgte über eine Microcon-YM-100-Säule (Millipore, 42413) nach den Angaben des Herstellers⁸.

- Die gereinigte Vektor-DNA wurde in einem 1 % igen Agarosegel, durch Vergleich mit einer definierten Menge λ -DNA, quantifiziert, auf eine Konzentration von 10 ng/µl mit 1 x TE pH 8,0 eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

5. Dephosphorylierung der Vektorenden⁹:

Zufügen von 6 µl (6 U) SIP (Shrimp Intestine Phosphatase), Inkubation für 10 Minuten bei 37°C , Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 und Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten¹⁰.

⁸ Die Aufreinigung der DNA über eine Säule wurde zur Entfernung kleiner Fragmente, die durch den Verdau mit zwei Enzymen entstehen, durchgeführt. Diese DNA-Sequenzen könnten bei der Ligation mitreagieren und zu einem hohen Anteil an Vektor mit sehr kleinen *Inserts* führen.

⁹ Dies verhinderte eine Selbstligierung der Vektorenden und damit die Entstehung eines hohen „Vektorhintergrundes“, d. h. viele Klone mit Vektor, aber ohne *Insert*.

¹⁰ Die Dephosphorylierung der Vektorenden wurde erst unmittelbar vor der Ligation durchgeführt, da SIP als vollständig hitzeinaktivierbar galt und nachfolgende Reaktionen nicht stören sollte. Diese Methode erwies sich nach mehreren Versuchsreihen als die effizienteste.

2.1.2.2 Ligation von Vektor- und *Insert*-DNA

Für die Verbindung der kohäsiven, dephosphorylierten Enden des Vektors mit den genomischen DNA-Fragmenten wurde das Enzym T4-DNA-Ligase eingesetzt.

Um die Zahl der chimärischen Klone und der Klone, die nur Vektor, aber kein *Insert* enthalten, möglichst gering zu halten, wurde ein Verhältnis von Vektor:*Insert*-DNA von 10:1 eingesetzt.

Durchführung:

- Ansatz:

1 µl	Vektor-DNA (10 ng)
x µl	<i>Insert</i> -DNA (100 ng)
5 µl	10 x T4-DNA-Ligase-Reaktionspuffer
1 µl	T4-DNA-Ligase (5 U)
x µl	Wasser (auf 50 µl Endvolumen auffüllen)

- Mischen von Vektor-DNA, Wasser und *Insert*-DNA und Erhitzen auf 45°C für 5 Minuten¹¹
- nach Abkühlung auf Raumtemperatur Zugabe von Puffer und Enzym und Inkubation des Ansatzes für 16 Stunden bei 16°C
- Stoppen der Reaktion durch Erhitzen auf 65°C für 5 Minuten
- Auftropfen der Reaktion auf EntsalzungsfILTER (Millipore, VSWP02500) und Entsalzung gegen 0,5 x TE pH 8,0 für 2 Stunden bei 4°C¹²

2.1.2.3 Transformation von *E. coli* DH10B durch Elektroporation

Bei der Elektroporation werden die elektrokompenten Bakterienzellen (*Escherichia coli* DH10B, ElectroMax DH10B™ Cells, Gibco BRL, 18290-015) einem kurzen Hochspannungsimpuls ausgesetzt. Dadurch migriert die DNA in Richtung auf die Anode in die kompetenten Zellen.

Durchführung:

- Auftauen der elektrokompenten Zellen (von -80 °C) auf Eis
- Mischen von 30 µl Zellen mit 50 µl entsalzter Ligationsreaktion und Transferieren in eine Elektroporationsküvette (Eppendorf, 4307000.569) mit einem Elektrodenabstand von 1 mm

¹¹ Dies wurde durchgeführt, um eventuell schon aneinanderliegende, aber noch nicht verbundene Enden zu trennen.

¹² um bei der Elektroporation einen Spannungsüberschlag bedingt durch den hohen Ionengehalt im Ligasepuffer zu vermeiden

- Elektroporationsbedingungen (Easy-Ject Plus, Eurogentec):

Spannung:	1200 V/cm
Widerstand:	201 Ohm
Kapazität:	25 μ F
- Mischen der Zellsuspension in der Küvette mit 1 ml SOC-Medium und Transferieren in ein 15 ml Reaktionsgefäß, Inkubation des Transformationsansatzes für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln mit 200 rpm in einem Schüttelinkubator (*Orbital Incubator*, Sanyo, Gallenkamp)¹³.
- Ausstreichen von 10 μ l der Reaktion auf einem Nährboden mit 12,5 μ g Chloramphenicol (Boehringer Mannheim, 634433) pro ml Agar (Lennox L Agar, Gibco BRL, 22700-025), um Bakterien zu selektionieren, die den Vektor aufgenommen haben

2.2 Erstellung der BAC-Bank

Die erzeugten BAC-Klone lagen nach der Transformation in Form von Bakterien-suspensionen in SOC-Medium vor. Jede Suspension enthielt die BAC-Klone aus einer Ligationsreaktion und der darauffolgenden Transformation von 30 μ l elektrokompenten Zellen. Insgesamt wurden fünf Suspensionen hergestellt.

Die Anordnung der erzeugten BAC-Klone zu einer BAC-Bank wurde vom Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) in Berlin durchgeführt. Hier wurden die Bakterien zunächst durch das Ausstreichen auf Agarplatten vereinzelt. Der Agar enthielt Chloramphenicol, um auf Bakterien zu selektionieren, die während der Elektroporation den Vektor aufgenommen haben, und Sucrose, um auf Bakterien zu selektionieren, die BACs mit *Insert* enthalten. Die so erhaltenen Einzelkolonien wurden mittels robotergesteuerter Systeme in 384er Mikrotiterplatten übertragen. Die Mikrotiterplatten wurden „kopiert“ und beim RZPD in Form einer „Masterkopie“ und dreier weiterer „Arbeitskopien“ gelagert. Um die BAC-Bank für *Screening*-Experimente zugänglich zu machen, wurden *high density* Filter und *DNA-Pools* produziert (Einzelheiten hierzu auf der Internetseite des RZPD, URL 7).

2.3 Präparation von BAC-DNA

Die Präparation des BACs aus den Bakterien erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim et al. 1979). Gearbeitet wurde mit *Kits* der Firma Qiagen (Tab. 25A, Anhang), weitestgehend nach Angaben des Herstellers.

¹³ Dies ermöglichte es den Bakterien, die entstandenen Zellwandschäden zu reparieren und die durch den Vektor übertragene Chloramphenicol-Resistenz zu exprimieren.

2.3.1 Mini-Präparation

Die Mini-Präparation von BAC-DNA wurde für die Bestimmung der Insertgröße (zur Überprüfung der einzelnen Optimierungen und zur Charakterisierung der BAC-Klone) durchgeführt.

Durchführung:

- Ausstreichen der Bakterien aus dem vom RZPD gelieferten *Slab-Stock* auf Agar mit 12,5 µg Chloramphenicol pro ml Agar
- Inkubation des Nährbodens bei 37°C über Nacht
- Abnehmen einer Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher
- Überführung der Kolonie mit Zahnstocher in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 5 ml LB-Medium (Luria Broth Base, Gibco BRL, 12755-027) mit 12,5 µg Chloramphenicol pro ml Medium¹⁴
- Anzucht der Bakterien unter Schütteln für 14-16 Stunden bei 37 °C und 300 rpm im Schüttelinkubator
- Entfernen des Zahnstochers aus der Suspension
- Überführung von 1 ml Suspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß
- Pelletierung der Bakterien durch Zentrifugation: 2300 g, 4°C, 10 Minuten
- Überführung von 1 ml Suspension in dasselbe Reaktionsgefäß
- Pelletierung wie oben
- Alkalische Lyse nach den Angaben der Firma Qiagen:
 - Resuspendierung des Pellets in 300 µl P1 mit 300 µg Ribonuclease A (Sigma, R5503) pro ml P1
 - Lyse der Bakterien mit 300 µl P2 für 5 Minuten auf Raumtemperatur
 - Präzipitation von Proteinen und des Chromosoms von *E. coli* mit 300 µl P3
 - Zentrifugation: 14700 g, 4°C, 10 Minuten
- Gewinnung der zirkulären BAC-DNA aus dem Überstand durch Isopropanolfällung:
 - Überführung des Überstandes nach Zentrifugation in ein 2 ml Reaktionsgefäß
 - Zufügen von 720 µl Isopropanol
 - sofortiges Schwenken und Zentrifugation: 11200 g, 4 °C, 15 Minuten
 - Abgießen des Überstandes
 - Waschen des Pellets mit 150 µl 70 % EtOH
- Resuspendierung der BAC-DNA in 30 µl 1 x TE pH 8,0

¹⁴ der Zahnstocher verblieb während der Anzucht in der Bakterienkultur

2.3.2 Midi-Präparation

Die Midi-Präparation wurde im wesentlichen nach den Angaben des Herstellers mit dem Midipräparationskit (Tab. 25A, Anhang) durchgeführt.

Durchführung:

- Ausstreichen der Bakterien aus dem vom RZPD gelieferten *Slab-Stock* auf Agar mit 12,5 µg Chloramphenicol pro ml Agar
- Inkubation des Nährbodens bei 37°C über Nacht
- Abnehmen einer Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher
- Überführung der Kolonie mit Zahnstocher¹⁵ in einen 200 ml Erlenmeyerkolben mit 30 ml LB-Medium mit 12,5 µg Chloramphenicol pro ml Medium
- Anzucht der Bakterien unter Schütteln mit 300 rpm im Schüttelinkubator für 14-16 Stunden, bei 37 °C
- Übergießen der Bakteriensuspension ohne Zahnstocher in ein 50 ml Reaktionsgefäß
- Pelletierung der Bakterien durch Zentrifugation: 6000 g, 4°C, 15 Minuten
- Alkalische Lyse nach Angaben der Firma Qiagen:
 - Resuspendierung des Pellets in 4 ml P1 mit 100 µg Ribonuclease A pro ml Puffer
 - Lyse der Bakterien mit 4 ml P2 für 5 Minuten auf Raumtemperatur
 - Präzipitation von Proteinen und des Chromosoms von *E. coli* mit 4 ml P3, Inkubation auf Eis für 15 Minuten
 - Zentrifugation: 20000 g, 4°C, 30 Minuten
- Filtrierung des Überstandes durch einen angefeuchteten Faltenfilter (Schleicher & Schuell, 10311653)
- Aufreinigung des filtrierten Überstandes über Säulen aus dem verwendeten *Kit* nach den Angaben des Herstellers:
 - Equilibrierung der Säule mit 4 ml QBT-Puffer
 - Binden der DNA an die Säule
 - Waschen der DNA mit 2 mal 10 ml QC-Puffer
 - Elution der DNA mit 5 ml QF-Puffer (vorgewärmt auf 65°C)
- Isopropanolfällung und Waschen der BAC-DNA:
 - Zugabe von 3,5 ml Isopropanol zum Eluat
 - sofortiges Schwenken und Zentrifugation (Sorvall R RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, DuPont): 15000 g, 4 °C, 30 Minuten
 - Abgießen des Überstandes
 - Waschen des Pellets mit 2 ml 70 % EtOH
- Lösen der BAC-DNA in 30 µl 10 mM Tris pH 8,0

¹⁵ der Zahnstocher verblieb während der Anzucht in der Bakterienkultur

2.3.3 Maxi-Präparation

Zur Präparation größerer DNA-Mengen wurde das *Large-Construct Kit* der Firma Qiagen verwendet. Die Präparation wurde nach dem dem *Kit* (Tab. 25A, Anhang) beigelegten Protokoll durchgeführt.

Durchführung:

- Ausstreichen der Bakterien aus dem vom RZPD gelieferten *Slab-Stock* auf Agar mit 12,5 µg Chloramphenicol pro ml Agar
- Inkubation des Nährbodens bei 37 °C über Nacht
- Abnehmen einer Einzelkolonie mit einem sterilen Zahnstocher
- Überführung der Kolonie in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 1,2 ml LB-Medium mit 12,5 µg Chloramphenicol pro ml Medium durch „Abschütteln“ der Kolonie vom Zahnstocher
- Anzucht der Bakterien unter Schütteln mit 350 rpm im Inkubator für 7 Stunden bei 37 °C
- Animpfen von 2 x 250 ml LB-Medium mit 12,5 µg Chloramphenicol pro ml Medium mit 500 µl Bakteriensuspension und Inkubation der Kultur in 1 l Erlenmeyerkolben für 16 Stunden bei 37°C und 300 rpm im Schüttelinkubator
- Pelletierung durch Zentrifugation (Sorvall): 12500 g, 4°C, 15 Minuten
- Resuspendierung des Pellets in 20 ml P1¹⁶ mit 100 µg Ribonuclease A pro ml Puffer
- Lyse der Bakterien mit 20 ml P2 für 5 Minuten bei Raumtemperatur
- Präzipitierung von Proteinen und Bakterien-DNA mit 20 ml P3 für 10 Minuten auf Eis
- Gewinnung des BAC-DNA-haltigen Überstandes durch Zentrifugation (Sorvall): 138000 g, 4°C, 30 Minuten
- Filtrierung des Überstandes durch einen angefeuchteten Faltenfilter
- Fällung der BAC-DNA aus dem Überstand durch Zufügen von 36 ml Isopropanol und Zentrifugation (Hermle Z 513 K): 7000 g, 4°C, 1 Stunde
- Waschen des Pellets mit 5 ml 70 % EtOH
- Entfernen überschüssiger Flüssigkeit mit einem Tuch und Resuspendierung der BAC-DNA in 9,5 ml EX-Puffer
- Exonuclease-Verdau mit 200 µl ATP-abhängiger Exonuclease (aus dem *Kit*) und 300 µl 100 mM Adenosin-Triphosphat (ATP, Sigma A3377) für 1 Stunde bei 37°C
- Aufreinigung der BAC-DNA über Säulen (aus dem verwendeten *Kit*):
 - Equilibrierung der Säule mit 10 ml QBT-Puffer
 - Binden der mit 10 ml QS-Puffer versetzten DNA an die Säule
 - Waschen der DNA mit 2 mal 30 ml QC-Puffer
 - Elution der DNA mit 15 ml QF-Puffer (vorgewärmt auf 65°C)
- Isopropanolfällung und Waschen der BAC-DNA wie oben beschrieben
- Lösen des Pellets in 50 µl 10 mM Tris pH 8,0

¹⁶ Die Puffer P1, P2, P3, EX, QBT, QS, QC und QF stammten aus dem *Kit* der Firma Qiagen (Tab. 25A, Anhang)

2.3.4 Konzentrationsmessung von BAC-DNA

Die Konzentrationsmessung der BAC-DNA erfolgte mit einem Fluorometer (Hoefer®DyNA Quant®200, Amersham Pharmacia). Dabei bildete der in der Messlösung enthaltene Farbstoff (Bisbenzimid, Hoechst 33258 Dye) Komplexe mit der DNA. Diese Komplexe wurden von einer Quecksilberlampe durch einen Anregungsfilter mit Licht der Wellenlänge 365 nm angeregt. Ohne DNA lag die Wellenlänge des emittierten Lichts der Messlösung bei 492 nm. Dies verschob sich bei Anwesenheit von DNA zu 458 nm. Der Emissionsfilter vor dem Photodetektor ließ nur Wellenlängen von $460 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$ passieren, so dass die gemessene Fluoreszenz eine direkte Messgröße für die DNA-Konzentration darstellte.

2.4 Charakterisierung der erstellten BAC-Bank

Folgende Eigenschaften wurden untersucht:

1. durchschnittliche Insertgröße
2. Chimärismusgrad
3. Genomabdeckung

2.4.1 Ermittlung der durchschnittlichen Insertgröße

Es wurden 267 BAC-Klone untersucht, deren BAC zuvor mittels Mini-Präparation (2.3.1) isoliert wurde. Aus der BAC-DNA wurde die *Insert*-DNA durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *Not I* gewonnen. *Insert*-DNA und Vektor wurden mittels PFGE voneinander getrennt und auf diese Weise die Größe der *Inserts* ermittelt.

Durchführung:

- Ansatz:

1 μl	10 x Reaktionspuffer*
0,3 μl	<i>Not I</i> (3 U)
x μl	<i>Insert</i> -DNA (150 ng)
x μl	Wasser (auf 10 μl Endvolumen auffüllen)

*0,5 M Tris, 0,1 M MgCl_2 , 1 M NaCl, 0,2 % Triton X-100 (Serva, 37240)

- Mischen des Ansatzes in einer Mikrotiterplatte (Thermo-Fast®LP, ABgene®House, AB-0700)
- Durchführung des Verdau in einem Thermocycler (Tgradient, Biometra, 050-801) bei 37°C für 3 Stunden
- Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem 0,8 % igen Puls-Feld-Gel mit den Laufbedingungen:
1 x TAE, 10°C, Elektrodenwinkel 120°
für 2 Stunden: 0,5 V/cm, Anfangs – und Endswitchzeit 2 Sekunden
für 16 Stunden: 6 V/cm, Anfangsswitchzeit 10 Sekunden, Endswitchzeit 14 Sekunden

Als Größenstandards wurden die *MidRange PFG Marker I* und *II* der Firma New England Biolabs (N3551S, N3552S) verwendet.

2.4.2 Bestimmung des Anteils chimärischer Klone

Um den Anteil an chimärischen Klonen zu bestimmen, wurden die BACs von 35 zufällig aus der BAC-Bank ausgewählten Klonen durch Midi-Präparation (2.3.2) gewonnen und auf Metaphasechromosomen des Rindes hybridisiert (2.7).

2.4.3 Untersuchung der BAC-Bank auf die Genomabdeckung

Die Genomabdeckung der erstellten BAC-Bank wurde aus der Anzahl der BAC-Klone und der durchschnittlichen Insertlänge berechnet. Die praktische Ermittlung der Genomabdeckung erfolgte durch das Screenen von *high density* Filtern (2.5.2) und *DNA-Pools* (2.5.3) mit den Sonden der Loci für die physische Kartierung von BTA20. Die *high density* Filter wurden mit Sonden für 9 Loci und die *DNA-Pools* mit Sonden für 12 Loci gescreent.

2.5 Isolierung von BAC-Klonen für die Kartierung von BTA20

Für die Isolierung locuspezifischer BAC-Klone wurden zunächst DNA-Sonden hergestellt, deren Spezifität durch Sequenzierung und den Vergleich dieser Sequenzen mit öffentlichen Datenbanken (*GenBank*: URL 8) bestätigt wurde. Als Sonden für das Screenen der *DNA-Pools* wurden die entwickelten Primersysteme verwendet. Die Hybridisierung der *high density* Filter erfolgte mit den aus genomischer DNA amplifizierten Fragmenten.

2.5.1 Erstellung von locuspezifischen DNA-Sonden

2.5.1.1 Entwicklung von PCR-Primersystemen

Die Entwicklung der Primersysteme erfolgte basierend auf Sequenzen, die über eine Datenbankabfrage in *GenBank* und unter Verwendung von *BLAST* (Altschul et al. 1994, URL 9) identifiziert wurden. Wies die Datenbank für einen Locus keine bovine Sequenz auf, wurde humane Sequenz verwendet. Die Primer wurden bevorzugt innerhalb von Exonen platziert. Die angewendete Strategie ist in Abb. 6 dargestellt.

Das Primerdesign erfolgte mit dem Programm Primer3 des Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT Center for Genome Research, Massachusetts, USA (URL 10). Die Synthese der Primer wurde bei den Firmen Eurogentec (Seraing, Belgien), Metabion (Planegg-Martinsried, Deutschland) und Interactiva (Ulm, Deutschland) in Auftrag gegeben.

2.5.1.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA

In dieser Arbeit wurde die Methode der PCR zur Erzeugung von DNA-Sonden (2.5.1.2), für das Screenen der BAC-DNA-Pools (2.5.3), zur Überprüfung der Spezifität isolierter BAC-Klone (2.6.2), zur Genkartierung mittels *Radiation Hybrid Panel* (2.8) und zur Auffindung von *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs, 2.9) verwendet.

Zur Erzeugung locuspezifischer DNA-Sonden wurden Fragmente aus genomischer DNA amplifiziert. Es wurde bovine DNA und zusätzlich humane DNA für die Primer, die basierend auf humaner Sequenz entwickelt wurden (Tab. 28A, Anhang), verwendet.

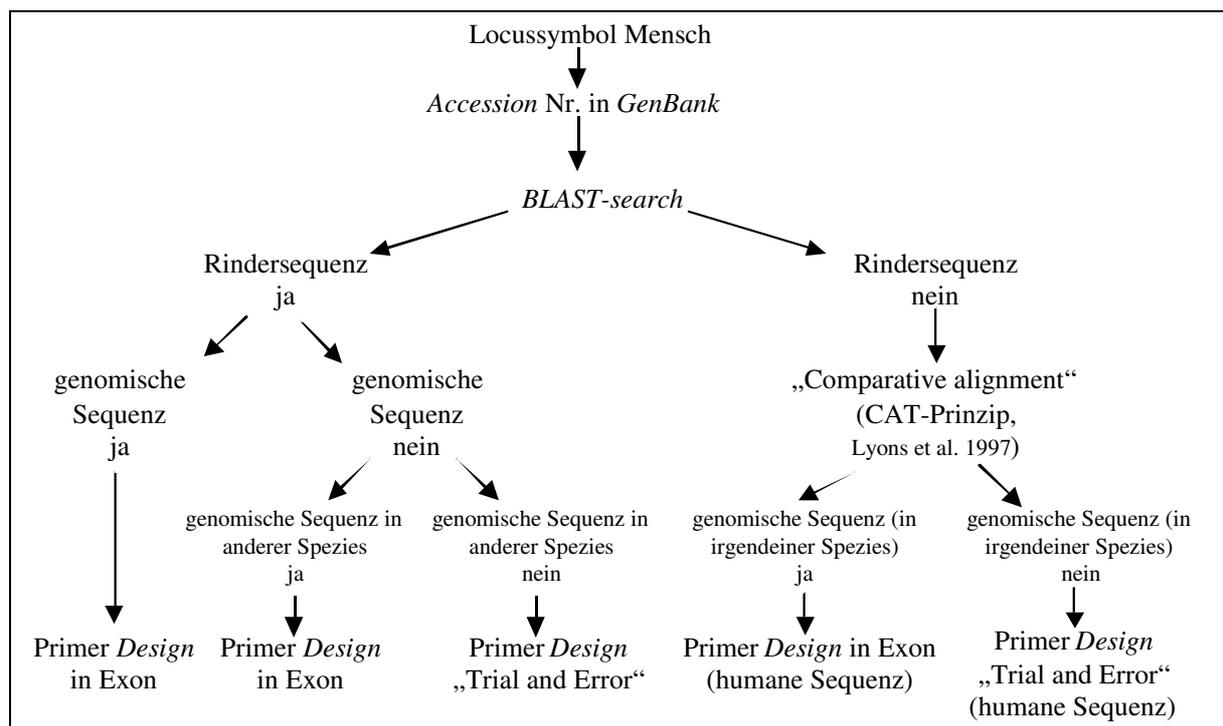


Abb.6: Strategie für die Erstellung von PCR-Primersystemen.

Durchführung:

- Ansatz:

1 µl	Primer 1 (10 pmol/µl)
1 µl	Primer 2 (10 pmol/µl)
2 µl	10 x Reaktionspuffer (aus dem PCR-Kit, Tab. 25A, Anhang)
1,2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2 µl	dNTP-Mischung
0,1 µl	Taq-DNA-Polymerase (0,5 U)
2 µl	DNA (25 ng/µl, bovin, human, Roche, 1691112)
10,7 µl	Wasser

- Amplifikation der Fragmente:

Zyklus:	initiale Denaturierung	95°C, 5 min	} 35 x
	Denaturierung	94°C, 1 min	
	Primeranlagerung	x°C ¹⁷ , 1 min	
	Polymerisation	72°C, 1 min	
	finale Polymerisation	72°C, 10 min	

- Kontrolle der entstandenen Produkte auf einem 2 % igen Agarosegel, als Marker wurde pUC19 DNA/*MspI* (*HpaII*) Marker (MBI Fermentas, SM0221) verwendet
- Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem *Qiaquick PCR Purification Kit* (Tab. 25A, Anhang) nach den Angaben des Herstellers

2.5.1.3 Sequenzierung der amplifizierten DNA-Fragmente

Es wurde die Methode des Kettenabbruchs nach Sanger et al. (1977) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden enzymatisch synthetisiert und mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden terminiert. Die so entstandenen DNA-Fragmente wurden in einem Sequenzierautomaten (ABI Prism™ 377 DNA Sequencer, Perkin Elmer Applied Biosystems) durch ein Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, die emittierten Wellenlängen der Fluorochrome mit einem Laser detektiert, die während des Gellaufs anfallenden Daten von einem Macintosh-Computer gesammelt und die Sequenz mit einem Computerprogramm (ABI Prism™ 377 Collection) erstellt.

Durchführung der Sequenzierung mit „BigDye™ Terminator Cycle Sequencing“ (Perkin Elmer Applied Biosystems, 4303153):

- Ansatz:

0,5 µl	Primer (5 pmol/µl)
4 µl	Ready Reaction Mix*
x µl	DNA (aufgereinigtes PCR-Produkt, Länge des Produktes in bp/20 = DNA-Menge in ng)
x µl	Wasser (auf 10 µl Endvolumen auffüllen)

*enthält die fluoreszenzmarkierten Abbruchnukleotide, dNTPs, Ampli Taq DNA Polymerase, MgCl₂, Reaktionspuffer

- Synthese der Abbruchfragmente:

initiale Denaturierung	96°C, 15 sek	} 24 x
Denaturierung	96°C, 10 sek	
Primeranlagerung	51°C, 5 sek	
Polymerisation	60°C, 4 min	

- Ethanol-Fällung der DNA-Fragmente und Aufnahme in 4 µl Formamid (Fluka, 47670) mit Dextranblau (Fluka, 31393)

¹⁷ Die Temperatur für die Primeranlagerung (Tab. 9, Ergebnisse) wurde durch Variation der Temperatur in jeder Spalte des Blocks des verwendeten Thermocyclers (Biometra Tgradient) ermittelt.

- 3 min Denaturierung bei 95°C, Auftragen von 1,6 µl auf das Polyacrylamidgel
- Zusammensetzung des Gels: 21 g Harnstoff (Gibco BRL, 15505-027), 8,4 ml 30 % Acrylamid (Rotiphorese®NF-Acrylamid/Bis Lösung 30 % (29:1), Roth, A124.1), 6 ml 10 x TBE, 20 ml Wasser (Roth, A511.2)
- Durchführung einer Datenbankabfrage (*BLAST*) mit der resultierenden Sequenz

2.5.2 Screenen von *high density* Filtern

Zur Isolierung von BAC-Klonen für die Kartierung von BTA20 wurden zwei BAC-Banken gescreent. Die BAC-Bank, deren Erstellung und Charakterisierung oben beschrieben wurde (2.1-2.4), hat beim RZPD die Nummer 754 und eine Kopie umfasst 3 Filter. Die zweite BAC-Bank, die verwendet wurde, wurde von Zhu et al. (1999) am Babraham Institute in Cambridge, UK, erstellt. Sie hat beim RZPD die Nr. 750 und eine Kopie umfasst 5 Filter. Die *high density* Filter beider Banken wurden vom RZPD bezogen. Den Aufbau eines solchen *high density* Filters zeigt Abb. 7.

2.5.2.1 Markierung der DNA-Sonde

Die Markierung der DNA-Sonde erfolgte mit dem *Kit* Megaprime™ DNA labelling Systems der Firma Amersham Pharmacia (Tab 25A, Anhang) nach Angaben des Herstellers. Dabei wird der als Sonde verwendete DNA-Doppelstrang enzymatisch synthetisiert, wobei das Nucleotid α dATP³² (deoxyadenosine 5' [α -³²P]-triphosphate, triethylammonium salt, Amersham Pharmacia, PB10164-250µCi) eingebaut wird.

Durchführung:

- Aufreinigung des DNA-Fragmentes und Einstellen der Konzentration auf 20 ng/µl
- Ansatz:

5 µl	10 x Puffer*
5 µl	Primermix (enthält alle möglichen Kombinationen von Hexanucleotiden)*
4 µl	dGTP*
4 µl	dCTP*
4 µl	dTTP*
5 µl	α dATP ³²
2 µl	Klenow-Fragment (2 U)*
2 µl	DNA-Sonde (40 ng)
19 µl	Wasser

* im *Kit* enthalten

- Denaturierung von DNA-Sonde, Primermix und Wasser für 5 Minuten bei 95°C
- Vervollständigung des Ansatzes
- Markierung der DNA-Sonde durch Inkubation des Ansatzes für 20 Minuten bei 37°C
- Stoppen der Reaktion durch Zufügen von 5 µl 0,2 M EDTA pH 8,0

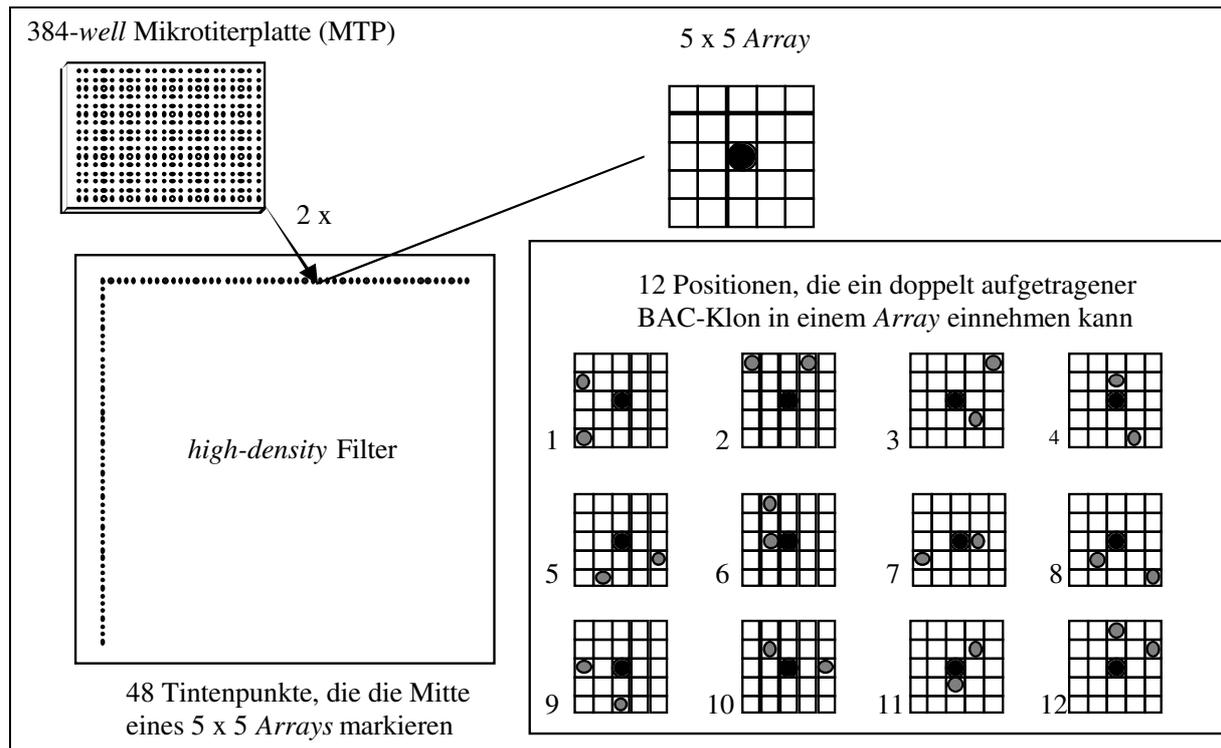


Abb.7: Aufbau eines *high density* Filters. Die Klone, die in 384 *well*- Mikrotiterplatten gelagert werden, werden 2 mal pro *Array* aufgetragen; jeder *Array* besteht aus 25 Feldern, auf das Feld in der Mitte wird ein Tintenpunkt aufgetragen, die verbleibenden 24 Felder werden mit BAC-Klonen belegt, dadurch ergeben sich 12 mögliche Hybridisierungsmuster für jeden BAC-Klon; auf jedem Filter befinden sich 2304 *Arrays*, die durch die Tintenpunkte in der Mitte sichtbar sind.

2.5.2.2 Überprüfung von Sondenmarkierung und Hybridisierung

Als Kontrolle wurde die unmarkierte Probe in Form einer Verdünnungsreihe auf eine Membran aufgetragen (in Abb. 8 als *Dot-Blot* bezeichnet) und diese zusammen mit den *high density* Filtern hybridisiert.

Durchführung:

- Einstellen der aufgereinigten DNA-Sonde auf eine Konzentration von 20 ng/μl und Herstellen einer „1:10-Verdünnungsreihe“ mit 5 Stufen (20 ng/μl, 2 ng/μl, 200 pg/μl, 20 pg/μl, 2 pg/μl)
- Auftragen von je 2 μl aller 5 Verdünnungsstufen auf eine mit 0,4 M NaOH (Roth, 6771.2) getränkte Hybond™-N+-Membran (Amersham Pharmacia, RPN203B), 5 min stehen lassen
- Membran 1 min in 5 x SSC schütteln
- zusammen mit den Filtern in einer Hybridisierungsröhre (Amersham Pharmacia, RPN 2518) weiterbehandeln (2.5.2.3)

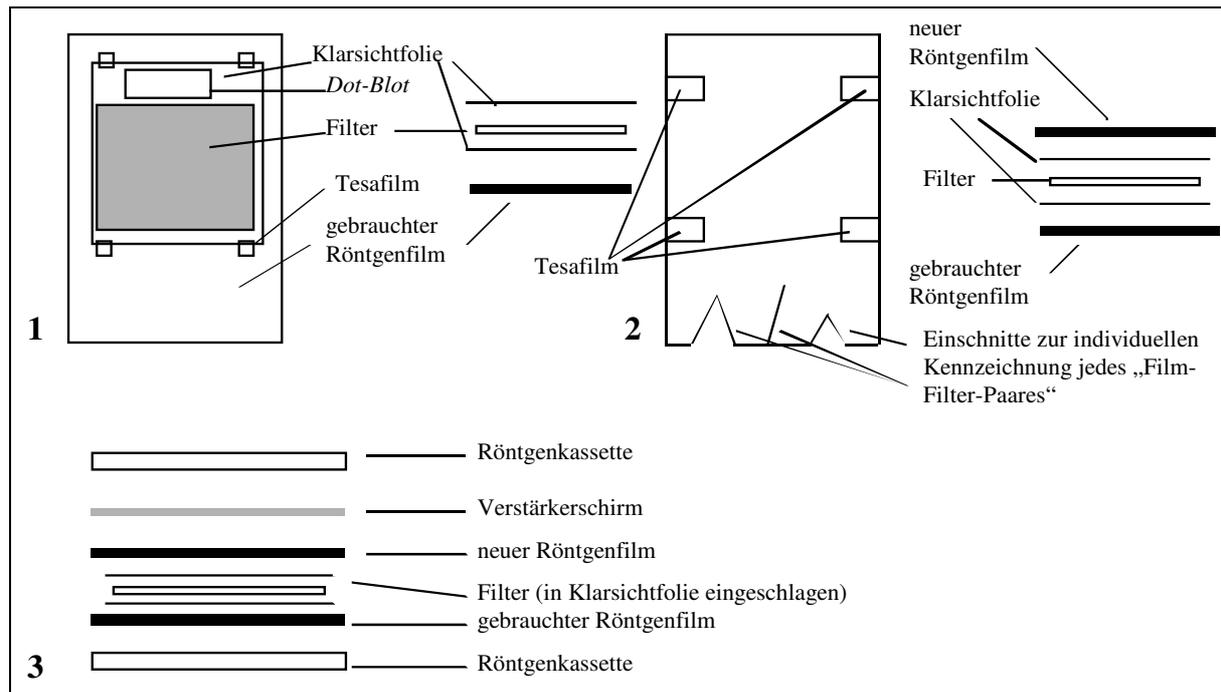


Abb.8: Versuchsanordnung für die Autoradiographie. 1: links: Ansicht des auf die Autoradiographie vorbereiteten, hybridisierten Filters (von oben); rechts: Seitenansicht. 2: links: Ansicht des Filters (von oben) mit aufgelegtem, neuem Röntgenfilm, mit Markierung durch Einschnitten; rechts: Seitenansicht. 3: Versuchsanordnung fertiggestellt für die Exposition.

2.5.2.5 Auswertung der Signale

Die Koordinaten der Doppelsignale auf den Filtern wurden an das RZPD geschickt, wo aus diesen Daten die Position des positiven BAC-Klons in den Mikrotiterplatten der BAC-Bank ermittelt, und das isolierte Bakterium in Form eines *Slab-stocks* geschickt wurde.

Durchführung:

- Feststellung der Lage des belichteten Röntgenfilms auf dem hybridisierten Filter durch exakte Ausrichtung der Einschnitte beider Röntgenfilme und Anzeichnen der Filterränder auf dem entwickelten neuen Röntgenfilm
- Bestimmung der Lage des 5 x 5 Arrays mit dem Doppelsignal, als X, Y- Koordinaten: wird ermittelt durch Auflegen des Films auf eine Schablone des RZPD
- Ermittlung der Lage des BAC-Klons in dem entsprechenden Array : 2 Paare von x' , y' - Koordinaten: Koordinaten beider Punkte des entsprechenden Hybridisierungsmusters (Abb. 7), das sich als Lage des Doppelpunktes zum Tintenpunkt in der Mitte des Arrays ergibt.

- Als Koordinaten, die an das RZPD geschickt werden, ergaben sich für jeden BAC-Klon:
- zwei x, y-Koordinaten, die nach folgender Formel ermittelt wurden:

$$x = 5 (X-1) + x'$$

$$y = 5 (Y-1) + y'$$

mit: $5 = 5 \times 5$ Array

X, Y = Koordinaten des Arrays auf dem Filter

x', y' = Koordinaten des jeweiligen Punktes im Array

x, y = Koordinaten des BAC-Klons, die an das RZPD geschickt wurden

- sowie die Filternummern und die Nummer der gescreenten BAC-Bank.

2.5.3 Screenen von BAC-DNA-Pools

Das Screenen der DNA-Pools erfolgte durch Amplifikation des locusspezifischen DNA-Fragmentes aus der Insert-DNA des BACs. Die An- oder Abwesenheit eines PCR-Produktes wurde auf einem Agarosegel überprüft.

Zunächst wurden die *Primary Pools* gescreent. In jedem *Primary Pool* war die BAC-DNA der Klone aus acht Mikrotiterplatten vereinigt (Abb. 9). Mit diesem Screenen wurde festgelegt, in welcher Einheit, bestehend aus acht Mikrotiterplatten sich der positive BAC-Klon befindet. Anschließend wurden die zugehörigen *Secondary Pools* gescreent. Jeder *Secondary Pool* umfasste 48 wells (Abb. 10). In acht wells war die BAC-DNA der Klone jeweils einer der acht Mikrotiterplatten vereinigt. In 24 wells befanden sich die Spaltenpools. In diesen war die BAC-DNA der Klone der gleichen Spalte aller acht Mikrotiterplatten vereinigt. In den verbleibenden 16 wells war die DNA der BAC-Klone der gleichen Reihe aller acht Mikrotiterplatten vereinigt. Durch das Screenen der *Secondary Pools* wurde somit festgelegt a) in welcher der acht Mikrotiterplatten sich der BAC-Klon befand (1. PCR-Produkt), b) in welcher Reihe (2. PCR-Produkt) und c) in welcher Spalte (3. PCR-Produkt), wobei die drei Koordinaten unabhängig voneinander ermittelt wurden.

Bei der Ermittlung von mehr als drei PCR-Produkten beim Screenen eines *Secondary Pools* wurden vom RZPD alle möglichen Signal-Kombinationen ermittelt und alle so identifizierten BAC-Klone geschickt.

Durchführung:

- Screenen der *Primary Pools*:
 - Aufnahmen der lyophilisiert in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gelieferten BAC-DNA in 5 µl Wasser
 - Verdünnung 1:50 in Wasser in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße
 - Abfüllen von je 1 µl BAC-DNA aus jedem Reaktionsgefäß in eine Mikrotiterplatte zur Durchführung der PCR

- Screenen der *Secondary Pools*:

- Aufnehmen der lyophilisiert in 96er Mikrotiterplatten gelieferten BAC-DNA in 50 μ l Wasser und Verdünnung 1:5 in Wasser in eine neue Mikrotiterplatte
- Abfüllen von je 5 μ l BAC-DNA aus jedem *well* in eine Mikrotiterplatte zur Durchführung der PCR

- Amplifikation der locuspezifischen DNA-Fragmente aus den *Inserts* der positiven BAC-Klone und Nachweis der PCR-Produkte auf einem 2 % igen Agarosegel

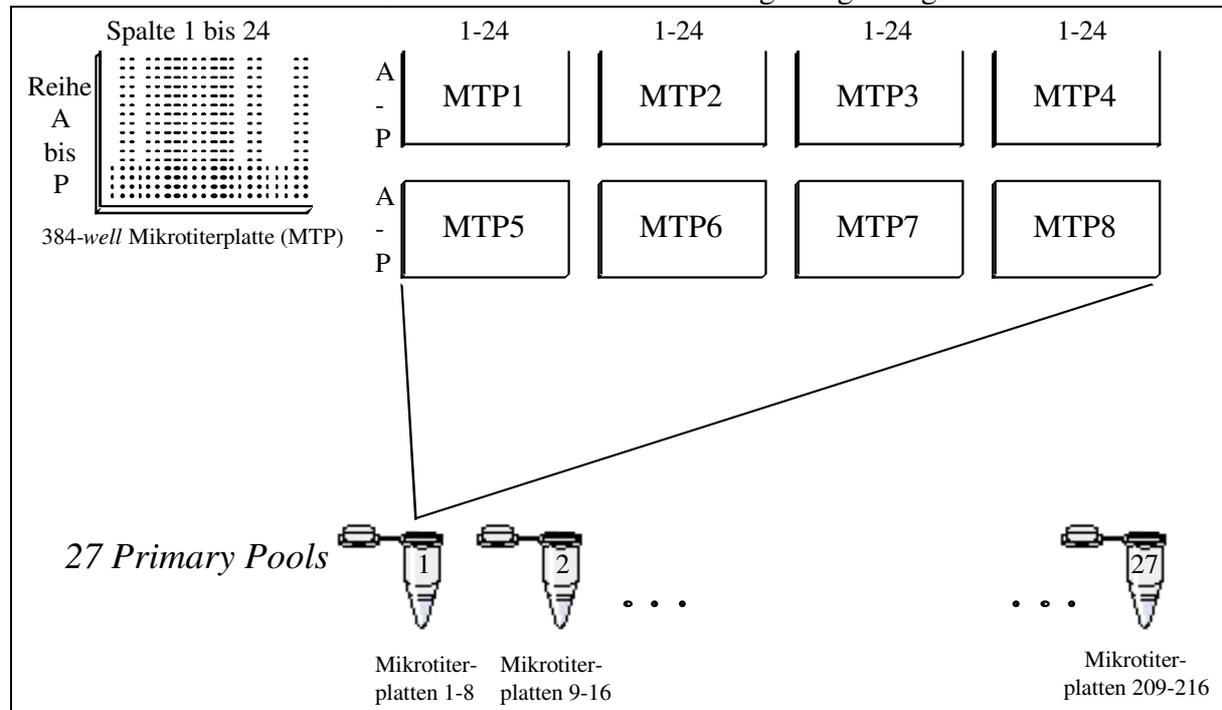


Abb.9: Strategie des DNA-Poolens für die *Primary Pools* (dargestellt für die erstellte BAC-Bank, die 216 Mikrotiterplatten umfasst). Jeder *Primary Pool* enthält die BAC-DNA der Klone aus je 8 Mikrotiterplatten.

- Ansatz:

1 μ l	Primer 1 (10 pmol/ μ l)
1 μ l	Primer 2 (10 pmol/ μ l)
2 μ l	10 x Reaktionspuffer (aus dem PCR-Kit, Tab. 25A, Anhang)
1,2 μ l	MgCl ₂ (25 mM)
2 μ l	dNTP-Mischung
0,1 μ l	Taq-DNA-Polymerase (0,5 U)
1* bzw. 5** μ l	BAC-DNA
x μ l	Wasser

*für das Screenen der *Primary Pools*, **für das Screenen der *Secondary Pools*

- Für die Amplifikation der DNA wurde der unter 2.5.1.2 beschriebene Zyklus verwendet.
- Bestellen der Klone über das im Internet verfügbare Formblatt des RZPD unter Angabe von Nummer und Art der gescreenten BAC-Bank, des positiven *Primary Pools*, sowie positiver Mikrotiterplatte, Reihe und Spalte, ermittelt nach dem mit den jeweiligen *Secondary Pools* mitgelieferten Formblatt (zeigt die genaue Belegung der 96er Mikrotiterplatte mit den *Secondary Pools* durch das RZPD)

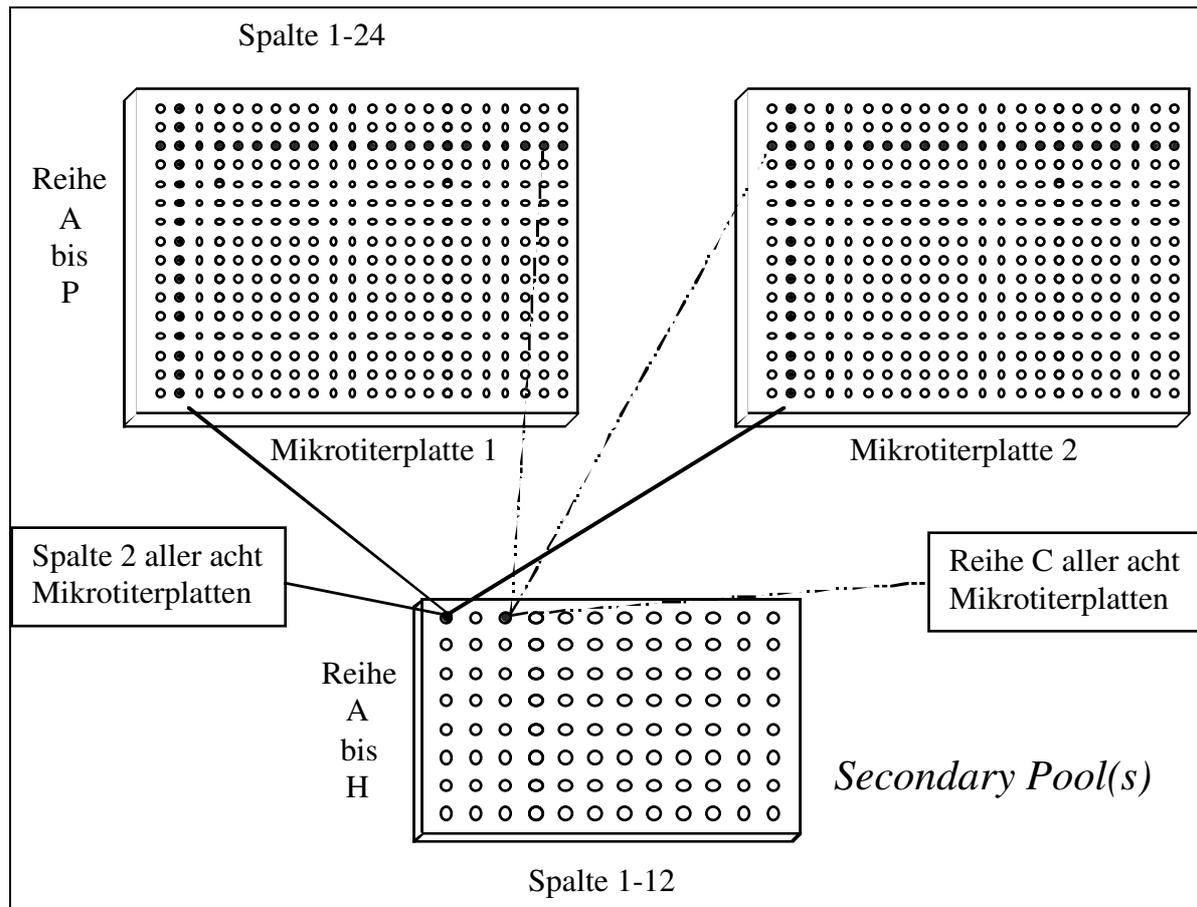


Abb.10: Strategie des DNA-Poolens für die *Secondary Pools* (dargestellt sind nur zwei von acht Mikrotiterplatten). Jeder *Secondary Pool* umfasst 48 *wells* einer Mikrotiterplatte: in 8 *wells* ist die BAC-DNA der Klone aus je einer Mikrotiterplatte des *Primary Pools* enthalten; in 16 *wells* ist die BAC-DNA der Klone aus der gleichen Reihe aller 8 Mikrotiterplatten enthalten; in den verbleibenden 24 *wells* ist die BAC-DNA der Klone aus der gleichen Spalte aller 8 Mikrotiterplatten enthalten.

2.6 Überprüfung und Charakterisierung der isolierten BAC-Klone

2.6.1 Ermittlung der Insertgröße

Die Bestimmung der Insertgröße wurde für 28 positive BAC-Klone wie unter 2.4.1 beschrieben durchgeführt.

2.6.2 Überprüfung der Spezifität der isolierten Klone

Die Spezifität eines BAC-Klons wurde durch Amplifikation des locusspezifischen DNA-Fragmentes, das zur Identifizierung dieses Klons verwendet wurde, aus dem *Insert* überprüft. Als Templat für die PCR diente die Suspension einer Kolonie des zu prüfenden BAC-Klons. Als Primer wurden diejenigen verwendet, mit denen die DNA-Pools gescreent wurden, um diesen BAC-Klon zu identifizieren, bzw. mit denen die entsprechende DNA-Sonde für das Screenen der *high density* Filter hergestellt wurde. Zur Kontrolle wurde und ein mit einer an-

deren Sonde isolierter Klon aus derselben BAC-Bank verwendet, um PCR-Produkte, die durch Binden der Primer an den Vektor oder Bakterien-DNA entstehen können, von dem erwarteten Amplifikat unterscheiden zu können.

Durchführung:

- Suspendierung einer Einzelkolonie des zu prüfenden bzw. des „Kontroll“-Klons in 50 μ l Wasser in einer Mikrotiterplatte
- Überschichtung der Suspension mit 2 Tropfen Mineralöl (Sigma M-5904) und Abdecken der Mikrotiterplatte mit *Microseal* (*Microseal*TM ‘A’ Film, MJ Research, MSA-5001): Kochen der Suspension für 1 Minute bei 99°C. Die so behandelte Suspension diente als Template für die Kolonie-PCR und wurde bei -20°C aufbewahrt.
- Ansatz:

1 μ l	Primer 1 (10 pmol/ μ l)
1 μ l	Primer 2 (10 pmol/ μ l)
2 μ l	10 x Reaktionspuffer (aus dem PCR-Kit, Tab. 25A, Anhang)
1,2 μ l	MgCl ₂ (25 mM)
2 μ l	dNTP-Mischung
0,1 μ l	Taq-DNA-Polymerase (0,5 U)
6 μ l	DNA (gekochte Suspension)
7,7 μ l	Wasser
- Verwendet wurde der Zyklus wie unter 2.5.1.2 beschrieben
- Die PCR-Produkte wurden auf einem 2 % igen Agarosegel analysiert und anschließend aufgereinigt und sequenziert (2.5.1.3). Der Vergleich mit Sequenzen in *GenBank* wurde mittels *BLAST* durchgeführt.

2.6.3 Überprüfung der BAC-Klone auf Identität

Die Identität der *Insert*-DNA unterschiedlicher BAC-Klone wurde durch den Vergleich von Bandenmustern, die durch den Verdau der *Insert*-DNA mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* entstehen, getestet.

Durchführung:

- Ansatz:

x μ l	BAC-DNA (250 ng)
0,3 μ l	<i>EcoRI</i> (3 U), bzw. <i>HindIII</i> (3 U)
2 μ l	10 x Reaktionspuffer
x μ l	Wasser (auf 10 μ l Endvolumen auffüllen)
- Inkubation des Ansatzes bei 37°C für 3 Stunden
- Auftrennen der DNA-Fragmente auf einem Agarosegel: 1 % Agarose, 1 x TAE, 4,5 V/cm, 3,5 Stunden, als Marker wurden pUC19DNA/*MspI*(*HpaII*) Marker, 23 (New England Biolabs, SM0221), GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, SM0311) und Lambda DNA /*Eco130I*(*Sty I*) Marker, 16 (New England Biolabs, SM0161) verwendet.

2.7 Physische Kartierung von BAC-Klonen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Mit einem Hapten (Biotin bzw. Digoxigenin) markierte BAC-DNA wurde auf gespreitete Metaphasechromosomen des Rindes hybridisiert, wo der Ort der Hybridisierung mittels an die Haptene bindende Antikörper, an die ihrerseits Fluorochrome (Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Cy3) gebunden sind, durch Anregung der Fluorochrome mit UV-Licht unter dem Mikroskop detektiert wurde.

Um die Lage zweier BAC-Klone auf BTA20 zueinander zu ermitteln, wurde Zwei-Farben-FISH verwendet. Die BAC-DNA eines der Klone wurde mit Biotin markiert, die DNA des zweiten BAC-Klons mit Digoxigenin. Die beiden BAC-Klone wurden in derselben Hybridisierungslösung hybridisiert und mit den Fluorochromen FITC und Cy3 detektiert.

2.7.1 Gewinnung von Metaphasechromosomen aus Kulturen boviner Fibroblasten

Zur Gewinnung von Metaphasechromosomen wurden zwei bovine Fibroblastenzelllinien verwendet. Die Zelllinie Bt12 weist einen normalen bovinen Karyotypen mit 58 Autosomen und den Geschlechtschromosomen BTax und BTay auf. Die Zelllinie Bt14/20 zeigt eine Zentromerfusion der Autosomen BTA14 und BTA20 eines haploiden Chromosomensatzes (Joerg et al. 2001, Abb. 18 S. 70A, Ergebnisse), womit sich ein Karyotyp von 57 Autosomen und den Geschlechtschromosomen BTax und BTay ergibt. Diese Zelllinie wurde von einem Bullen der Rasse Simmental gewonnen und von G. Stranzinger, Zürich, Schweiz zur Verfügung gestellt.

Die Fibroblasten wurden in komplementiertem Dulbeccos Minimum Essential Medium (DMEM) bei 37°C kultiviert. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte durch Hinzufügen von 3,7 g NaHCO₃ (Merck, 106329) pro Liter Medium und Begasung der Zellkulturen mit 5 % CO₂ in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, BL 5060 EK/CO₂). Bei 75 %iger Oberflächenbedeckung der Kulturflasche (Grundfläche 75 cm², Becton Dickinson, 353110) wurden die Zellen subkultiviert. Eine Präparation von Metaphasechromosomen wurde vorgenommen, wenn unter dem Mikroskop eine mitotische Welle zu beobachten war, d. h. die Anzahl mitotischer (runder) Zellen einen Höhepunkt erreichte.

2.7.2 Präparation von Metaphasechromosomen

Durchführung:

- Abpumpen des Mediums aus der Zellkulturflasche mit einer Vakuumpumpe und einer sterilen Pasteurpipette
- Verteilen von 2 ml 50 mM KCl (37°C, Merck, 104936) auf dem Boden der Kulturflasche und Überführung der so gewonnenen, mit mitotischen Zellen angereicherten, Suspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß

- hypotone Behandlung der Zellen durch 13 minütige Inkubation bei 37°C und Gewinnung des Zellpellets durch Zentrifugation (Heraeus Christ Labofuge G1, Heraeus 2202): 220 g, 8 Minuten
- Fixierung der Chromosomen durch Zugabe von Fixierlösung (Methanol (Merck, 1.06009) und Eisessig (Fisher Scientific, A/0400/PB17) im Verhältnis 4:1)
- Gewinnung des Zellpellets durch Zentrifugation: 220 g, 8 Minuten
- Waschen der Chromosomen mit Fixierlösung
- Auftropfen von ca. 20 µl Suspension auf mit 100 % EtOH gewaschene Objektträger (Menzel-Gläser, 021102)

Objektträger mit fixierten Metaphasechromosomen wurden mit Kieselgel (Merck, 1.01925) bei -20°C aufbewahrt.

2.7.3 Markierung der BAC-DNA mittels *Nick*-Translation

Die Markierung der BAC-DNA erfolgte mit den Haptenen Biotin und Digoxigenin durch *Nick*-Translation (Rigby et al. 1977). Für die Markierung mit Biotin wurde ein *Kit* verwendet (Tab. 25A, Anhang). Die Markierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Durchführung der Markierung mit Digoxigenin-dUTP (Digoxigenin-11-2'-deoxy-uridine-5'-triphosphate, Roche, 1093088):

- Ansatz:

x µl	BAC-DNA (1 µg)
5 µl	Enzym-Mix*
5 µl	10 x <i>Nick</i> -Translations-Puffer
5 µl	dNTP-Mischung**
5 µl	0,1 M Mercaptoethanol (Merck, 115433)
1 µl	Digoxigenin-dUTP
x µl	Wasser (auf 50 µl Endvolumen auffüllen)

*aus dem *Kit* BioNick™ Labeling System (Tab. 25A, Anhang), das für die Markierung der Proben mit Biotin verwendet wurde

**Zusammensetzung: 0,5 mM dGTP, dCTP und dATP, 0,12 mM dTTP

- Inkubation des Ansatzes für 1 Stunde bei 16°C
- Kontrolle der Größe der DNA-Fragmente auf einem 2 % igen Agarosegel
- Wenn die DNA-Fragmente eine Größe von ca. 150 bis 500 bp aufwiesen, wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Stoppuffer (aus dem Markierungskit) gestoppt.

2.7.4 Ansatz der Hybridisierungslösung

Für die Hybridisierung wurde die Methode der *chromosomal in situ suppression* (CISS, Lichter et al. 1990) verwendet. Für diesen Zweck wurde unmarkierte, gescherte, bovine DNA (*Competitor*) im Überschuss zugegeben, um repetitive Sequenzen zu blockieren und so die unspezifische Hybridisierung der markierten Probe an repetitive DNA zu verhindern. Unspe-

zifische Bindungsstellen wurden durch die Zugabe von *Salmon Sperm* DNA (Sigma, D-9156) blockiert.

Durchführung:

- Ansatz für die Hybridisierung einzelner Proben:

50 µl BAC-DNA (1 µg), markiert mit Biotin
 1 µl *Salmon Sperm* DNA (10 µg)
 10 µl bovine DNA (*Competitor*, 10 µg)
 160 µl 100 % EtOH

- Ansatz für Zwei-Farben-FISH:

25 µl Probe 1 (500 ng), BAC-DNA markiert mit Biotin
 25 µl Probe 2 (500 ng), BAC-DNA markiert mit Digoxigenin
 1 µl *Salmon Sperm* DNA (10 µg)
 10 µl bovine DNA (*Competitor*, 10 µg)
 160 µl 100 % EtOH

- Stehenlassen des Ansatzes bei -20°C für 30 Minuten
- Zentrifugation: 14700 g, Raumtemperatur, 30 Minuten
- Waschen des Pellets mit 150 µl 70 % EtOH
- Aufnehmen des Hybridisierungsansatzes in 10 µl Hybridisierungsmischung (im Folgenden als Hybridisierungslösung bezeichnet) und Lösenlassen bei 37°C für 30 Minuten

2.7.5 Hybridisierung und Signaldetektion

Durchführung:

- Denaturierung der Probe durch Inkubation der Hybridisierungslösung für 5 Minuten bei 75°C
- Wiederanlagerung der repetitiven Sequenzen durch Inkubation der Hybridisierungslösung bei 37°C für 30 Minuten
- Denaturierung der Metaphasechromosomen für 1,5 Minuten bei 71°C in 70 % Formamid, 2 x SSC
- Dehydrierung der Chromosomen mittels Alkoholserie:

70 % EtOH (eiskalt)	2 Minuten, 1 mal
90 % EtOH (Raumtemperatur)	2 Minuten, 1 mal
99 % EtOH (Raumtemperatur)	2 Minuten, 2 mal
- Auftragen der Proben, Abdecken mit einem 18 x 18 mm Deckglas und Versiegeln mit fix-o-gum (Marabu)
- Hybridisierung von Proben und Chromosomen bei 37°C für 16 Stunden
- Nach der Hybridisierung wurde das inzwischen verhärtete fix-o-gum mit einer Pinzette entfernt und die Deckgläser in 2 x SSC auf Raumtemperatur abgewaschen.
- Waschen der Objektträger:

2 x SSC (37°C)	5 Minuten, 2 mal
0,1 x SSC (62°C)	5 Minuten, 2 mal
2 x SSC (37°C)	5 Minuten, 2 mal
2 x SSC + 0,05 % Tween 20 (37°C)	5 Minuten, 1 mal

- Bedecken der Objektträger mit 150 µl Antikörpermischung 1 (Tab. 2) und Abdecken mit Parafilm (American National Can™)
- Inkubation bei 37°C für 20 Minuten
- Waschen zwischen den Inkubationsschritten (entfällt bei Hybridisierung von Einzelproben):
2 x SSC + 0,05 % Tween 20 (37°C) 2 Minuten, 3 mal
- Der zweite Inkubationsschritt erfolgte bei Zwei-Farben-FISH wie oben beschrieben mit Antikörpermischung 2 (Tab. 2)
- Waschen:
2 x SSC + 0,05 % Tween 20 (37°C) 2 Minuten, 2 mal
2 x SSC (Raumtemperatur) 2 Minuten, 1 mal
- Gegenfärbung der Chromosomen mit DAPI (3 mg pro ml 2 x SSC, 4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid, Boehringer Mannheim, 236276) für 3,5 Minuten
- Trocknenlassen der Objektträger im Dunkeln
- Abdecken der Objektträger mit Vectashield® Mounting Medium (Vector Laboratories, H-1000) und einem 24 mm x 60 mm Deckglas, Versiegeln des Deckglases mit Nagellack

Tab.2: Antikörpermischungen für die Signaldetektion

	Antikörpermischung 1 ^{1/2}	Antikörpermischung 2 ^{1/2}
Hybridisierung von Einzelproben ³	Avidin-FITC, Verdünnung 1:200	
Zwei-Farben-FISH ⁴	Streptavidin-Cy3™, Verdünnung 1:1000 + Mouse-anti-Digoxigenin, Verdünnung 1:200	Sheep-anti-Mouse-FITC, Verdünnung 1:500

¹Bezugsquelle für Antikörper s. Tab. 26A, Anhang

²die Verdünnung wurde in 2 x SSC durchgeführt

³die Detektion von Biotin wurde mit FITC durchgeführt

⁴die Detektion von Biotin wurde mit Cy3 durchgeführt, die von Digoxigenin mit FITC

2.7.6 Mikroskopie und digitale Bildverarbeitung

Zweidimensionale Fluoreszenzbilder wurden mit dem Zeiss Axioplan mit fünffach Filterrad (verwendete Filtersätze s. Tab. 3), Zeiss, Oberkochen aufgenommen. Die Anregung der Fluorochrome wurde mit einer 50 Watt Quecksilberdampfampe vorgenommen. Die Fotografie der Bilder wurde mit einem 63 x Plan-Apochromat Ölimmersionsobjektiv und einer CCD-Kamera, PXL (KAF 1400), Photometrics, die mit einer Mischung aus destilliertem Wasser mit 25-50 % Ethylenglycol gekühlt wurde und eine Auflösung von 1317 x 1035 Pixel hat, durchgeführt. Kamerasteuerung und Bildaufnahme erfolgten mit einem Macintosh-Computer mit der Software IPLab, Scanalytics Inc., Fairfax, USA.

Tab.3: Filtersätze für die Fluoreszenzmikroskopie

Fluorochrom	Absorptions- maximum [nm]	Emissions- maximum [nm]	Excitations- filter [nm]	Strahlen- teiler [nm]	Emissions- filter [nm]
Cy3	554	568	Bandpass 546	FT580	Langpass 590
DAPI	358	461	Bandpass 365	FT395	Langpass 397
FITC	490	520	Bandpass 450-490	FT510	Langpass 515
Quinacrin mustard	455	495	Bandpass 395-440	FT460	Langpass 470

Die Einzelkanalbilder der Zwei-Farben-FISH-Experimente wurden mit dem Programm Adobe Photoshop® unter Zuweisung von Falschfarben übereinandergelegt und im TIFF-Format abgespeichert.

2.7.7 Auswertung

2.7.7.1 Chromosomenidentifikation

Die Identifikation der Chromosomen für die Kartierung der BAC-Klone zur Charakterisierung der erstellten BAC-Bank erfolgte aufgrund des Bandenmusters der einzelnen Chromosomen, wie es sich durch die Färbung mit Quinacrin mustard darstellt (Abb. 18 S. 70A, Ergebnisse) und den Vergleich mit dem standardisierten Karyotypen des Rindes, nach dem „International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals“ (ISCNDA, Di Bernardino et al. 1990), und der 1995 von Unklarheiten bereinigten Form, die auch „Texas Standard“ genannt wird (Popescu et al. 1996), sowie der neuesten Fassung von Cribsu et al. (2001).

Durchführung:

- Eintauchen des Objektträgers für 15 Sekunden in eine 0,005 % ige Lösung von Quinacrin mustard (Sigma Q2876) in 2 x SSC
- Bedecken des Objektträgers mit 70 µl Söhrensens Puffer und Abdecken mit einem Deckglas (24 x 60 mm)
- Fotografieren gut gespreiteter Metaphasen, dabei Festhalten der Lage der jeweiligen Metaphase als x,y-Koordinaten der Lage des Objektträgers auf dem Objektisch
- Abwaschen der Deckgläser unter fließendem deionisiertem Wasser und Eintauchen der Objektträger in Xylol (Merck, 108681), um eventuelle Reste von Mikroskopieröl zu entfernen („Weiterverarbeitung“ der Objektträger wie unter 2.7.5 beschrieben)

2.7.7.2 Bestimmung der Signalposition

Bei einzelner Hybridisierung der BAC-Klone erfolgte die Angabe der Signalposition als *fractional length centromer* (FLcen, 1.2.2). Dieser Wert wurde durch Vermessen der Chromosomen mit dem Programm NIH Image, National Institutes of Health, Washington, USA, und anschließender Verrechnung der Werte mit einem Excel-Programm ermittelt. Die Zuweisung auf Chromosomenbänder folgte der Nomenklatur des Rindes (Di Berardino et al. 1990, Popescu et al. 1996). Da mehrere Chromosomen nach der Hybridisierung jeder Probe gemessen wurden, ergab sich für den FLcen-Wert ein Mittelwert \pm Standardabweichung. Der so ermittelte Bereich der Signalposition auf dem Chromosom wird in dieser Arbeit als Balken neben dem Idiogramm dargestellt.

Die Bestimmung der Signalpositionen bei Zwei-Farben-FISH erfolgte durch Überlagerung der Einzelbilder mit der Software Adobe Photoshop® unter Zuweisung von Falschfarben und Ermittlung der Reihenfolge der Signale relativ zum Zentromer. Dabei wurden folgende Kategorien für jedes Signalpaar gebildet:

- Reihenfolge 1: häufiger beobachtete Reihenfolge
- Reihenfolge 2: umgekehrte Reihenfolge
- Überlappung: keine eindeutige Reihenfolge feststellbar

2.7.7.3 Auswertung der Anordnung der BAC-Klone

Die Auswertung der Anordnung der BAC-Klone auf BTA20 relativ zueinander wurde basierend auf der von Guo und Flejter (1996) verwendeten Methode vorgenommen. Dafür wurde ein Fortran 90 Programm (Thaller 2001, nicht veröffentlicht) geschrieben.

Es wurden alle möglichen Anordnungen von 11 Loci und deren Wahrscheinlichkeiten ermittelt. Die Loci *BMS521* und *SDHA* wurden nicht berücksichtigt, um die Anzahl möglicher Anordnungen ($11! = 39.916.800$) in einem für das Programm handhabbaren Rahmen zu halten. Ein Datensatz bestand aus:

- den beiden hybridisierten Loci (kodiert mit Zahlen)
- der beobachteten Anzahl der beiden möglichen Reihenfolgen

Überlappungen wurden nicht berücksichtigt. Diese liefern nach Guo und Flejter (1996) keine Information über die Reihenfolge der Loci.

2.8 „Radiation Hybrid Panel“-Kartierung von BTA20

Die Kartierung von 7 Loci erfolgte über Amplifikation der DNA-Fragmente des, in der Wirtszelle enthaltenen, Chromosomenfragmentes des bovinen Genoms.

Gescreent wurde der *Radiation Hybrid Panel* BOVRH5 der an der Texas A & M University, Texas, USA, von Womack und Mitarbeitern erstellt und zur Verfügung gestellt wurde (Womack et al. 1997).

Durchführung:

- Einstellung der Konzentration der in 1 ml Reaktionsgefäßen gelieferten DNA auf 50 ng/µl
- Aliquotieren von je 1 µl DNA aus jedem Reaktionsgefäß in 96er Mikrotiterplatten
- Kontroll-PCR mit der Hamster-DNA des *Panels*, um Primersysteme auszuschließen, die PCR-Produkte liefern, die von Produkten aus boviner DNA nicht zu unterscheiden sind
- PCR mit der DNA des Radiation Hybrid Panels
- Ansatz:

1 µl	Primer 1 (10 pmol/µl)
1 µl	Primer 2 (10 pmol/µl)
2 µl	10 x Reaktionspuffer (aus dem PCR-Kit, Tab. 25A, Anhang)
1,2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2 µl	dNTP-Mischung
0,1 µl	Taq-DNA-Polymerase (0,5 U)
1 µl	DNA
11,7 µl	Wasser
- Verwendet wurde der unter 2.5.1.2 beschriebene Zyklus.
- Analyse der PCR-Produkte auf einem 2 % igen Agarosegel: 1 x TAE, 5 V/cm, 40 Minuten

Jede PCR wurde zweimal durchgeführt. Bei Diskrepanzen wurde die fragliche Reaktion ein drittesmal wiederholt, wobei dieses Ergebnis ausschlaggebend war. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte an der Texas A & M University. Die Daten wurden in Form einer Excel-Tabelle über email geschickt. Angegeben wurde der Name des Markers, bzw. Gens, mit dem der *Panel* gescreent wurde und die Nr. der Reaktionsgefäße, deren DNA für die PCR verwendet wurde. Das Ergebnis der PCR wurde kodiert als:

0 = kein PCR-Produkt

1 = PCR-Produkt

2 = Ergebnis der PCR auch nach Wiederholung zweifelhaft

Unter Verwendung des Programms RHMAP 3.0 wurden die Loci kartiert und in die publizierte Karte von BTA20 (Band et al. 2000) eingefügt.

2.9 Untersuchung von vier Kandidatengenen auf *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs)

2.9.1 Sequenzierung eines Testpanels

SNPs wurden durch Vergleich der Sequenzen von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Tiere verschiedener Rassen aufgefunden. Die DNA dieser Tiere wurde in Form eines Testpanels

zusammengestellt. Die Sequenzierung erfolgte wie unter 2.5.1.3 beschrieben. Die Zusammensetzung des Testpanels ist in Tab. 4 dargestellt.

Tab.4: Zusammensetzung des Testpanels zum Auffinden von SNPs

Proben-Bezeichnung	Rasse
FV19	Fleckvieh (<i>Bos taurus taurus</i>)
FV27	Fleckvieh (<i>Bos taurus taurus</i>)
FV28	Fleckvieh (<i>Bos taurus taurus</i>)
SB26	Schwarzbunt (<i>Bos taurus taurus</i>)
SB37	Schwarzbunt (<i>Bos taurus taurus</i>)
SB45	Schwarzbunt (<i>Bos taurus taurus</i>)
Sbpool ¹	Schwarzbunt (<i>Bos taurus taurus</i>)
Angus1	Angus (<i>Bos taurus taurus</i>)
Kerry2	Kerry (<i>Bos taurus taurus</i>)
Sahiwal4	Sahiwal (<i>Bos taurus indicus</i>)
Hariana8	Hariana (<i>Bos taurus indicus</i>)

¹der *Pool* besteht aus der DNA (gleiche Konzentration) von 10 Tieren der Rasse Schwarzbunt

2.9.2 Identifikation der SNPs

Die Identifikation und Lokalisierung der Basenaustausche erfolgte durch Auswertung der Sequenzen mit der Programmsuite Phred (Ewing et al. 1998), Phrap, Polyphred (Nickerson et al. 1997) und Consed (Gordon et al. 1998).

3 Ergebnisse

3.1 Erstellung der BAC-Bank

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellte bovine BAC-Bank (2.1 – 2.4) wurden 5 Ligationsansätze in 5 Transformationen verwendet (2.1.2.2., 2.1.2.3). Aus diesen Transformationsansätzen resultierten etwa 114000 BAC-Klone, 46000 BAC-Klone in Teil 1 der BAC-Bank und 68000 in Teil 2 (Tab. 5). Von diesen Klonen wurden für den ersten Teil der BAC-Bank vom Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) in Berlin 42624 Klone verwendet und für den zweiten Teil 40320 BAC-Klone. Die BAC-Bank umfasst somit 82944 BAC-Klone, die in 216 Mikrotiterplatten aufbewahrt werden.

Tab.5: Ergebnisse der Erstellung der BAC-Bank

Ligation Nr.	1	2	3	4	5
Teil der BAC-Bank	1	1	1	2	2
ml Transformationsansatz	4	8	6	7	4
cfu/ μ l	2	4	1	4	10
Anzahl Klone	8000	32000	6000	28000	40000
MTP ¹	21	74	16	73	32
Klone ²	8064	28416	6144	28032	12288

¹Anzahl verwendeter Mikrotiterplatten

²Anzahl verwendeter BAC-Klone (384 pro Mikrotiterplatte)

Die erstellte BAC-Bank wird vom RZPD unter dem Namen "Bovine BAC II" und der Nummer 754 verwaltet und öffentlich zur Verfügung gestellt. Um die BAC-Bank für *Screening-Experimente* zugänglich zu machen, wurden *high density* Filter und *DNA-Pools* erstellt. Eine Kopie der BAC-Bank umfasst 3 *high density* Filter, bzw. 27 *Primary DNA-Pools* mit den zugehörigen *Secondary DNA-Pools*.

3.2 Charakterisierung der erstellten bovinen BAC-Bank

Die BAC-Bank wurde hinsichtlich der durchschnittlichen Insertlänge (2.4.1), des Chimärismusgrades (2.4.2) und der Genomabdeckung (2.4.3) charakterisiert.

3.2.1 Die durchschnittliche Insertgröße

Die BAC-Bank wurde in zwei Teilen erstellt (2.1.1.3). Die beiden Teile unterscheiden sich in der Größenfraktionierung der, durch Partialverdau erzeugten, DNA-Fragmente mit Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE). Diese Strategie resultierte in einer größeren durchschnittlichen Insertlänge im ersten Teil der BAC-Bank (Tab. 6). Die Verteilung der an 267 zufällig ausge-

wählten BAC-Klonen ermittelten Insertgrößen ist in Abb. 11 für die beiden Teile der BAC-Bank dargestellt.

Tab.6: Charakteristika von Teil 1 und 2 der erstellten BAC-Bank

	Teil 1	Teil 2
Mikrotiterplatten ¹	1-111	112-216
Anzahl Klone	42624 (= 51,4 %)	40320 (= 48,6 %)
Durchschnittliche Insertlängen aus der Untersuchung von 253 BAC-Klonen ²		
$\bar{\varnothing}$ Insertlänge ($\mu \pm \text{Std.}$) ⁴	132 kb \pm 55 kb	91 kb \pm 56 kb
Bereich der Insertlängen	50-350 kb	50-190 kb
Anzahl untersuchter Klone	145	108
Kartierung von BTA20 (Untersuchung von 8 Klonen)		
$\bar{\varnothing}$ Insertlänge	150 kb	98 kb
Bereich der Insertlängen	70-180 kb	30-180 kb
Anzahl untersuchter Klone	4	4

¹Nummern der Mikrotiterplatten, in denen die BAC-Bank beim RZPD gelagert wird

²267 untersuchte BAC-Klone – 14 Klone, die kein *Insert* enthielten

³durchschnittlich

⁴Mittelwert \pm Standardabweichung

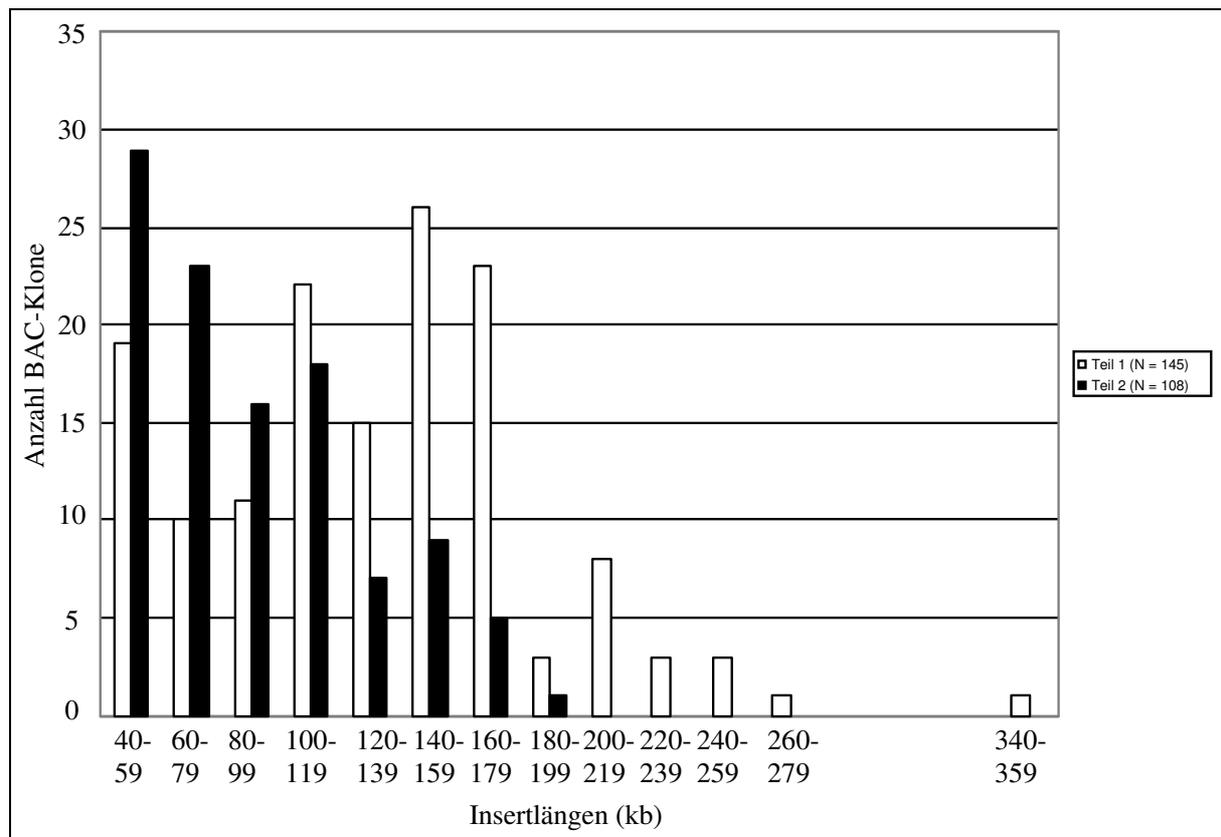


Abb.11: Durchschnittliche Insertgrößen von 253 BAC-Klonen (Buitkamp et al. 2000).

Die durchschnittliche Insertlänge der Klone in Teil 1 der BAC-Bank beträgt 132 kb (ermittelt aus der Untersuchung von 145 Klonen), für Teil 2 der Bank beträgt sie 91 kb (ermittelt aus der Untersuchung von 108 Klonen, Tab. 6). 14 der untersuchten BAC-Klone enthielten kein *Insert* (5,2 %). Das Screenen der erstellten BAC-Bank mit locuspezifischen Sonden für die physische Kartierung von BTA20 (2.5, 3.4.2) resultierte in 8 positiven BAC-Klonen (Tab. 15 und 16). Von diesen 8 Klonen wurden 4 in Teil 1 der BAC-Bank ermittelt und 4 in Teil 2. Die Klone aus Teil 1 der BAC-Bank haben eine durchschnittliche Insertlänge von 150 kb (Tab. 15), die Klone aus Teil 2 eine durchschnittliche Insertlänge von 98 kb. Dies entspricht der Tendenz, dass die Insertlänge der Klone aus Teil 2 kürzer ist als die der Klone aus Teil 1.

3.2.2 Physische Kartierung 35 zufällig ausgewählter BAC-Klone zur Ermittlung des Anteils chimärischer Klone

Zur Bestimmung des Anteils chimärischer Klone in der BAC-Bank wurden 35 zufällig ausgewählte BAC-Klone auf Metaphasechromosomen des Rindes hybridisiert (Abb. 13 S. 56A, Abb. 14 S. 56B, Abb. 12 S. 56, Tab. 7). Von diesen 35 BAC-Klonen zeigten 32 eindeutige chromosomale Positionen. Drei BAC-Klone zeigten Signale auf mehr als 2 (homologen) Chromosomen (Abb. 13 S. 56A). Einer der Klone (Tum-Nr. 458, Tab. 7) hybridisierte auf die Zentromere aller Autosomen (Abb. 13 S. 56A). Im Zuge der Kartierung von BTA20 wurden 9 weitere Klone aus der erstellten BAC-Bank hybridisiert (Tab. 16). Alle diese Klone zeigten eindeutige chromosomale Positionen. Damit ergibt sich ein Chimärismusgrad von 4,5 % (2 Klone von 44).

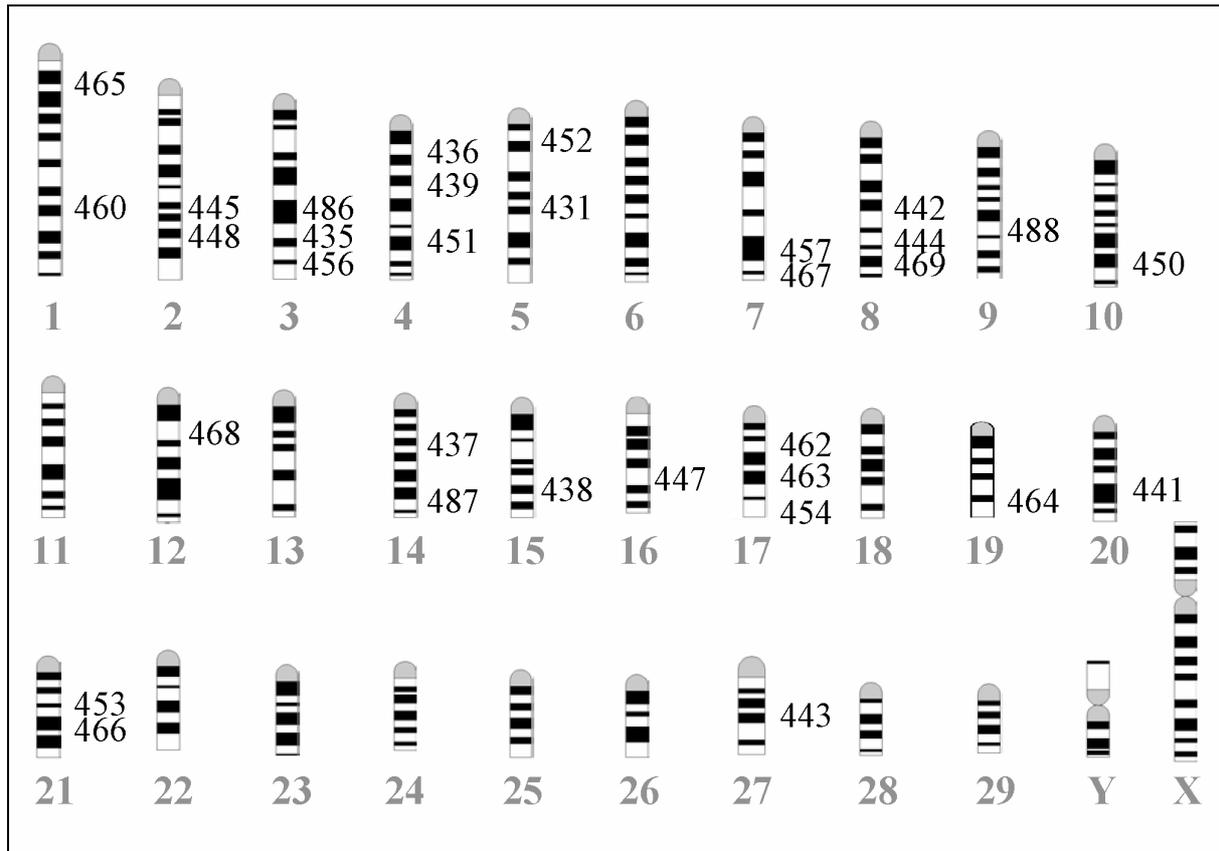


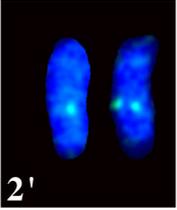
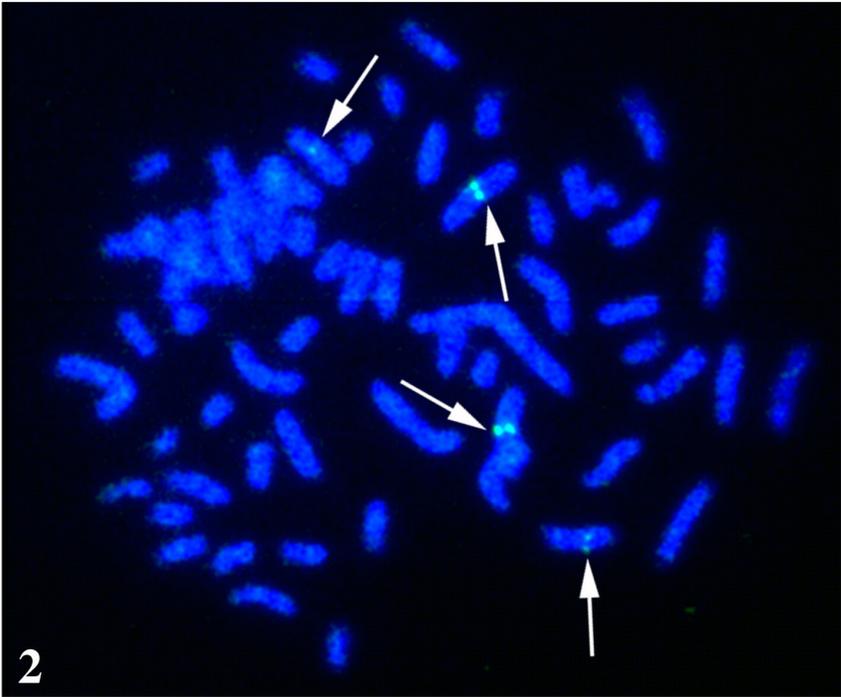
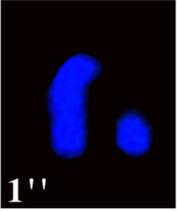
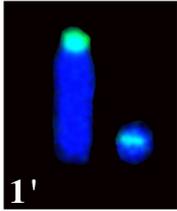
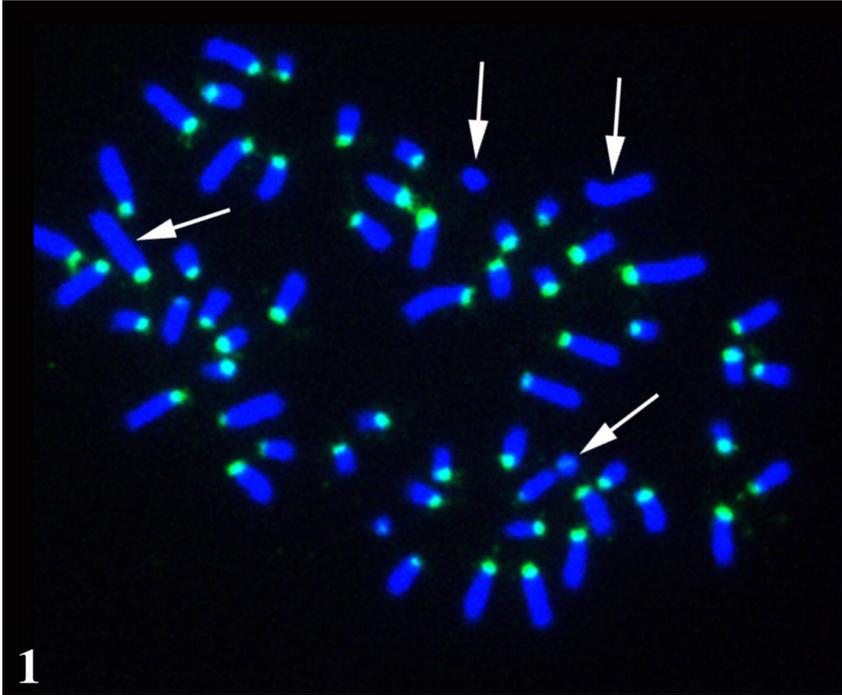
Abb.12: Chromosomale Position von 32¹⁸ zufällig ausgewählten BAC-Klonen.

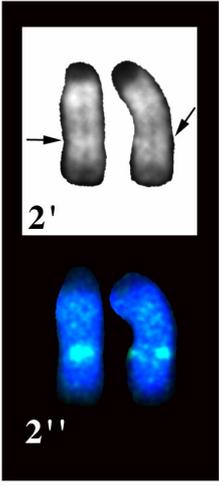
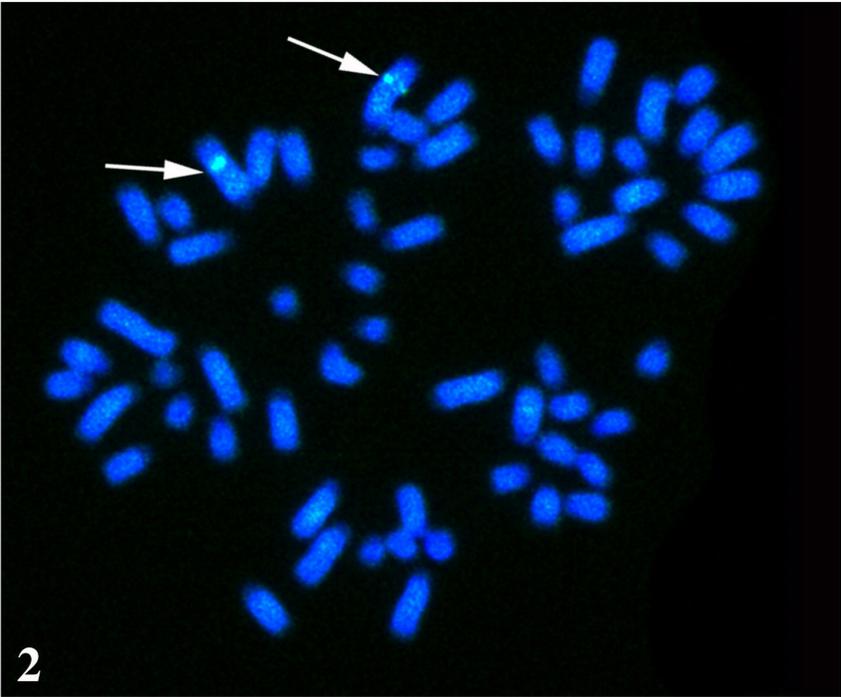
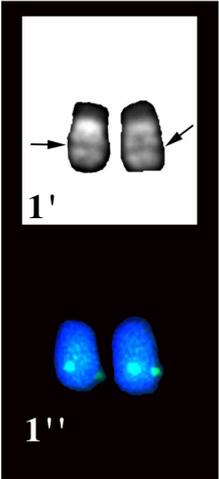
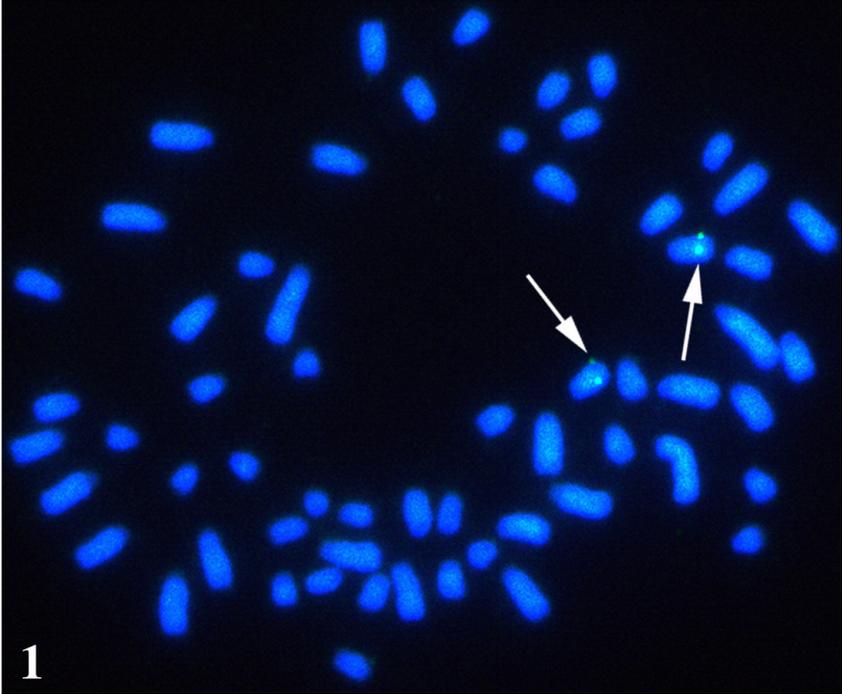
Von den 44 hybridisierten BAC-Klonen stammen 39 aus Teil 1 der BAC-Bank. Teil 1 ist der Teil mit den durchschnittlich längeren *Inserts* (Tab. 6). Je größer die Insertlänge, desto wahrscheinlicher ist es, dass zwei DNA-Fragmente inkloniert werden können. Die hauptsächliche Auswahl der BAC-Klone aus Teil 1 der BAC-Bank könnte so zu einer Überschätzung des Chimärismusgrades geführt haben.

Abb.13: (S. 56A) Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung des BACs mit zentromerischen *Repeats* und eines chimärischen BACs. 1: Metaphase mit Gegenfärbung der Chromosomen mit DAPI (blau) und Detektion der BAC-DNA mit FITC (grün), es zeigen sich Signale auf allen Autosomen (1': BTA1 und BTA29), aber nicht auf den Geschlechtschromosomen (1'': BTAx und BTAy). 2: chimärischer BAC-Klon mit Signalen auf BTA11 (2') und BTA4 (2'').

Abb.14: (S. 56B) FISH-Kartierung zufällig ausgewählter BACs. 1: BAC mit der TUM-Nr. 447 mit Hybridisierungssignal auf BTA16 (1': Q-Bänderung von BTA16, die Pfeile deuten die Position des Hybridisierungssignals an; 1'': FITC-Signal auf BTA16). 2: BAC mit der TUM-Nr. 460 mit Hybridisierungssignal auf BTA 1 (2': Q-Bänderung von BTA1, die Pfeile deuten die Position des Hybridisierungssignals an; 2'': FITC-Signal auf BTA1).

¹⁸ drei Klone, die auf mehr als zwei Chromosomen Signale zeigten, sind in der Abbildung nicht dargestellt





Tab.7: Chromosomale Position von 35 zufällig ausgewählten BAC-Klonen

BAC-Klon-Bezeichnung		chromosomale Position	FLcen	n ³
TUM-ID ¹	RZPD-ID ²			
431	TUM_B754A2124	5q23-q25	0,52±0,04	11
435	TUM_B754A424	3q33-q34	0,76±0,04	8
436	TUM_B754A524	4q13-q14	0,26±0,04	8
437	TUM_B754A624	14q14-q16	0,34±0,05	8
438	TUM_B754A724	15q24-q26	0,70±0,05	4
439	TUM_B754A824	4q15-q16	0,31±0,05	8
440	TUM_B754A1024	4q19-q22/ ⁴ 11q22-q23	0,59±0,07/ 0,49±0,05	16 20
441	TUM_B754A1124	20q17-q21	0,64±0,05	14
442	TUM_B754A1324	8q18-q24	0,74±0,07	12
443	TUM_B754A1524	27q13-q21	0,53±0,07	6
444	TUM_B754A1624	8q18-q22	0,67±0,05	12
445	TUM_B754A1724	2q33-q34	0,61±0,04	12
447	TUM_B754A1924	16q17-q21	0,66±0,07	17
448	TUM_B754A2024	2q33-q36	0,63±0,05	14
450	TUM_B754A2424	10q26-q31	0,66±0,05	12
451	TUM_B754B224	4q24	0,67±0,03	8
452	TUM_B754B324	5q13-q14	0,19±0,03	5
453	TUM_B754B524	21q12-q16	0,56±0,06	5
454	TUM_B754B624	17q24-q26	0,83±0,05	8
456	TUM_B754B824	3q34-q35	0,84±0,05	8
457	TUM_B754B924	7q25-q26	0,89±0,04	13
458	TUM_B754B1024	zentromerisch ⁵		
460	TUM_B754B1224	1q34-q36	0,67±0,04	16
461	TUM_B754B1324	4q12-q13/ ⁴ 6q12	0,15±0,03 0,15±0,03	6 6
462	TUM_B754B1424	17q12-q14	0,26±0,06	21
463	TUM_B754B1524	17q12-q14	0,28±0,05	9
464	TUM_B754B1624	19q17-q22	0,75±0,10	20
465	TUM_B754B1724	1q12-q13	0,11±0,03	16
466	TUM_B754B1824	21q17-q21	0,67±0,07	22
467	TUM_B754B1924	7q25	0,79±0,05	10
468	TUM_B754B2024	12q13-q15	0,43±0,06	10
469	TUM_B754B124	8q21-q23	0,67±0,06	12
486	TUM_B754B4624	3q31-q32	0,61±0,05	16
487	TUM_B754B4724	14q23-q24	0,83±0,06	13
488	TUM_B754B4824	9q19-q21	0,60±0,07	15

¹bei Ankunft werden den BAC-Klonen interne Nummern fortlaufend zugewiesen

²RZPD-Identifikation: TUM_B754A2124, TUM = Technische Universität München, B = bovin, 754 = Nummer der BAC-Bank beim RZPD, A2124 = Position des BAC-Klons in der Mikrotiterplatte

³Anzahl der gemessenen Chromosomen

⁴chimärer BAC-Klon mit Positionen auf zwei homologen Chromosomenpaaren

⁵auf allen Autosomen (Abb. 13 S. 56A)

3.2.3 Die Genomabdeckung der erstellten BAC-Bank

Es gibt im wesentlichen zwei Methoden, um die Genomabdeckung abzuschätzen (2.4.3):

- Berechnung aufgrund der ermittelten durchschnittlichen Insertlänge
- Ermittlung durch Screenen der Bank mit spezifischen Sonden

Die erstellte BAC-Bank besteht aus 82944 Klonen mit einer durchschnittlichen Insertlänge von 112 kb. Damit errechnet sich, bei einer geschätzten Größe des Rindergenoms von 3×10^9 Basenpaaren (bp), eine theoretische Genomabdeckung von 3,1. Die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Sequenz in der erstellten BAC-Bank enthalten ist beträgt 95 % (Formel S. 17).

Für die praktische Ermittlung der Genomabdeckung wurde die BAC-Bank mit locusspezifischen Proben für BTA20 gescreent (2.5). Dabei ergaben sich pro Probe $2 \pm 0,5$ Signale (1-3 Signale für acht Proben, 3.4).

3.3 Auswahl der Loci für die Kartierung von BTA20

Für die physische Kartierung wurde Chromosom 20 des Rindes ausgewählt, da hier eine QTL-Region kartiert worden war (Arranz et al. 1998, Coppieters et al. 1999, Georges et al. 1995, Zhang et al. 1998). Die wahrscheinlichste Position des QTL wurde durch *Bootstrapping* an den Mikrosatellitenloci *BMS521* und *BMS703* ermittelt (Abb. 2, Einleitung). Ein 95%-Vertrauensintervall wurde nicht angegeben (1.5.1).

Das Ziel war nun, das QTL-Intervall für die hier durchgeführte Untersuchung durch die physische Kartierung von BAC-Klonen zu begrenzen und die Lage von TypI-Loci relativ zu diesen BAC-Klonen zu bestimmen. Dazu wurden aus den bovinen und humanen Karten die in Abb. 15 und Tab. 8 dargestellten Loci zur Kartierung von BTA20 gewählt.

Tab.8: Ausgewählte Loci für die physische Kartierung von BTA20

Locus-symbol	Locus-Name	Kartierung beim Rind			Position auf HSA5 ³
		genetisch	FISH ¹	RH ²	
<i>ANPRC</i> (= <i>NPR3</i>)	<i>natriuretic peptide receptor C</i>	Bishop et al. 1994	erstmalig ⁴	Band et al. 2000	5p12-p14
<i>BMS521</i>		Stone et al. 1995	De Donato et al. 1999		
<i>BMS703</i>		Stone et al. 1995	erstmalig ⁴		
<i>BMS1120</i>		Stone et al. 1997			
<i>BMS2461</i>		Stone et al. 1995	erstmalig ⁴	erstmalig ⁴	
<i>C6</i>	<i>complement component 6</i>				5p13
<i>C7</i>	<i>complement component 7</i>				5p13
<i>FST</i>	<i>follistatin</i>		erstmalig ⁴	erstmalig ⁴	5q11.2
<i>GHR</i>	<i>growth hormone receptor</i>	Barendse et al. 1997	Moody et al. 1995	erstmalig ⁴	5p12-p13
<i>HMGCS1</i>	<i>3-@hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)</i>		erstmalig ⁴		5p13-p14
<i>HTR1A</i>	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A</i>	Barendse et al. 1994			5q11.2-q13
<i>IL7R</i>	<i>interleukin 7 receptor</i>		erstmalig ⁴	erstmalig ⁴	5p13
<i>LIFR</i>	<i>leukemia inhibitory factor receptor</i>		erstmalig ⁴		5p12-p13
<i>MAP1B</i>	<i>microtubule-associated protein 1B</i>	Barendse et al. 1994	Eggen et al. 1998		5q13
<i>MTRR</i>	<i>5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase</i>				5p15.2-p15.3
<i>MYO10</i>	<i>myosin x</i>				5p14.3-p15.1
<i>OXCT</i>	<i>3-oxid CoA transferase</i>				5p13
<i>PRLR</i>	<i>prolactin receptor</i>	Barendse et al. 1997	Hayes et al. 1996	erstmalig ⁴	5p12-p13
<i>PTGER2</i> ⁵	<i>prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kD</i>				14q22
<i>SDHA</i>	<i>succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)</i>	Sonstegard und Kappes 1999	erstmalig ⁴		5p15
<i>SLC1A3</i>	<i>solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3</i>		erstmalig ⁴	Band et al. 2000	5p13
<i>TRIO</i>	<i>triple functional domain (PTPRF interacting)</i>				5p14-p15.1

¹mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

²mittels *Radiation Hybrid Panel*

³s. URL 11

⁴erstmalig auf diese Weise im Rahmen der vorliegenden Arbeit kartiert

⁵dieser Locus ist im Internet (URL 11) falsch annotiert

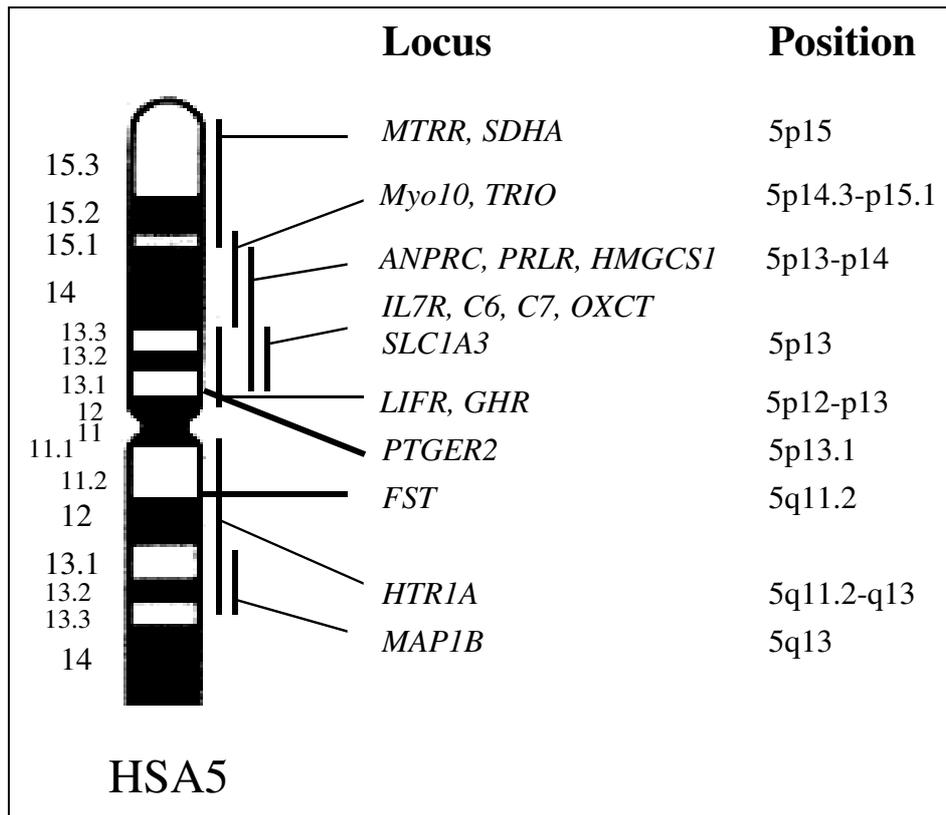


Abb.15: Chromosom 5 des Menschen (HSA5). Dargestellt ist der Teil, der nach *chromosome painting* homolog zu BTA20 ist. Dargestellt sind nur die Loci, die für die physische Kartierung von BTA20 ausgewählt wurden. *PTGER2* ist in der *Genome Database* (URL 11) als auf HSA5p13.1 liegend annotiert, laut der Datenbank OMIM (URL 1) und der *Radiation Hybrid* Kartierung von HSA5 (URL 5) wurde dieser Locus allerdings auf HSA14 kartiert. Die Balken bezeichnen die Position der Loci als Mittelwert \pm Standardabweichung des FLCen angegeben als Bänder des zytogenetischen Standards (1.2.2, 2.7.7.2).

3.4 Isolierung locusspezifischer BAC-Klone

3.4.1 Entwicklung von PCR-Systemen

Für das Screenen von *high density* Filtern und *DNA-Pools* wurden PCR-Primersysteme erstellt (Tab. 9 und Tab. 28A, Anhang). Die Überprüfung der Spezifität der DNA-Sonden wurde durch Sequenzierung der amplifizierten Fragmente und Überprüfung der resultierenden Sequenzen mittels *BLAST* vorgenommen (2.5.1). Dafür wurde die Sequenz des PCR-Produktes mit verfügbaren DNA-Sequenzen in *GenBank* (URL 8) verglichen.

Für die physische Kartierung von BTA20 wurden 22 Loci ausgewählt (Tab. 8). Für die Loci *BMS521* und *BMS703* wurde kein Primersystem erstellt, da die BAC-Klone für diese Loci von B. Grisart und M. Georges (University of Liege, Belgien) zur Verfügung gestellt wurden. Für die Loci *ANPRC*, *BMS1120* und *BMS2461* wurden publizierte Primer verwendet (Bishop et al. 1994, Stone et al. 1997, Stone et al. 1995).

Für 3 von 17 Loci (*MTRR*, *OXCT*, *TRIO*) konnte kein Primersystem für das Rind erstellt werden. Das Primersystem für *C7* wurde ausgeschlossen, da die Sequenz des amplifizierten Produktes nicht identisch mit der für die Erstellung der Primer verwendeten Ausgangssequenz war. Damit führten 13 von 17 entwickelten Primersystemen zu Resultaten.

Tab.9: PCR-Primersysteme für die Kartierung von BTA20

Locus	Primer	Sequenz (5'-3')	Spezies ¹	GenBank Accession no.	A-T ²	PCR- Produkt- Länge
<i>ANPRC</i> (1)	1333	GCC ATC CCT TTC CCT TAA TC	BTA	D90364	61°C	197 bp
<i>ANPRC</i> (2)	1334	CCC CAC AAA GCT ACA CCG				
<i>BMS1120</i> (1)	1546	CTT GAA CTG TGG ATG ATT GAT G	BTA	G18620	61°C	198 bp
<i>BMS1120</i> (2)	1547	GAA TGC TTA TTA GGT GCA TTT ACA				
<i>BMS2461</i> (1)	1656	CTT CTG GAT TTT TCC TGT TTG G	BTA	G19013	53°C	122 bp
<i>BMS2461</i> (2)	1657	AAG CTC CAC ATT TGC ATG G				
<i>C6</i> (1)	1366	CAC AAC GAA AGC TAA AGA TCT GC	HSA	J04506	55°C	126 bp
<i>C6</i> (2)	1367	CAG GGA GCC AGA GGT GAA G				
<i>FST</i> (1)	1503	TCC TGT GAC GAT ATC CAG TGC	BTA	L21716	65°C	139 bp
<i>FST</i> (2)	1504	GCA AGA TCC GGA GTG CTT CAC				
<i>GHR</i> (1)	1190	CAG CAG CCC AGT GTT ATC CT	BTA	AF044258	61°C	219 bp
<i>GHR</i> (2)	1191	ATT GAG TAC GAG GCC CTG TG				
<i>HMGCS1</i> (1)	1501	GAT GTT GGG ATT GTT GCC CTT G	HSA	NM_002130	61°C	501 bp
<i>HMGCS1</i> (2)	1502	CAT CCC AAG AGC TGG ACT CAA TC				
<i>HTR1A</i> (1)	1364	TGA TCA CCT CTC TGC TGC TG	HSA	M83181	56°C	403 bp
<i>HTR1A</i> (2)	1365	GAT AAT TGG CCA CGT TCT GC				
<i>IL7R</i> (1)	1273	TCC TGA AAG TTT CCT GGA CTG C	HSA	NM_002185	61°C	111 bp
<i>IL7R</i> (2)	1274	GTA GAA GCT GGA CAT GGT GAC				
<i>LIFR</i> (1)	1516	ATT GGA AAT GAA TCC TTG TAC C	HSA	X61615	59°C	264 bp
<i>LIFR</i> (2)	1517	GCT TGA GGC TGA TAC ATC GAC				
<i>MAP1B</i> (1)	1573	GGC GAC TCT GCA CTG TTT GC	BTA	Z29519	67°C	212 bp
<i>MAP1B</i> (2)	1574	GTG GAG CCC TGG GAC TGT TC				
<i>MYO10</i> (1)	1362	GGT CTG GCT GAG AGA AAA CG	BTA	U55042	55°C	92 bp
<i>MYO10</i> (2)	1363	CCT GAC CAT AGT CCG TCT GG				
<i>PRLR</i> (1)	1265	AGG TCA GCC AAG ATG GAG TG	BTA	L02549	61°C	400 bp
<i>PRLR</i> (2)	1266	ACC CTG TTC TTG AGC CCT CT				
<i>PTGER2</i> (1)	1474	CAT GGC CCT GGA GCG CTA CC	HSA	U19487	66°C	405 bp
<i>PTGER2</i> (2)	1475	ATG AGG TGG TCC GTC TCC TC				
<i>SDHA</i> (1)	1558	CTG TGG GCC CGA GAA GGA C	BTA	M60879	61°C	158 bp
<i>SDHA</i> (2)	1559	TGT AGT GCA CGG TGG GAA GC				
<i>SLC1A3</i> (1)	1372	TGG CGG CCC TAG ATA GTA AGG	BTA	D82056, D29661	61°C	202 bp
<i>SLC1A3</i> (2)	1373	CTG ATC AAG TCC AGG AAG GCG				

¹Spezies, aufgrund deren Sequenz die Primer entwickelt wurden

²A-T: Anlagerungstemperatur der Primer

Die Primersysteme wurden bevorzugt basierend auf boviner Sequenz entwickelt, möglichst in Exonen, soweit diese Information vorhanden war. Wo dies nicht möglich war, wurden Primer basierend auf humaner Sequenz und/oder über „Trial and Error“ entwickelt (Abb. 6, Material und Methoden). Sieben Primersysteme, die basierend auf boviner Sequenz entwickelt wurden, lieferten locuspezifische PCR-Produkte und wurden als Sonden zum Screenen der BAC-Banken verwendet. Sechs von 7 Systemen identifizierten positive Klone (Tab. 10). Als „positiv“ werden Klone bezeichnet, die auf BTA20 kartieren. Von 10 Primersystemen, die basierend auf humaner Sequenz entwickelt wurden, lieferten sieben PCR-Produkte. Sechs von diesen Primersystemen wurden als Sonden zum Screenen der BAC-Banken verwendet (C7 wurde ausgeschlossen). Vier von sechs Systemen identifizierten positive Klone (Tab. 10).

Tab.10: Effizienz der Strategie zur Entwicklung von Primersystemen

	bovine Ausgangssequenz		humane Ausgangssequenz	
	Exon ¹	„Trial and Error“ ²	Exon ¹	„Trial and Error“ ²
Systeme ³	6	1	6	4
PCR-Produkt ⁴	6	1	4	3
spez. Klone ⁵	6	0	2	2
Effizienz ⁶	100 %		33 %	50 %

¹Primer wurden in einem Exon entwickelt

²Primer wurden ohne Kenntnis der Exon-/Intron-Struktur entwickelt

³Anzahl entwickelter Primersysteme

⁴Anzahl der Primersysteme, die ein PCR-Produkt lieferten

⁵Anzahl der Primersysteme, mit denen verifizierte locuspezifische Klone identifiziert werden konnten

⁶bezogen auf die Anzahl von Primersystemen, die spezifische Klone lieferten im Verhältnis zur Gesamtzahl entwickelter Primersysteme

3.4.2 Screenen der BAC-Banken

Für die Isolierung locuspezifischer BAC-Klone zur physischen Kartierung von BTA20 wurden zwei BAC-Banken des RZPD gescreent. Es handelt sich hierbei um die vom Babraham Institute, Cambridge, UK erstellte BAC-Bank (Zhu et al. 1999), die beim RZPD unter dem Namen „Bovine BAC“ und der Nr. 750 geführt wird und um die BAC-Bank, deren Erstellung in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird, und die beim RZPD unter dem Namen „Bovine BAC II“ und der Nr. 754 geführt wird.

3.4.2.1 Durch Screenen von *high density* Filtern identifizierte Klone

Die *high density* Filter der beiden BAC-Banken wurden mit DNA-Sonden für 9 Loci gescreent (Tab. 11). Dabei resultierten 7 Sonden in 51 Signalen. Zwei DNA-Sonden (C6, MYO10) identifizierten keine BAC-Klone. Für den Locus ANPRC wurden sehr viele Signale detektiert. Die Probe enthielt eine repetitive Sequenz (CA-Repeat). Von diesen Signalen wur-

den 27 als auswertbar angesehen, zwei davon wurden ausgewählt und weiteruntersucht. Die verbleibenden 25 Signale wurden nicht mehr in folgende Auswertungen einbezogen.

Von 19 untersuchten BAC-Klonen wurden 16 in der BAC-Bank Nr. 750 und 3 in der BAC-Bank Nr. 754 identifiziert¹⁹. Von diesen 19 BAC-Klonen kartierten 6 auf BTA20, davon stammten 5 aus der BAC-Bank Nr. 750 und 1 Klon aus der BAC-Bank Nr. 754.

Tab.11: Anzahl von BAC-Klonen, die durch das Screenen der *high density* Filter der beiden BAC-Banken identifiziert wurden

Locus	BAC-Bank Nr. 750		BAC-Bank Nr. 754	
	Anzahl Signale	Anzahl BAC-Klone ¹	Anzahl Signale	Anzahl BAC-Klone ¹
<i>ANPRC</i>	20 ²	1	7 ²	1
<i>C6</i>	0	0	0	0
<i>GHR</i>	4	5 ³	n. g. ⁴	
<i>HTR1A</i>	3	n b. ⁵	3	n. b. ⁵
<i>IL7R</i>	1	1	n. g. ⁴	
<i>MYO10</i>	0	0	0	0
<i>PRLR</i>	3	2	n. g. ⁴	
<i>PTGER2</i>	7	6	2	2
<i>SLC1A3</i>	1	1	0	0

¹Zahl von BAC-Klonen, die bestellt und erhalten wurden

²da die Probe ein *Repeat* [(CA)_n] enthielt, ergaben sich viele Signale, wovon 27 als auswertbar angesehen wurden

³wegen unklarem Hybridisierungsmuster (Abb. 7, Material und Methoden) wurden 5 Klone bestellt

⁴nicht gescreent

⁵die ermittelten BAC-Klone wurden nicht bestellt

3.4.2.2 Durch Screenen von DNA-Pools identifizierte Klone

Die *Primary Pools* wurden mit den Primersystemen für 12 Loci gescreent (Tab. 12). 9 Primersysteme identifizierten 42 positive *Pools*. 33 *Secondary Pools* wurden gescreent. Aus diesen wurden 28 BAC-Klone isoliert. Von diesen 25 BAC-Klonen wurden 25 untersucht. Drei Primersysteme (*BMS1120*, *C6*, *MYO10*) identifizierten keine positiven *Pools*. Das DNA-Fragment, das von diesen Primersystemen amplifiziert wird, wurde zuvor sequenziert, um die Spezifität zu gewährleisten.

¹⁹ Die *high density* Filter der BAC-Bank Nr. 754 waren zu Beginn der *Screening*-Experimente noch nicht fertiggestellt. Daher wurden diese nur mit den Sonden für 6 Loci gescreent. Dagegen wurden die Filter der BAC-Bank Nr. 750 mit den Sonden für 9 Loci gescreent.

Von 25 untersuchten BAC-Klonen wurden 17 in der BAC-Bank Nr. 750 und 8 in der BAC-Bank Nr. 754 identifiziert. Von diesen 28 BAC-Klonen kartierten 18 auf BTA20. Von den 8 in der erstellten BAC-Bank (Nr 754) identifizierten Klonen kartierten 7 auf BTA20.

Tab.12: Anzahl von BAC-Klonen, die durch das Screenen der DNA-Pools der beiden BAC-Banken identifiziert wurden

Locus	BAC-Bank Nr. 750		BAC-Bank Nr. 754	
	positive PPs ¹	isolierte BAC-Klone	positive PPs ¹	isolierte BAC-Klone
<i>BMS1120</i>	0		0	
<i>BMS2461</i>	4 ²	7	3	3
<i>C6</i> ⁵	0		0	
<i>FST</i>	4	2	1	1
<i>HMGCS1</i>	2	2	0	
<i>HTRIA</i> ⁵	5 ³		3 ³	
<i>LIFR</i>	5	1 ⁴	1	1
<i>MAP1B</i>	2	1 ⁴	2	1
<i>MYO10</i> ⁵	0		0	
<i>PTGER2</i> ⁵	2	1	2	0
<i>SDHA</i>	3	4	2	2
<i>SLCIA3</i> ⁵	1	1	0	

¹Anzahl positiver *Primary Pools*

²es wurden 3 *Secondary Pools* gescreent

³es wurden keine *Secondary Pools* gescreent

⁴nicht untersucht

⁵das Screenen der Filter wurde durch das Screenen der DNA-Pools überprüft

Beim Screenen der Filter wurden mehr Signale pro Locus (1,2 x) identifiziert, als beim Screenen der *Pools* (Tab. 13). Von den beim Screenen der Filter erhaltenen Signalen wurden nur 35 % untersucht im Vergleich zu 79 % bei den *Pools*. Beim Screenen der Filter konnte pro untersuchtem Signal 1 Klon ermittelt werden. Von 19 ermittelten Klonen waren 6 positiv, dies entspricht 32 %.

Tab.13: Effizienz des Screenens von *high density* Filtern und DNA-Pools

	<i>high density</i> Filter	BAC-DNA-Pools
# ¹ Loci mit Signalen	7	9
Anzahl Signale	51	42
Signale/Locus	7,3	4,7
untersuchte Signale	18 (35 %)	33 (79 %)
# ¹ ermittelter Klone	19	28
ermittelte Klone/Locus	2,7	3
positive ² Klone/Locus	0,9	2

¹Anzahl

²als „positiv“ werden Klone bezeichnet, die auf BTA20 kartieren

Beim Screenen der *Pools* war das Verhältnis der Anzahl von Signalen zu ermittelten Klonen nicht 1:1. 33 % der *Pools* waren falsch positiv (Tab. 14). 56 % der *Pools* lieferten die erwarteten 3 Signale (2.5.3) und jeweils einen Klon. Von den so ermittelten 18 Klonen kartierten 16 auf BTA20. Zwölf Prozent der gescreenten *Pools* lieferten mehr als drei Signale. Die beiden positiven Klone aus dem *Pool* mit fünf Signalen lieferten beim Verdau mit den Restriktionsenzymen *Eco* RI und *Hind* III (2.6.3, 3.5.3) identische Restriktionsmuster. Sie könnten somit identische *Inserts* inkloniert haben. Aus dem Screenen von 33 *Pools* konnten somit 28 Klone ermittelt werden. Von diesen 28 Klonen wurden 25 untersucht, von denen 18 positiv waren. Dies entspricht 72 %.

Tab.14: Anzahl von Signalen und ermittelten BAC-Klonen aus dem Screenen der DNA-*Pools*

Anzahl Signale	Anzahl <i>Pools</i>	Anzahl ermittelter BAC-Klone
0 ¹	9	-
2 ¹	2	-
3	18	18 ²
4	3	6 ³
5	1	4 ⁴

¹falsch positive *Pools*

²16 Klone kartierten auf BTA20

³es wurden je zwei Klone pro *Pool* ermittelt, von denen jeweils einer auf BTA20 kartierte

⁴zwei Klone kartierten auf BTA20

Mit der Sonde für den Locus *SLCIA3* wurden sowohl die Filter, als auch die DNA-*Pools* beider BAC-Banken gescreent. In der BAC-Bank Nr. 750 konnte sowohl von den Filtern als auch aus den *Pools* je ein Klon ermittelt werden. Der aus den *Pools* ermittelte Klon kartierte auf BTA20, der von den Filtern ermittelte kartierte auf BTA17 (Tab. 16). Die Klone haben die Koordinaten BBI_B750K10344 bzw. BBI_B750K10332, d. h. sie unterscheiden sich nur in der Mikrotiterplatte. Beide sind in Reihe K und Spalte 10 lokalisiert, der positive Klon befindet sich in Mikrotiterplatte 344, der negative in Mikrotiterplatte 332. Das deutet auf eine fehlerhafte Koordinatenermittlung hin. Die Koordinatenermittlung des Filterscreenens ist fehleranfälliger. Dies beruht einerseits auf dem Aufkleben der Filter auf den Röntgenfilm (Abb. 8 und 2.5.2.4, Material und Methoden). Sollte der Filter während der Exposition verrutschen oder seine Lage auf dem Röntgenfilm nach der Autoradiographie nicht genau angezeichnet werden, wird das Doppelsignal aufgrund der hohen Klondichte in einem falschen *Array* ermittelt. Außerdem sind einige Hybridisierungsmuster leicht miteinander zu verwechseln (z. B. 8 und 10, s. Abb. 7, Material und Methoden).

Damit scheint das Screenen von DNA-*Pools*, bezogen auf die Anzahl positiver Klone pro Locus, effektiver zu sein als das Screenen von *high density* Filtern (Tab. 13). Das Screenen der *Pools* scheint auch weniger fehleranfällig zu sein. Außerdem werden beim Screenen mittels PCR Fehlerquellen, wie z. B. die ungenügende Markierung der Probe, ausgeschlossen.

3.5 Überprüfung und Charakterisierung der isolierten Klone

3.5.1 Insertlänge der isolierten Klone

Die Insertlänge der BAC-Klone, die auf BTA20 kartierten, wurde durch Herausschneiden der *Insert*-DNA aus dem BAC mit dem Restriktionsenzym *Not* I und anschließender Auftrennung der Fragmente mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese (2.4.1, Abb. 16) bestimmt. Die durchschnittliche Insertlänge aller isolierten Klone betrug 158 kb (Tab. 15).

Tab.15: Insertlänge der für die physische Kartierung von BTA20 verwendeten BAC-Klone

	BAC-Bank			gesamt
	Nr. 750 (Zhu et al. 1999)	Nr. 754 (Buitkamp et al. 2000)	Warren et al. (2000)	
Ø ¹ Insertlänge	97 kb	124 kb	253 kb	158 kb
# ² BAC-Klone	16	8	4	28
min-max ³	25-230 kb	30-180 kb	160-420 kb	25-420 kb

¹durchschnittliche

²Anzahl

³Bereich der Insertlängen: Minimum-Maximum

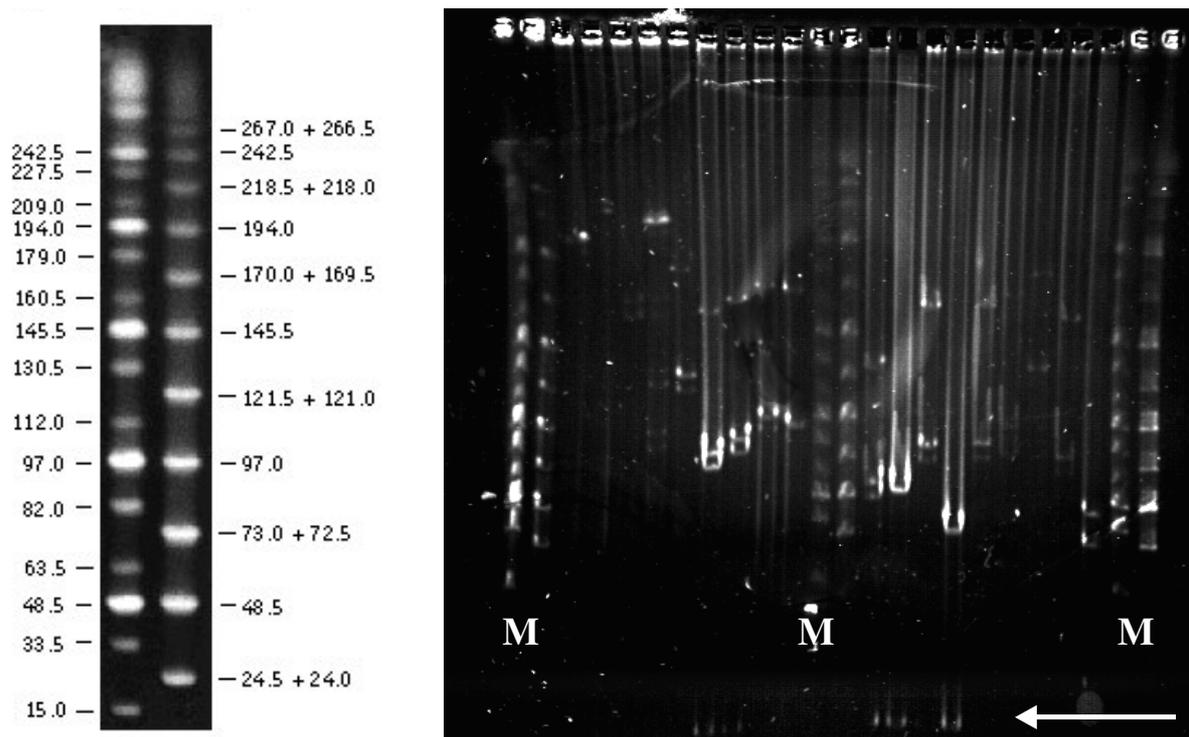


Abb.16: Puls-Feld-Gelelektrophorese von 18 BACs. 1: die verwendeten Marker; links: *Mid-Range I PFG Marker*; rechts: *Mid-Range II PFG Marker*; rechts und links angegeben sind die Fragmentgrößen in kb (URL 12). 2: Puls-Feld- Gel; M = Marker; der Pfeil zeigt die Vektorbande mit einer Größe von etwa 8 kb.

3.5.2 Die Spezifität der BAC-Klone

Die Überprüfung der Spezifität der BAC-Klone erfolgte durch Kolonie-PCR (2.6.2). Als Templat für die PCR wurde die gesamte Kolonie des zu prüfenden BAC-Klons verwendet und das locuspezifische DNA-Fragment aus dem *Insert* des BACs amplifiziert. Das Amplifikat wurde sequenziert und die Sequenz mittels *BLAST* überprüft (Tab. 29A, Anhang).

Als weiterer Parameter für die Spezifität diente die durch FISH ermittelte chromosomale Position der BAC-Klone (2.7, Abb. 19 S. 70B, Abb. 20 S. 70C). Alle BAC-Klone, die Kolonie-PCR-Produkte lieferten, kartierten auf BTA20. Dies war auch dann der Fall, wenn die Sequenz des Produktes zu schlecht für eine Auswertung war. Dies betraf die Klone für die Loci *ANPRC* (Abb. 20 S. 70C) und *BMS2461*. Es wurden 3 von 11 Klonen, die kein Kolonie-PCR-Produkt lieferten, kartiert, und keiner hybridisierte auf BTA20 (Tab. 29A, Anhang, Abb. 19 S. 70B).

3.5.3 Überprüfung der Identität mehrerer, für einen Locus identifizierte Klone

Um identische Klone zu identifizieren, wurden die BACs mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* geschnitten (2.6.3) und die entstandenen Fragmente auf einem Agarosegel aufgetrennt. Dabei zeigten die Klone 735 und 758 (*SDHA*) und die Klone 756 und 768 (*BMS2461*) beim Verdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* dasselbe Bandenmuster, unterschieden sich

aber beim Verdau mit *HindIII*. Die Klone 748 und 749 (*BMS2461*) zeigten beim Verdau mit beiden Restriktionsenzymen identische Bandenmuster und scheinen somit identische *Inserts* zu haben. Denkbar ist auch, dass diese Klone eine große Überlappung aufweisen, die mit den verwendeten Enzymen nicht aufgelöst werden konnte.

3.6 Physische Kartierung von BTA20

Die Kartierung von locusspezifischen BAC-Klonen erfolgte durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH). Mit Zwei-Farben-FISH konnten die BAC-Klone auf BTA20 zueinander angeordnet werden. Außerdem wurden 7 Loci mittels Screenen des *Radiation Hybrid Panels* BOVRH5 (Womack et al. 1997) in die bereits bestehende Karte von BTA20 (Band et al. 2000) eingefügt.

3.6.1 Kartierung mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Aus dem Screenen der BAC-Banken mit locusspezifischen Proben resultierten 41 Klone für 12 Loci. Die Klone für die beiden Loci *BMS521* und *BMS703* wurden zur Verfügung gestellt. Insgesamt kartierten 28 BAC-Klone für 13 Loci auf BTA20 (Abb. 17, Tab. 16).

3.6.1.1 Chromosomale Position der BAC-Klone

Die chromosomale Position der BAC-Klone wurde durch Verwendung der Zelllinie Bt 14/20, bei der eine Kopie von BTA20 zweifelsfrei zu identifizieren ist, bestimmt (Abb. 18 S. 70A, 2.7.7.1).

Tab. 16: Charakterisierung der BAC-Klone, die unter Anwendung von *a priori* Wissen isoliert wurden

Locus	Klon-Bezeichnung		n ¹	Insertgröße	FLcen	chromosomale Position
	TUM-ID	RZPD-ID				
<i>ANPRC</i>	518	TUM_B754A05214	14	50 kb	0,53±0,10	20q15-q17 n. H. ²
	519	BBI_B750A1412				
<i>BMS521</i>	429	RPCI-42 ³ (Warren et al. 2000)	14	^{4/5}	0,85±0,04	20q21-q23 1q12-q13
	430		10		0,20±0,06	

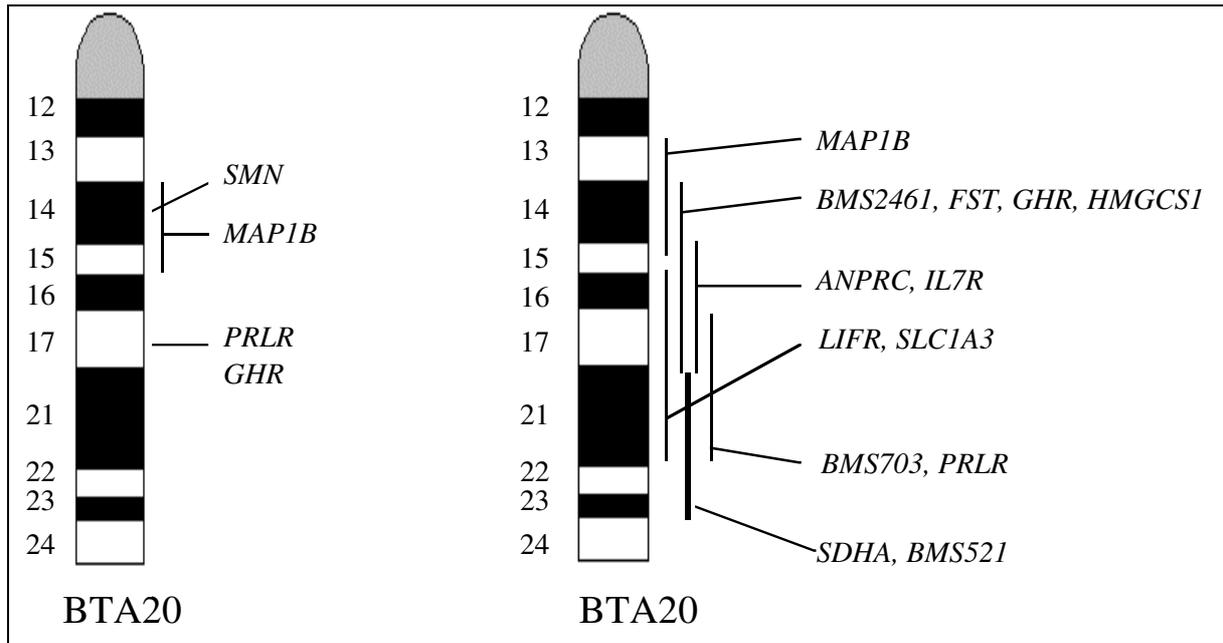
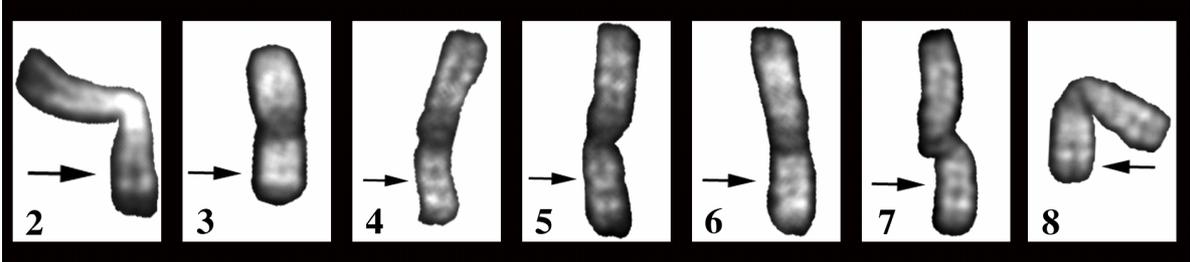
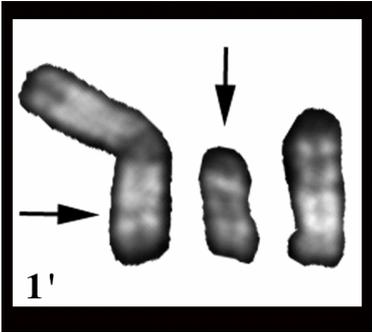
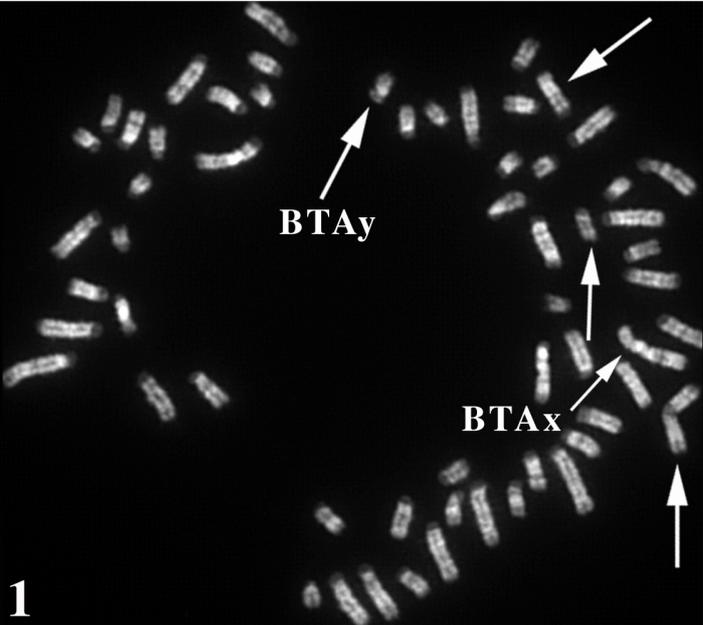


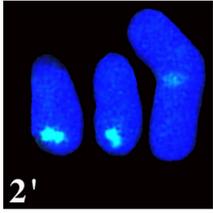
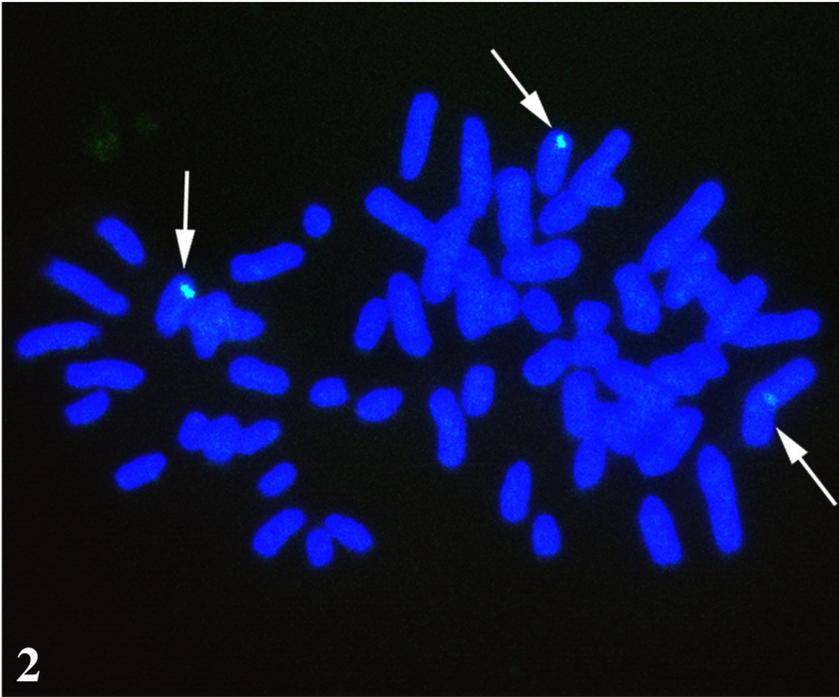
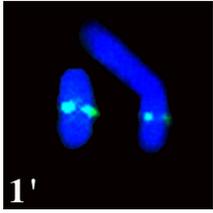
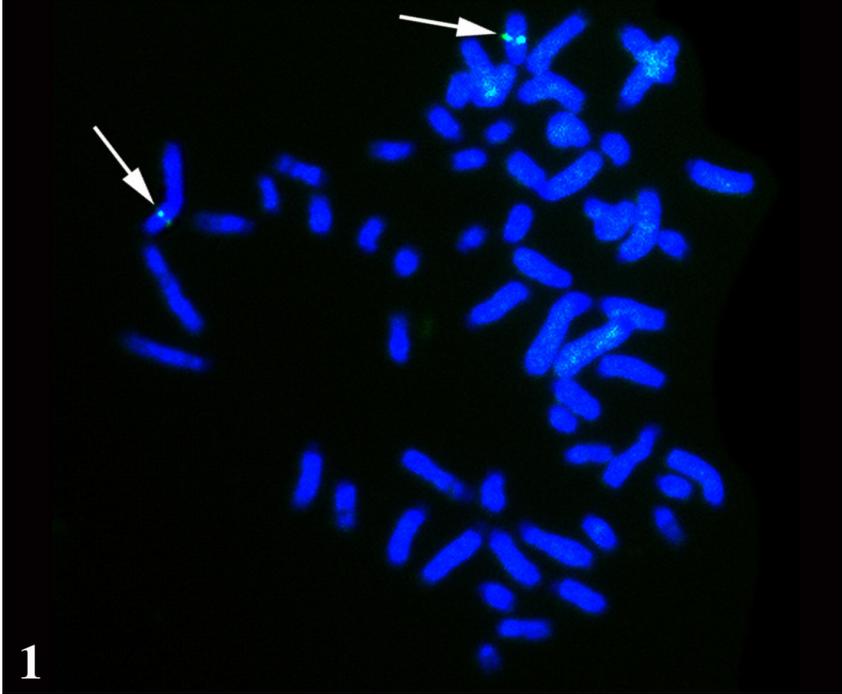
Abb.17: Um 9 Loci erweiterte zytogenetische Karte von BTA20. Links: Ausgangssituation; Rechts: die erweiterte Karte; der Locus *BMS521* wurde von De Donato et al. (1999) zytogenetisch kartiert (1.4).

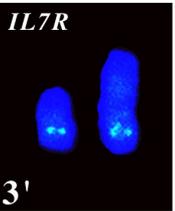
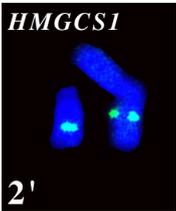
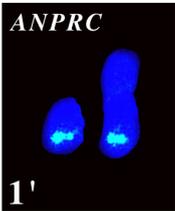
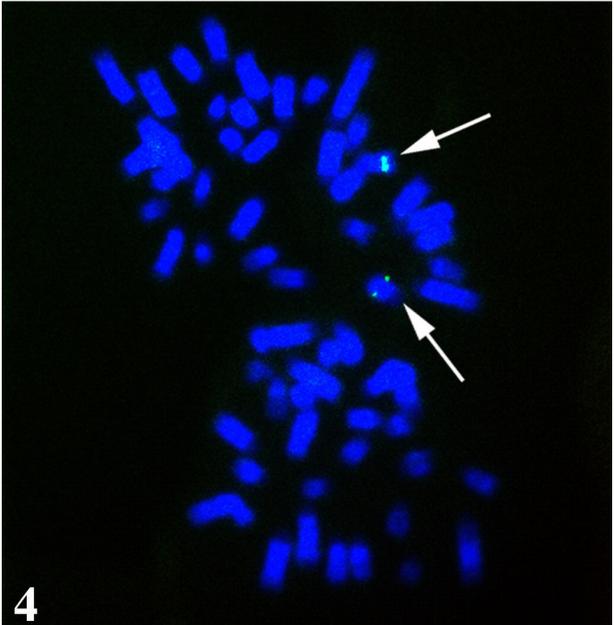
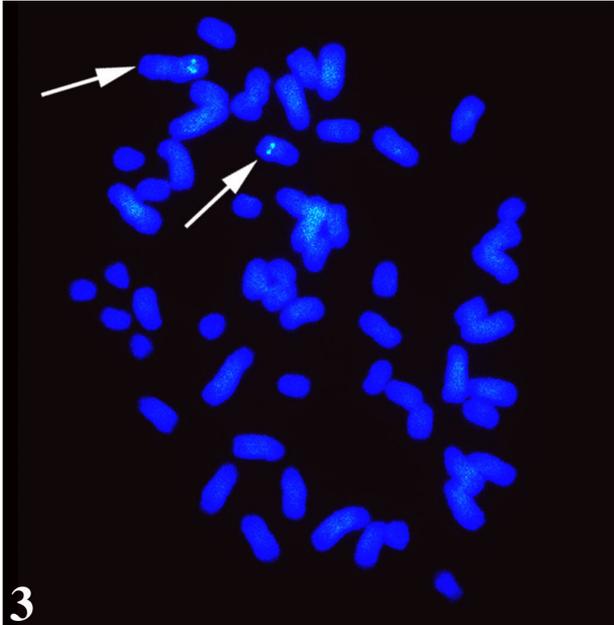
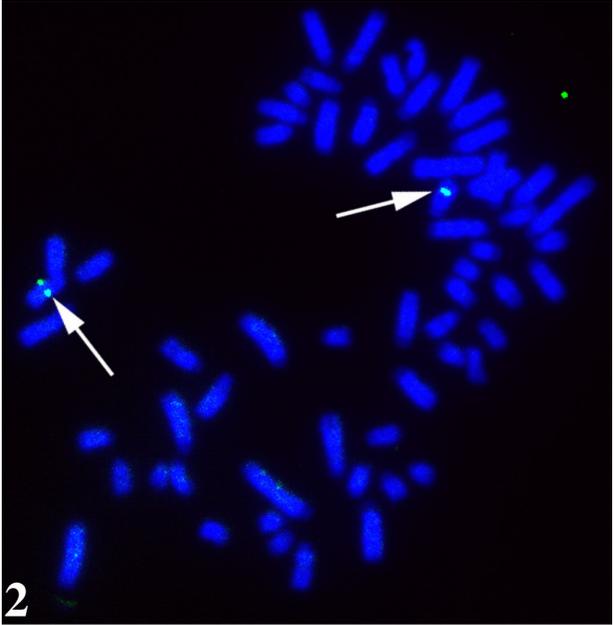
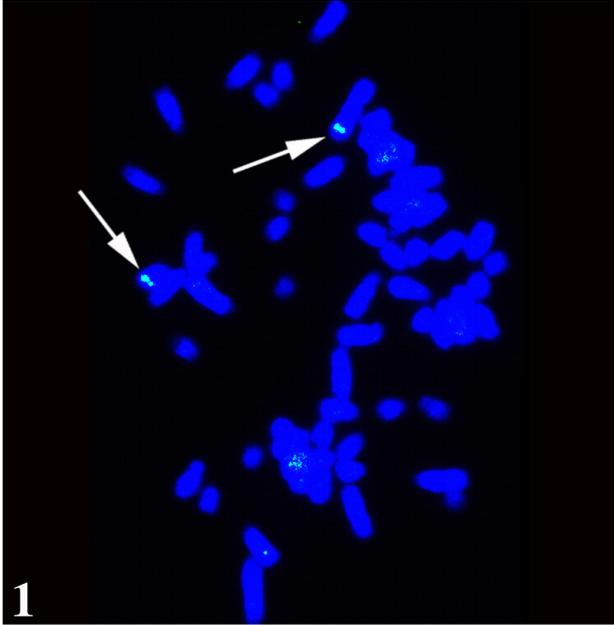
Abb.18: (S. 70A) Q-Bänderung der verwendeten Zelllinie mit einer Zentromerfusion einer Kopie von BTA14 mit einer Kopie von BTA20. Die schwarzen Pfeile bezeichnen jeweils BTA20. 1: Metaphase mit 57 Autosomen und den Geschlechtschromosomen BTAX und BTAY. 1': von links nach rechts: „Fusionschromosom“, BTA20, BTA14. 2-8: Zentromerfusionen von BTA14 und BTA20 verschiedener Metaphasen.

Abb.19: (S. 70B) Chromosomale Position eines BACs mit Kolonie-PCR-Produkt und eines BACs ohne Kolonie-PCR-Produkt. 1: BAC mit der TUM-Nr. 725 mit Hybridisierungssignal auf BTA20 (1': eine Kopie von BTA20 ist an der Zentromerfusion der verwendeten Zelllinie beteiligt). 2: BAC mit der TUM-Nr. 727 mit Hybridisierungssignal auf BTA15 (2': zwei Kopien von BTA15 tragen das FITC-Signal, das „Zentromerfusionschromosom“ trägt kein Signal).

Abb.20: (S. 70C) Position von vier BACs auf BTA20. 1: BAC für den Locus *ANPRC* (TUM-Nr. 518). 2: BAC für den Locus *HMGCS1* (TUM-Nr. 729). 3: BAC für den Locus *IL7R* (TUM-Nr. 507). 4: BAC für den Locus *SLCIA3* (TUM-Nr. 731). 1'-4': FITC-Signale der BACs auf BTA20.







3.6.1.2 Anordnung der BAC-Klone auf BTA20

Um die relative Lage der BAC-Klone, und damit der Loci, zueinander aufzuklären, wurde Zwei-Farben-FISH verwendet. Dabei wurde die BAC-DNA eines der Klone mit Biotin markiert und mit Cy3 detektiert und die DNA des anderen Klons mit Digoxigenin markiert und mit FITC detektiert (Abb. 21 S. 72A, Abb. 22 S. 72B).

Die paarweisen Hybridisierungen wurden in verschiedenen Experimenten, aufbauend auf dem Ergebnis der vorhergehenden Hybridisierungen, nacheinander durchgeführt. Die verwendeten Paarungen, sowie die Anzahl der beobachteten Reihenfolgen (2.7.7.3) sind in Tab. 17 dargestellt. Als „Überlappung“ werden alle Anordnungen bezeichnet, bei denen keine eindeutige Reihenfolge zu beobachten war. Überlappungen werden in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt. Die beiden Loci *BMS521* und *SDHA*, sowie die Loci *IL7R*, *LIFR* und *SLC1A3* konnten nicht zueinander angeordnet werden. Diese Loci konnten aber jeweils „als Block“ in die Gesamtreihenfolge eingeordnet werden. Die häufiger beobachtete Reihenfolge wurde als die korrekte Reihenfolge angenommen. Die so ermittelte Anordnung der Loci stellt sich dar als:

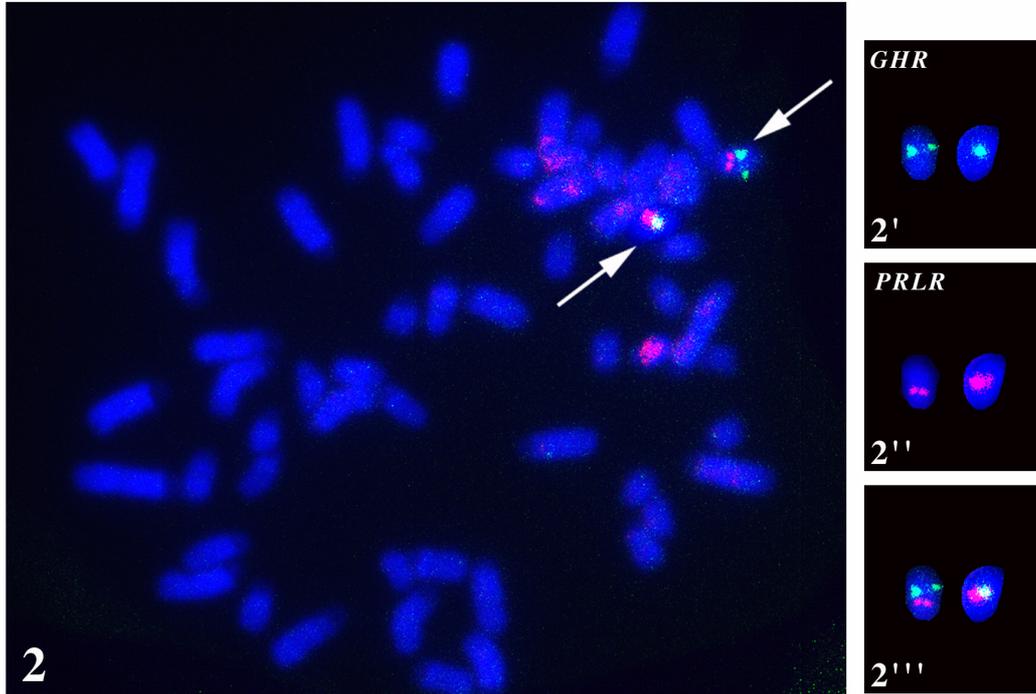
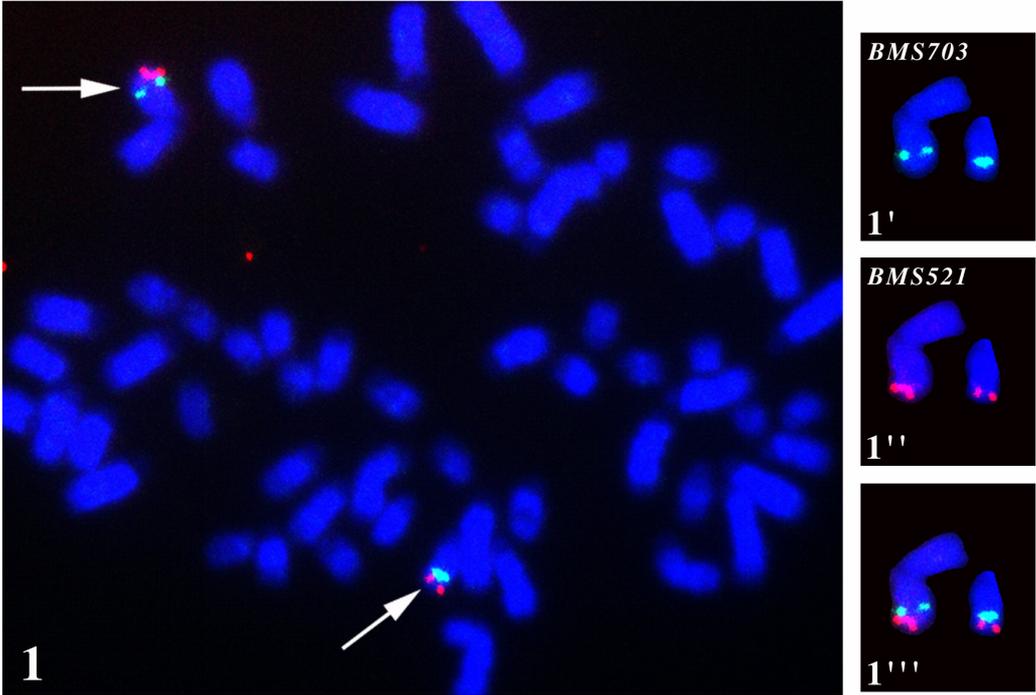
Zentromer – *MAP1B* (1)²⁰ – *BMS2461* (3) – *FST* (2) – *HMGCS1* (4) – *GHR* (5) – *IL7R* (8)/*LIFR* (7) /*SLC1A3* (9) – *PRLR* (6) – *ANPRC* (10) – *BMS703* (11) – *BMS521* /*SDHA* – Telomer

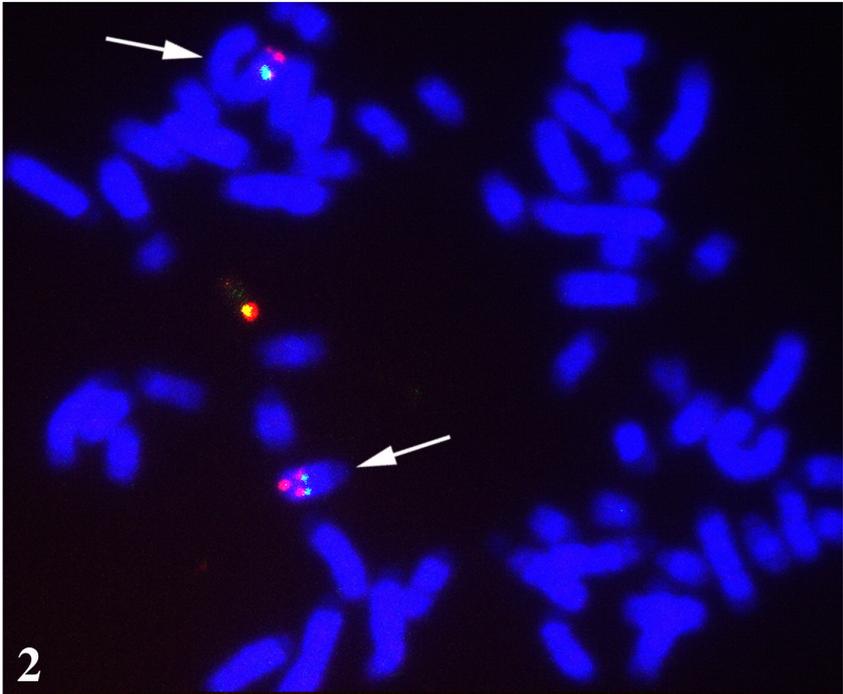
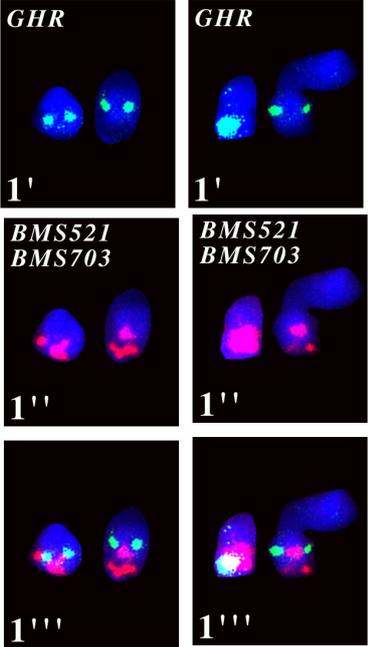
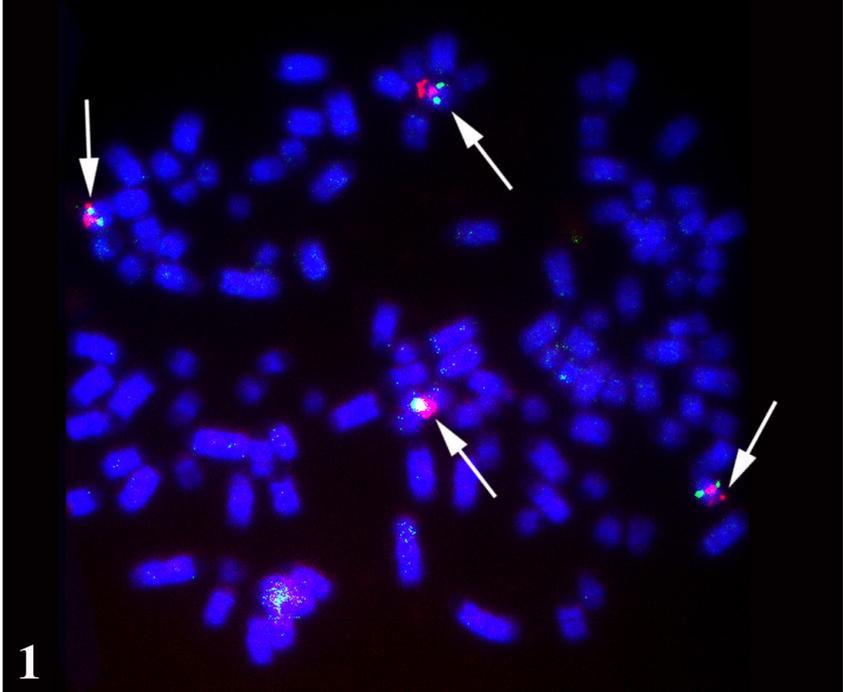
Für die statistische Auswertung der Reihenfolge wurden alle möglichen Anordnungen der Loci und deren Wahrscheinlichkeiten errechnet. Die 15 wahrscheinlichsten Anordnungen von 11 Loci (ohne *BMS521* und *SDHA*) sind in Tab. 18 und die drei „ersten Anordnungen“ zusätzlich graphisch in Abb. 23 dargestellt.

²⁰ Kodierung der Loci für die statistische Auswertung (2.7.7.3)

Abb.21: (S. 72A) Zwei-Farben-FISH der Loci *BMS521* und *BMS703*, sowie der Loci *GHR* und *PRLR*. 1: eine eindeutige Reihenfolge der Loci *BMS703* (1') und *BMS521* (1'') ist festzustellen (1''': Überlagerung der beiden Bilder). 2: auf einer der Kopien von BTA20 kann eine Reihenfolge der Loci *GHR* (2') und *PRLR* (2'') festgestellt werden, auf der anderen hingegen nicht.

Abb.22: (S. 72B) Zwei-Farben-FISH der Loci *BMS521* und *BMS703* und *GHR*, sowie *BMS521* und *BMS703* und *PRLR*. 1: auf einem Chromosom ist eine Reihenfolge der drei Loci *GHR* (1') und *BMS521* und *BMS703* (1'') zu erkennen (1''': Überlagerung der beiden Bilder). 2: eine Reihenfolge der Loci *BMS521* und *BMS703* (2'') ist erkennbar, die Auflösung von *BMS703* und *PRLR* (2') ist zweifelhaft (2''').





Tab.17: Zwei-Farben-FISH-Experimente zur Anordnung der Loci auf BTA20

Paarung Nr.	Anordnung der Signale		n ¹	Anzahl beobachteter Reihenfolgen		
	Probe 1	Probe 2		Reihenfolge 1 ²	Reihenfolge 2 ³	Überlappung
1	<i>ANPRC</i>	<i>BMS703</i>	10	3	1	6
2 ⁴	<i>BMS521</i>	<i>SDHA</i>	21	8	8	5
3 ⁴	<i>BMS703</i>	<i>BMS521</i>	21	21	0	0
4 ⁴	<i>BMS703</i>	<i>SDHA</i>	4	4	0	0
5	<i>BMS2461</i>	<i>ANPRC</i>	20	16	0	4
6	<i>BMS2461</i>	<i>FST</i>	20	7	4	9
7	<i>BMS2461</i>	<i>GHR</i>	20	10	2	8
8	<i>BMS2461</i>	<i>HMGCS1</i>	20	13	0	7
9	<i>BMS2461</i>	<i>IL7R</i>	19	17	0	2
10	<i>BMS2461</i>	<i>LIFR</i>	19	8	1	10
11	<i>BMS2461</i>	<i>SLCIA3</i>	20	10	0	10
12	<i>FST</i>	<i>GHR</i>	12	5	0	7
13	<i>FST</i>	<i>HMGCS1</i>	24	14	1	9
14	<i>FST</i>	<i>IL7R</i>	13	10	0	3
15	<i>FST</i>	<i>LIFR</i>	18	11	3	4
16	<i>FST</i>	<i>SLCIA3</i>	21	15	1	5
17	<i>GHR</i>	<i>ANPRC</i>	17	5	4	8
18	<i>GHR</i>	<i>BMS703</i>	20	14	0	6
19	<i>GHR</i>	<i>IL7R</i>	20	7	4	9
20	<i>GHR</i>	<i>LIFR</i>	17	7	2	8
21	<i>GHR</i>	<i>PRLR</i>	24	13	1	10
22	<i>GHR</i>	<i>SLCIA3</i>	14	6	2	6
23	<i>HMGCS1</i>	<i>ANPRC</i>	10	3	0	7
24	<i>HMGCS1</i>	<i>GHR</i>	20	5	2	13
25	<i>HMGCS1</i>	<i>LIFR</i>	22	13	3	6
26	<i>HMGCS1</i>	<i>PRLR</i>	13	11	0	2
27	<i>HMGCS1</i>	<i>SLCIA3</i>	20	9	1	10
28	<i>IL7R</i>	<i>LIFR</i>	22	5	5	12
29	<i>IL7R</i>	<i>PRLR</i>	10	2	0	8
30	<i>IL7R</i>	<i>SLCIA3</i>	14	4	2	8
31	<i>LIFR</i>	<i>ANPRC</i>	21	12	1	8
32	<i>LIFR</i>	<i>BMS703</i>	20	15	1	4
33	<i>LIFR</i>	<i>PRLR</i>	20	8	1	11
34	<i>LIFR</i>	<i>SLCIA3</i>	8	3	3	2
35	<i>MAP1B</i>	<i>BMS2461</i>	22	20	0	2
36	<i>MAP1B</i>	<i>FST</i>	12	10	0	2
37	<i>MAP1B</i>	<i>HMGCS1</i>	17	17	0	0
38	<i>PRLR</i>	<i>ANPRC</i>	40	13	8	19
39	<i>PRLR</i>	<i>BMS703</i>	19	11	0	8
40	<i>SLCIA3</i>	<i>ANPRC</i>	16	7	1	8
41	<i>SLCIA3</i>	<i>PRLR</i>	18	6	4	8

¹Anzahl der untersuchten Chromosomen²Reihenfolge beobachtet als Probe 1 proximal, Probe 2 distal³Reihenfolge beobachtet als Probe 1 distal, Probe 2 proximal⁴dieser Datensatz wurde in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt

Tab.18: Die 15 wahrscheinlichsten Anordnungen von 11 Loci auf BTA20

Nr.	Anordnung ¹	Wahrscheinlichkeit ²	„odds ratio“ ³
1	1-3-2-4-5-7-8-9-6-10-11	0,071544	1
2	1-3-2-4-5-8-7-9-6-10-11	0,071544	1
3	1-3-2-4-5-8-9-7-6-10-11	0,071544	1
4	1-3-2-4-5-7-8-6-9-10-11	0,027057	2,64
5	1-3-2-4-5-8-7-6-9-10-11	0,027057	2,64
6	1-3-2-4-5-7-9-8-6-10-11	0,020957	3,41
7	1-3-2-4-5-9-7-8-6-10-11	0,020957	3,41
8	1-3-2-4-5-9-8-7-6-10-11	0,020957	3,41
9	1-2-3-4-5-7-8-9-6-10-11	0,017204	4,16
10	1-2-3-4-5-8-7-9-6-10-11	0,017204	4,16
11	1-2-3-4-5-8-9-7-6-10-11	0,017204	4,16
12	1-3-2-4-8-5-7-9-6-10-11	0,017204	4,16
13	1-3-2-4-8-5-9-7-6-10-11	0,017204	4,16
14	1-3-2-8-4-5-7-9-6-10-11	0,017204	4,16
15	1-3-2-8-4-5-9-7-6-10-11	0,017204	4,16

¹Kodierung der Loci: 1 = *MAP1B*, 2 = *FST*, 3 = *BMS2461*, 4 = *HMGCS1*, 5 = *GHR*, 6 = *PRLR*, 7 = *LIFR*, 8 = *IL7R*, 9 = *SLCIA3*, 10 = *ANPRC*, 11 = *BMS703*

²die beobachtete Anordnung ist aufgrund der vorliegenden Daten mit der angegebenen Wahrscheinlichkeit korrekt

³Verhältnis der Wahrscheinlichkeiten für die wahrscheinlichste Anordnung und die jeweils angegebene Anordnung

Es ergaben sich drei mögliche Reihenfolgen mit der größten Wahrscheinlichkeit von 7,15 %. Diese drei Reihenfolgen unterschieden sich in der Anordnung der Loci *IL7R*, *LIFR* und *SLCIA3*, welche nicht zueinander angeordnet werden konnten. Sie konnten aber in die Gesamtreihenfolge eingeordnet werden. Die beiden Reihenfolgen mit der zweitgrößten Wahrscheinlichkeit von 2,7 % unterscheiden sich von den drei „ersten Reihenfolgen“ durch die Anordnung der Loci *PRLR* und *SLCIA3*. Variationen innerhalb der vier beobachteten „Wahrscheinlichkeitsstufen“ (7,15 %, 2,7 %, 2,1 % und 1,7 %) der 15 wahrscheinlichsten Anordnungen kommen durch die Variation der Position der drei Loci *IL7R*, *LIFR* und *SLCIA3* zustande. Die Reihenfolge der letzten beiden Loci *ANPRC* und *BMS703*, sowie die Position von *MAP1B* bleiben unbestritten.

In einem weiteren Versuch wurden die drei Loci *IL7R*, *LIFR* und *SLCIA3* zu einem Locus zusammengefasst und die jeweiligen Datensätze (Tab. 17) angepasst. Dabei ergaben sich nur Reihenfolgen mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten. Die 15 wahrscheinlichsten Anordnungen sind in Tab. 19 dargestellt. Die größte ermittelte Wahrscheinlichkeit betrug 48 %.

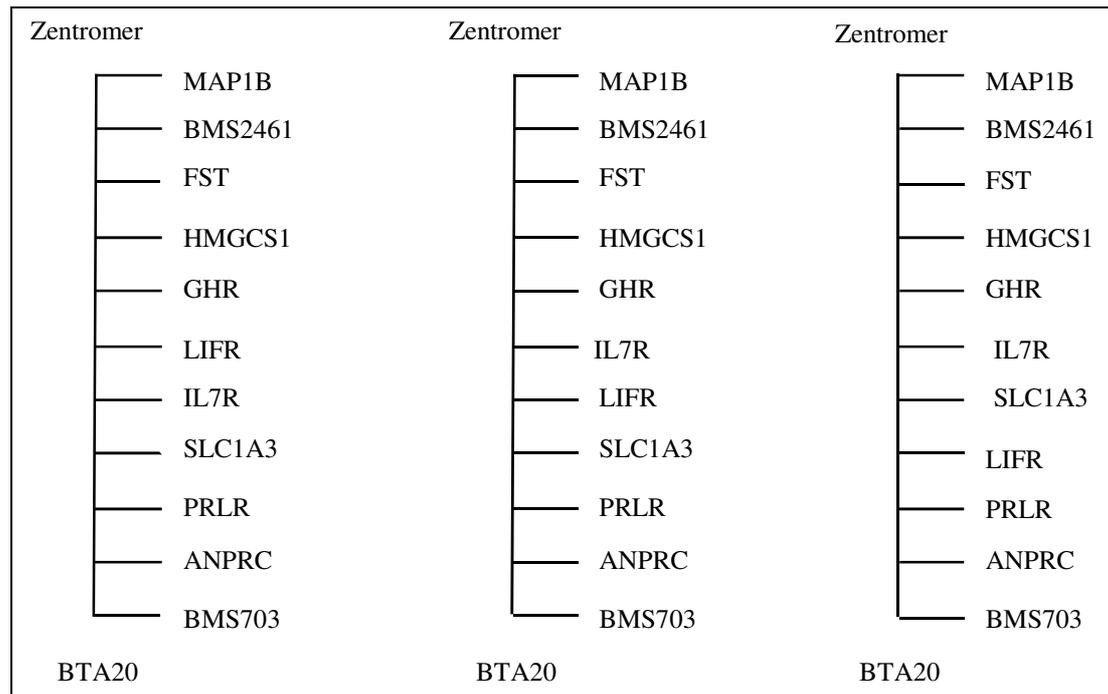


Abb.23: Darstellung der drei wahrscheinlichsten Anordnungen von 11 Loci auf BTA20.

Tab.19: Die 15 wahrscheinlichsten Reihenfolgen der Loci auf BTA20, ermittelt unter „Zusammenfassen“ der drei Loci *IL7R*, *LIFR* und *SLC1A3*

Nr.	Anordnung ¹	Wahrscheinlichkeit ²	„odds ratio“ ³
1	1-3-2-4-5-7-6-8-9	0,48304	1
2	1-2-3-4-5-7-6-8-9	0,11615	4,16
3	1-3-2-4-5-7-6-9-8	0,11147	4,33
4	1-3-2-5-4-7-6-8-9	0,08161	5,92
5	1-3-2-4-5-7-8-6-9	0,08069	5,99
6	1-2-3-4-5-7-6-9-8	0,02680	18,02
7	1-2-3-5-4-7-6-8-9	0,01962	24,62
8	1-2-3-4-5-7-8-6-9	0,01940	24,90
9	1-3-2-5-4-7-6-9-8	0,01883	25,65
10	1-3-2-5-4-7-8-6-9	0,01363	35,44
11	1-3-2-4-7-5-6-8-9	0,00590	81,87
12	1-2-3-5-4-7-6-9-8	0,00453	106,63
13	1-3-2-4-5-6-7-8-9	0,00412	117,24
14	1-2-3-5-4-7-8-6-9	0,00328	147,27
15	1-2-3-4-7-5-6-8-9	0,00142	340,17

¹Kodierung der Loci: 1 = *MAP1B*, 2 = *FST*, 3 = *BMS2461*, 4 = *HMGCS1*, 5 = *GHR*, 6 = *PRLR*, 7 = *IL7R/LIFR/SLC1A3*, 8 = *ANPRC*, 9 = *BMS703*

²die beobachtete Anordnung ist aufgrund der vorliegenden Daten mit der angegebenen Wahrscheinlichkeit korrekt

³Verhältnis der Wahrscheinlichkeiten für die wahrscheinlichste Anordnung und die jeweils angegebene Anordnung

3.6.2 Kartierung von BTA20 mittels Analyse eines *Radiation Hybrid Panels*

Die sieben Loci *ANPRC*, *BMS2461*, *FST*, *GHR*, *IL7R*, *PRLR*, *SDHA* wurden durch Screenen des bovinen *Radiation Hybrid Panels* BOVRH5 (Womack et al. 1997) in die bestehende *Radiation Hybrid* Karte des Rindes (Band et al. 2000) eingefügt (Tab. 20, Abb. 24).

Tab.20: Ergebnisse des Screenens des *Radiation Hybrid Panels* BOVRH5

Locus	Distanz in centiRay ₅₀₀₀ ¹	Retentionsfrequenz ²
<i>BM3517</i> ³	8,9	
<i>LCP2</i>	14,7	
<i>DOCK2</i>	22,6	
<i>BM1225</i> ³	19,6	
<i>EST1065</i>	2,5	
<i>ILSTS085</i>	1,8	
<i>SMN1</i>	17,3	
<i>BTF3</i> ³	19,4	
<i>RM310</i> ³	23,1	
<i>FST</i> ⁴	0,0	12 %
<i>BMS2461</i> ⁴	2,9	14 %
<i>TGLA126</i> ³	23,4	
<i>ITGA2</i> ³	5,5	
<i>BM713</i>	4,5	
<i>EST0008</i>	9,7	
<i>EST1289</i> ³	16,7	
<i>NNT</i> ³	8,2	
<i>GHR</i> ^{3/4}	7,3	17,6 %
<i>BMS431</i> ³	12,3	
<i>PRLR</i> ⁴	0,0	13,6 %
<i>IL7R</i> ^{3/4}	9,4	13,6 %
<i>ANPRC</i> ⁴	24,7	10,2 %
<i>BMS1120</i> ³		

¹der Abstand ist jeweils angegeben zwischen dem betreffenden Locus und dem in der folgenden Zeile

²nur angegeben für die eingefügten Loci; die Retentionsfrequenz für *SDHA* beträgt 12,5 %

³*Framework* Marker, diese Marker wurden mit einem *LOD score* (1.2.1) über 3 in die Karte eingefügt, das bedeutet eine Kopplung mit angrenzenden Markern ist mind. 1000 mal wahrscheinlicher als keine Kopplung

⁴im Rahmen der vorliegenden Arbeit in die Karte von BTA20 eingefügt

Der Locus *SDHA* konnte nicht platziert werden, aber die wahrscheinlichste Kopplung ergab sich mit *ANPRC*. Die resultierende Karte für BTA20 ist in Abb. 24 dargestellt.

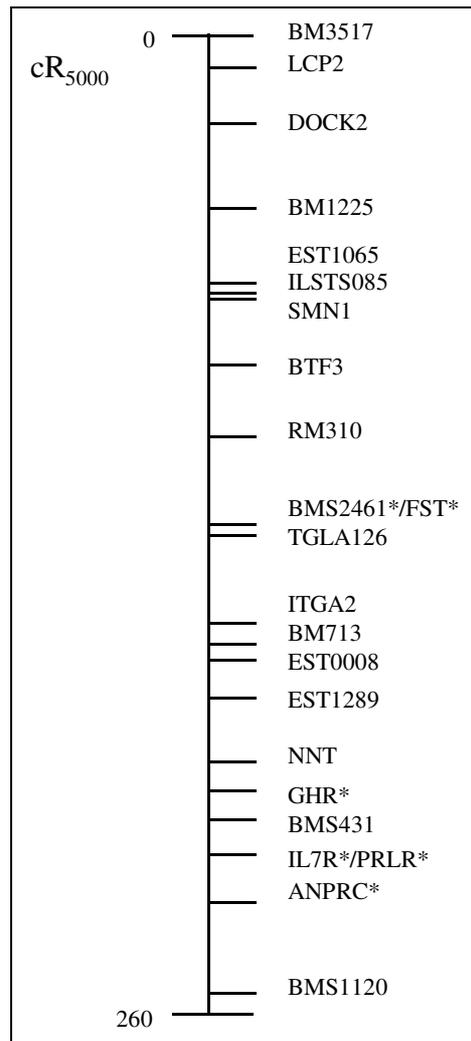


Abb.24: Radiation Hybrid Karte von BTA20 nach dem Einfügen von 7 Loci (gekennzeichnet mit *).

3.7 Anordnung der ausgewählten Loci auf BTA20 und HSA5

Die ausgewählten Loci wurden zunächst einzeln auf BTA20 kartiert. Die Anordnung der Loci aufgrund ihrer FLCen-Werte ist in Abb. 25 dargestellt. FLCen-Werte von Loci, für die mehrere Klone hybridisiert wurden, finden sich in Tab. 21. Basierend auf den FLCen-Werten wurde die physische Distanz zwischen den Loci geschätzt (Tab. 21). Einige der Loci wiesen identische FLCen-Werte auf. Mittels Zwei-Farben-FISH sollte die Anordnung überprüft und, wenn möglich, eine bessere Auflösung erzielt werden. Die Kartierung der Loci mittels Zwei-Farben-FISH führte zwar zu einer Auflösung der Loci mit identischen FLCen-Werten (*ANPRC*, *GHR*, *IL7R* und *PRLR*, *SLC1A3*), konnte aber andere Loci nicht auflösen (*IL7R*, *LIFR*, *SLC1A3* und *BMS521*, *SDHA*) und es wurde insgesamt eine andere Reihenfolge der Loci ermittelt.

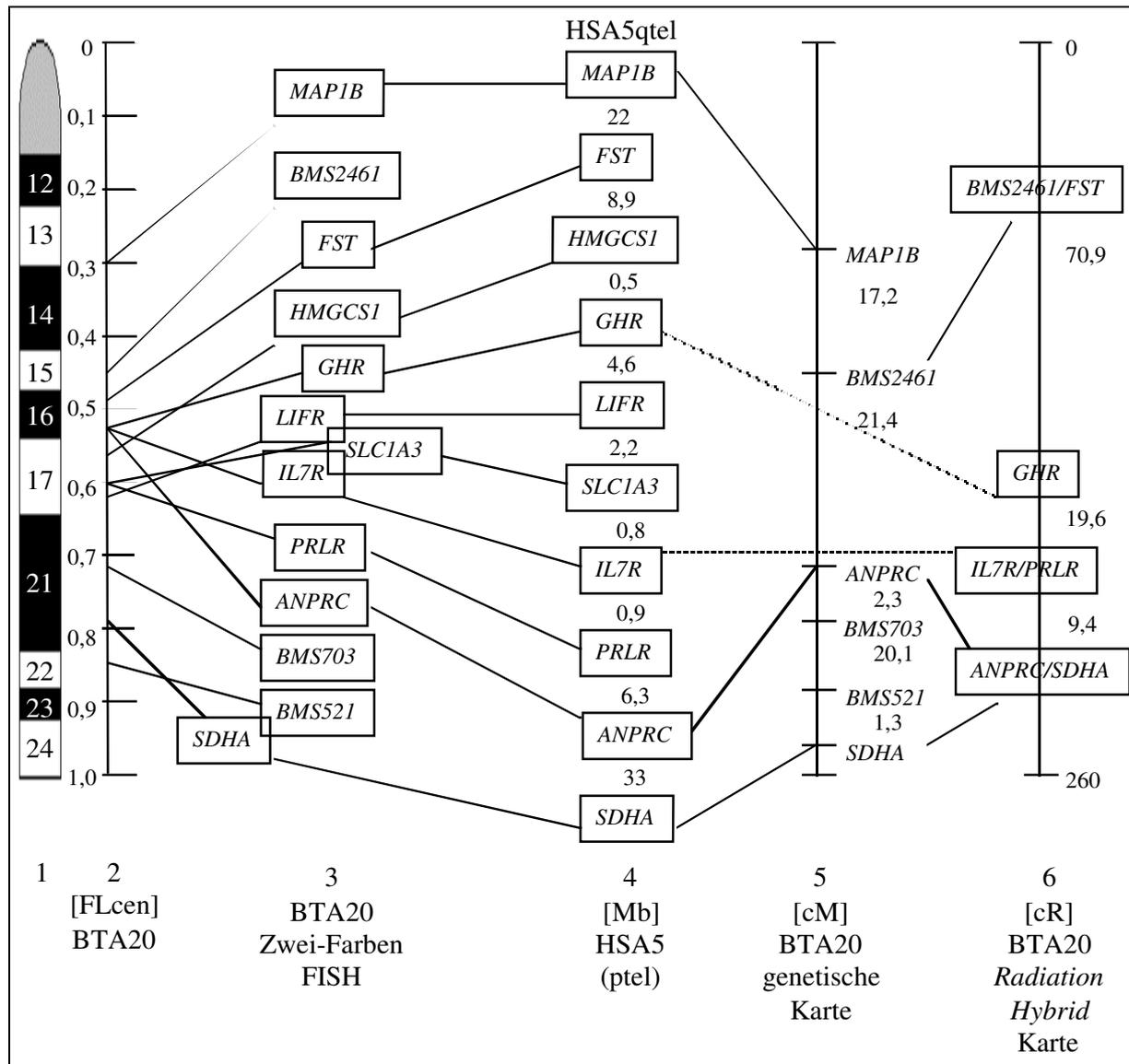


Abb.25: Anordnung der kartierten Loci auf BTA20 und HSA5. Die Zahlen unter den Loci geben die Abstände zum jeweils „nächsten“ Locus an. 1: Idiogramm von BTA20 mit: Zentromer FLcen = 0, Telomer FLcen = 1. 2: Reihenfolge der Loci ermittelt aufgrund der FLcen-Werte (Tab. 16 und Tab. 21). 3: Anordnung der Loci auf BTA20 ermittelt durch Zwei-Farben-FISH; „überlappende“ Loci konnten nicht aufgelöst werden. 4: Abstand der Loci auf HSA5 in Mb, ermittelt durch Sequenzierung (Lander et al. 2001). 5: Abstand der Loci auf BTA20 in cM, ermittelt durch Kopplungsanalyse (Kappes et al. 1997). 6: Abstand der Loci auf BTA20 in cR₅₀₀₀, ermittelt durch das Screenen des *Radiation Hybrid Panels* BOVRH5 (3.6.2, Tab. 20).

Sieben Loci wurden in die *Radiation Hybrid* Karte eingefügt. Die Reihenfolge der Loci, die hierbei ermittelt wurde, unterstützt die, wie sie durch Zwei-Farben-FISH ermittelt wurde, jedoch ist die mit dem *Panel* erreichte Auflösung hier geringer als die der FISH. Einige der verwendeten Loci sind beim Rind genetisch kartiert. Dies betrifft 6 Loci, von denen 4 dieselbe Reihenfolge in allen Experimenten zeigen. Die Reihenfolge der Loci *BMS521* und *SDHA*

ist widersprüchlich auf der genetischen Karte und bei der „Einzelkartierung“ der Loci. Mittels Zwei-Farben-FISH konnte die Position dieser Loci nicht aufgelöst werden.

Die Reihenfolge der ausgewählten Gene beim Menschen entspricht der, wie sie durch Zwei-Farben-FISH ermittelt wurde. Hier sind auch die drei Loci *IL7R*, *LIFR* und *SLC1A3*, die im Rahmen dieser Arbeit keine eindeutige Auflösung zeigten, angeordnet.

Tab.21: FLcen-Werte der Loci auf BTA20

Locus	FLcen	Distanz in Mb ¹	Anzahl Messungen
<i>MAP1B</i>	0,31 ± 0,02	12,4	3
<i>BMS2461</i>	0,46 ± 0,08	1,7	93
<i>FST</i>	0,48 ± 0,08	4,1	37
<i>ANPRC</i>	0,53 ± 0,10	0	14
<i>GHR</i>	0,53 ± 0,08	0	35
<i>IL7R</i>	0,53 ± 0,09	0,8	17
<i>HMGCS1</i>	0,54 ± 0,10	5	42
<i>PRLR</i>	0,60 ± 0,06	0	12
<i>SLC1A3</i>	0,60 ± 0,10	0,8	21
<i>LIFR</i>	0,61 ± 0,08	8,3	16
<i>BMS703</i>	0,71 ± 0,06	5,8	32
<i>SDHA</i>	0,78 ± 0,08	5,8	14
<i>BMS521</i>	0,85 ± 0,04		14

¹jeweils zwischen dem angegeben Locus und dem in der nächsten Zeile, Abstand ermittelt aufgrund der gemessenen FLcen Werte (s. auch Tab. 16) unter der Annahme BTA20 entspricht 2,75 % des Rindergenoms (Fries und Popescu 1999), bei einer Gesamtgröße des Rindergenoms von 3×10^9 Basenpaaren entspricht dies 82,5 Mb, ein FLcen von 1 entspricht somit 82,5 Mb

3.8 Identifizierung von *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs)

Vier Loci wurden durch Sequenzierung eines Testpanels von Tieren auf SNPs untersucht. Die DNA-Sequenz wurde mit der Software GCG® Wisconsin Package™ der University of Wisconsin, USA, mit der Option „translate“ in Aminosäuren umgeschrieben, um festzustellen, ob Basenaustausche zu Aminosäureaustauschen führen. Der korrekte Leserahmen wurde durch Umschreiben der Sequenz jeweils beginnend bei Base 1, 2 oder 3 und Vergleich der resultierenden Aminosäuresequenz mit der in der Datenbank vorliegenden Aminosäuresequenz (human oder bovin) bestimmt.

Die SNPs wurden in der Sequenz gesucht, die von den zuvor erstellten Primersystemen amplifiziert wird und befinden sich somit im kodierenden Bereich. SNPs wurden für die Loci *FST*, *GHR*, *IL7R* und *PRLR* identifiziert (Tab. 22).

Tab.22: SNPs in Exonen von vier Kandidatengen

Locus	Sequenz	Primerbindestelle ¹	Position bp-A ²	Art Austausch (1 --> 2) ³	Aminosäureaustausch	PAM 250 ⁴	Rasse
<i>FST</i>	L21716	736-757	72	C --> G	Prolin --> Alanin	1	Schwarzbunt-Pool
<i>GHR</i>	AF044258	1355-1374	1486	T --> C			Hariana
			1495	A --> G			Sahiwal
			1499	G --> A	Asparaginsäure --> Asparagin	2	Angus
			1519	T --> C ⁵			Angus
			1612	C --> T			Sahiwal
			1620	C --> A	Threonin --> Asparagin	0	Angus, Hariana, Kerry, Sahiwal, Schwarzbunt
			1643	G --> A ⁵	Alanin --> Threonin	1	Angus
			1672	C --> T ⁵			Kerry, Sahiwal, Schwarzbunt
			1700	G --> A ⁵	Serin --> Glycin	1	Angus, Fleckvieh, Hariana, Kerry, Sahiwal, Schwarzbunt
<i>IL7R</i>	XM_004013	919-940	208	G --> T	Valin --> Leucin	2	Sahiwal
<i>PRLR</i>	L02549	1636-1654	1754	A --> G			Fleckvieh, Sahiwal
			1769	G --> T			Sahiwal
			1775	G --> A			Sahiwal
			1847	C --> T	3'-UTR ⁶		Sahiwal
			1914	G --> C	3'-UTR ⁶		Fleckvieh, Sahiwal

¹angegeben in Basenpaaren bezogen auf die in der Datenbank vorliegende Sequenz, deren *GenBank Accession no.* in Spalte 2 angegeben ist

²Basenaustausch, angegeben in bp ab Primerbindestelle, wobei die erste Base nach der Primerbindestelle Base Nr. 1 ist

³1 --> 2: alle Tiere weisen an dieser Position die Base 1 auf, bis auf die unter „Rasse“ aufgeführten, die an dieser Position die Base 2 aufweisen

⁴Werte aus der „PAM250 scoring matrix“ (Dayhoff et al. 1978, URL 13) die als Entscheidungshilfe diente, ob die Aminosäureaustausche konservativer Natur sind oder nicht; je „positiver“ der Wert, desto „konservativer“ der Austausch, die „PAM250 scoring matrix“ weist Werte von -8 bis +17 auf

⁵beschrieben von Ge et al. (2000)

⁶UTR = untranslatierte Region

Im PCR-Produkt des Locus *FST* wurde ein Basenaustausch im Schwarzbunt-*Pool* festgestellt. Dieser Austausch führt zu einer Substitution der Aminosäure Prolin gegen Alanin. Da beide Aminosäuren zu derselben Gruppe gehören, ist anzunehmen, dass es sich um einen konservativen Austausch handelt. Im Exon 10 des Wachstumshormonrezeptors (*GHR*) fanden sich

9 Basenaustausche, von denen vier zu Aminosäureaustauschen führen. Vier dieser SNPs wurden bereits von (Ge et al. 2000) beschrieben. Bei zweien der vier bereits beschriebenen SNPs kommt es zu Basenaustauschen. Bei allen beobachteten Austauschen ist zu vermuten, dass diese eher konservativer Natur sind (Tab. 22). Zwei der Aminosäureaustausche sind Polymorphismen, die in der Rasse Angus beobachtet wurden. Die anderen beiden Austausche betreffen sowohl *Bos taurus indicus* (Hariana und Sahiwal) als auch *Bos taurus taurus* (Angus, Fleckvieh, Kerry, Schwarzbunt). Drei der Basenaustausche, die keinen Aminosäureaustausch zur Folge haben, betreffen nur *Bos taurus indicus*, während ein weiterer dieser SNPs nur die Rasse Angus betrifft und der verbleibende *Bos taurus taurus* (Kerry und Schwarzbunt) und *Bos taurus indicus* (Sahiwal). Im Locus *IL7R* wurde ebenfalls ein Basenaustausch festgestellt, der zum Austausch von Valin gegen Leucin führt. Beide Aminosäuren gehören zur Gruppe derjenigen mit reinen Kohlenwasserstoff-Seitenketten. Im Exon 10 des Prolaktinrezeptors (*PRLR*) wurden 5 Basenaustausche beobachtet, von denen keiner zu einem Aminosäureaustausch führt. Drei der Basenaustausche wurden nur in der Rasse Sahiwal (*Bos taurus indicus*) beobachtet. Die beiden anderen Austausche wurden sowohl bei *Bos taurus taurus* als auch bei *Bos taurus indicus* in den Rassen Fleckvieh und Sahiwal beobachtet.

4 Diskussion

Ein Ziel der Erforschung von Nutztiergenomen ist die Aufklärung komplexer physiologischer Funktionen auf der Basis von DNA-Variation. Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist die Erstellung hochauflösender physischer Karten für die Genomregion von Interesse. Dies wurde erst durch die Entwicklung von *Large Insert Libraries* möglich (Ioannou und de Jong 1996, Shizuya et al. 1992).

Im Rahmen des humanen Genomprojektes wurden 1992 *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC)-Banken eingeführt (Shizuya et al. 1992). Für die Sequenzierung des humanen Genoms durch das International Human Genome Sequencing Consortium wurden zunächst vollständige physische Karten aller humanen Chromosomen basierend auf BACs erstellt (McPherson et al. 2001). Diese BAC-Klone wurden sequenziert und daraus die *Draft*-Sequenz entwickelt (Lander et al. 2001). Für die Sequenzierung des Genoms der Maus werden ebenfalls BAC-Banken verwendet (URL 14). Auch für die Erforschung von Nutztiergenomen werden BAC-Banken eingesetzt, z. B. für die positionelle Klonierung des *callipyge* Gens beim Schaf (Berghmans et al. 2001) und für die gezielte Markerentwicklung (Mikrosatelliten und SNPs) für die Feinkartierung von QTL (Riquet et al. 1999).

4.1 Erstellung der BAC-Bank

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit existierte eine bovine BAC-Bank (Cai et al. 1995) mit einer einfachen Genomabdeckung, die nicht öffentlich verfügbar war. Mit der Erstellung der hier beschriebenen BAC-Bank sollte eine der Öffentlichkeit zur Verfügung stehende Ressource für die Erforschung des Rindergenoms geschaffen werden. Die parallel erstellte BAC-Bank von Zhu et al. (1999) sollte durch die hier beschriebene BAC-Bank ergänzt werden. Dies scheint der Fall zu sein, wie sich an den Ergebnissen des Screenens beider Banken mit denselben Sonden zeigt, wobei in mehreren Fällen aus einer BAC-Bank, positive Klone für den jeweiligen Locus isoliert werden konnten, hingegen nicht aus der anderen Bank (Tab. 12 und 16, Ergebnisse, Tab 29A, Anhang).

Siegel et al. (2000) definieren eine erfolgreiche Genomsequenzierung als eine ununterbrochene Abfolge von Contigs für jedes (humane) Chromosom, wobei mehr als 99 % des Genoms abgedeckt werden müssen. Der wichtigste Faktor, der die Anordnung von Contigs beeinflusst ist die *mapping redundancy* (Roach et al. 1995). Das Genom von *Drosophila melanogaster* wurde ausgehend von einer BAC-Bank mit einer 23fachen Abdeckung des Genoms sequenziert (Adams et al. 2000). Für die Sequenzierung des humanen Genoms durch das International Human Genome Sequencing Consortium wurden BAC-Banken verwendet, die das humane Genom insgesamt 111,3fach abdecken (Lander et al. 2001). Die Klone, die aus diesen Banken ausgewählt wurden, weisen eine 18,2fache Abdeckung des humanen Genoms auf (Lander et al. 2001). Das bovine Genom wird derzeit 28fach mit BAC-Klonen abgedeckt (Eggen et al. 2001). Die von uns erstellte BAC-Bank trägt mit ihrer dreifachen Genomabdek-

kung zu der Ressource bei, die bei einer eventuellen Sequenzierung des Rindergenoms nötig sein könnte. Weiterhin kann diese BAC-Bank einen Beitrag bei der Suche nach SNPs leisten. Warren et al. (2000) und Eggen et al. (2001) verwendeten für die Erstellung ihrer BAC-Banken DNA von Tieren der Rasse Holstein-Friesian (Tab. 1, Einleitung). Auch für die Erstellung der hier beschriebenen BAC-Bank wurde die DNA eines Tieres dieser Rasse verwendet. Da dieses Tier von der zur Technischen Universität München gehörenden Versuchstation Thalhausen stammt, ist es ausgeschlossen, dass diese DNA-Quelle identisch ist mit einer der anderen verwendeten DNA-Quellen. Die DNA für die BAC-Bank von Cai et al. (1995) wurde von einem Tier der Rasse Angus gewonnen und die der BAC-Bank von Zhu et al. (1999) von einem Tier der Rasse Jersey.

4.1.1 Durchschnittliche Insertgrößen

Eines der Ziele bei der Erstellung der BAC-Bank war eine durchschnittliche Insertlänge von über 100 kb. Mit den unterschiedlichen „Cut-off“-Grenzen bei der Entfernung der kleinen Fragmente mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE, 2.1.1.3) wurden in den beiden Teilen der BAC-Bank unterschiedliche durchschnittliche Insertgrößen erreicht, die für die gesamte BAC-Bank eine Länge von 112 kb ergaben (Tab. 6 und Abb. 11, Ergebnisse).

Die Kapazität von BAC-Vektoren wird auf ca. 1 Megabasenpaar (Mb) geschätzt (Shizuya et al. 1992). Die beobachteten Insertgrößen sind aber deutlich geringer. Üblicherweise werden Bereiche von 100-200 kb beobachtet (Anderson et al. 2000).

Faktoren, die die Insertlänge beeinflussen, und die für die Erstellung der hier beschriebenen BAC-Bank optimiert wurden, sind:

- die Bedingungen des Partialverdaus (2.1.1.2)
- die Größenfraktionierung der DNA-Fragmente mittels PFGE (2.1.1.3)
- die Elektroporationsbedingungen (2.1.2.3)

4.1.1.1 Partialverdau

Mit dem Partialverdau sollen DNA-Fragmente, die von möglichst einheitlicher Größe, aber noch klonierbar sind, erzeugt werden. Dies wird während des Restriktionsverdaus über die Menge des eingesetzten Enzyms und über die Reaktionsdauer gesteuert. Viele Autoren verwendeten Verdauzeiten bis max. 45 Minuten (Cai et al. 1995, Schibler et al. 1998, Shizuya et al. 1992, Warren et al. 2000, Zimmer und Verrinder Gibbins 1997). Diese Verdauzeiten wurden auch bei der Erstellung der hier beschriebenen BAC-Bank getestet. Damit wurde aber sehr viel unverdaute DNA und eine sehr heterogene Verteilung der erzeugten DNA-Fragmente beobachtet. Daher wurde der Partialverdau für die Dauer von 1,5 Stunden durchgeführt (2.1.1.2).

Bei den Enzymmengen, die zur Erstellung anderer BAC-Banken eingesetzt wurden, ist keine Tendenz zu erkennen. Sie reichen von 0,1 U/ μ g DNA bei BAC-Banken, die so unterschiedliche Insertlängen wie 103 kb (Gill et al. 1999) und 165 kb (Warren et al. 2000) aufweisen, bis

zu 5 U/ μ g DNA (Zimmer und Verrinder Gibbins 1997). Zu erwarten wäre, dass die durchschnittlich erreichte Insertlänge, bei Einsatz einer größeren Menge an Enzym, bei gleicher Verdauzeit, sinkt. Dies scheint nicht der Fall zu sein, wie die BAC-Bank des Huhns von Zimmer und Verrinder Gibbins (1997) zeigt. Diese weist mit 490 kb die größte Insertlänge von allen hier zitierten BAC-Banken auf, obwohl die größte Menge an Enzym eingesetzt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 0,75 U/ μ g DNA eingesetzt, da damit die homogensten DNA-Fragmentlängen im angestrebten Größenbereich von etwa 200 kb erreicht wurden.

4.1.1.2 Größenfraktionierung der erzeugten DNA-Fragmente

Die Größenfraktionierung der DNA-Fragmente vor der Ligation wird mittels PFGE durchgeführt. Ein Ziel ist es, die kleinen DNA-Fragmente, die durch effizienteres Einklonieren die durchschnittlich zu erreichende Insertlänge erheblich verringern würden, möglichst vollständig zu entfernen. Zu diesem Zweck werden unterschiedliche Strategien angewendet. Eine Vorgehensweise ist es, die DNA-Fragmente einmal aufzutrennen, die gewünschten Größenbereiche auszuschneiden und für die Klonierung zu verwenden. Diese Vorgehensweise wurde unter anderem von Shizuya et al. (1992) verwendet. Gill et al. (1999) sprechen sich für eine einfache Auftrennung der DNA-Fragmente aus, um die Effizienz der Herstellung von BAC-Banken zu maximieren. Ebenso wie Cai et al. (1995) beobachteten sie eine um das 10fache geringere Transformationseffizienz nach der doppelten Auftrennung der DNA-Fragmente.

Die doppelte Auftrennung der DNA-Fragmente soll kleine Fragmente eliminieren, die während der ersten Auftrennung zusammen mit der gewählten DNA-Größenfraktion im Gel migriert sind (Zimmer und Verrinder Gibbins 1997). Osoegawa et al. (1998) verwendeten eine Strategie, die sie „pseudo-double-sizing procedure“ nannten. Als Ergebnis von zwei Auftrennungsschritten innerhalb eines Gels erhielten sie, verglichen mit einer einfachen Auftrennung, durchschnittlich größere *Inserts* mit einer einheitlicheren Längen-Verteilung. Eine ähnliche Strategie wurde für die Erstellung der hier beschriebenen BAC-Bank angewendet (2.1.1.3).

Der entscheidende Faktor bei der Größenfraktionierung der DNA-Fragmente scheint allerdings der Größenbereich zu sein, welcher aus der ersten Auftrennung weiterverwendet wird. Die BAC-Banken von Shizuya et al. (1992) und Gill et al. (1999) weisen durchschnittliche Insertlängen von 100 kb bzw. 103 kb auf. Für ihre Erstellung wurden die Größenbereiche von 100-300 kb bzw. 50-250 kb verwendet. Für die Erstellung von BAC-Banken mit einer durchschnittlichen Insertlänge über 130 kb wurde der von Shizuya et al. (1992) und Gill et al. (1999) unter anderem verwendete Größenbereich von unter 150 kb verworfen (Anderson et al. 2000, Cai et al. 1995, Li et al. 1999, Warren et al. 2000). Bei der Erstellung dieser BAC-Banken wurde für die Klonierung nur der Größenbereich von 150-500 kb verwendet. Für die Erstellung der BAC-Bank von Zimmer und Verrinder Gibbins (1997) wurde zusätzlich der Größenbereich von 500-700 kb verwendet. Ähnliches wurde im Rahmen dieser Arbeit beobachtet. Für den ersten Teil der BAC-Bank wurde der Größenbereich über 150 kb für die Klonierung verwendet, für den zweiten Teil derjenige über 75 kb (2.1.1.3). Die Wirkung der unterschiedlichen „Cut-off“-Grenzen zeigt sich an der durchschnittlichen Insertlänge von 132 kb bzw. 91 kb für die beiden Teile der BAC-Bank (Tab. 6 und Abb. 11, Ergebnisse).

4.1.1.3 Elektroporation

Zimmer und Verrinder Gibbins (1997) führen die wesentlich längeren *Inserts* ihrer BAC-Bank von durchschnittlich 490 kb auf die Elektroporationsbedingungen zurück. Sie untersuchten die Transformationseffizienzen unterschiedlich großer Plasmide. Zu diesem Zweck variierten sie die Spannung von 13 kV/cm bis 25 kV/cm. Die höchste Transformationseffizienz für Plasmide mit einer Größe von 450 kb wurde bei einer Spannung von 13 kV/cm ermittelt. Zwar wurden auch bei Verwendung dieser Spannung kleinere Plasmide effizienter inkloniert als große, aber nicht in dem Verhältnis, wie es bei höheren Spannungen der Fall war.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Elektroporationsbedingungen getestet. Dies betraf die Parameter Spannung, Widerstand und Kapazität. Sie wurden im Hinblick auf die durchschnittliche Insertlänge und die Ligationseffizienz (Anzahl cfu pro μg DNA bzw. pro μl Ligationsreaktion) beurteilt. Es wurde kein Effekt auf die durchschnittliche Insertlänge beobachtet, daher wurden die Angaben des Herstellers des verwendeten Gerätes befolgt (2.1.2.3).

Die oben beschriebenen Faktoren beeinflussen die „Erzeugung“ von Insertlängen. Um Aussagen bezüglich einer Insertlänge treffen zu können, ist aber auch deren Ermittlung von Bedeutung. Schibler et al. (1998) und Gill et al. (1999) deuten auf die Schwierigkeiten hin, die bei der Auswertung von Puls-Feld-Gelen entstehen und zu einer systematischen Fehleinschätzung der Insertlängen führen können. Zum Beispiel sind eng miteinander migrierende Doppelbänder (Abb. 16, Ergebnisse) schwer zu interpretieren. Es könnte sich um eine *Not* I-Schnittstelle im *Insert* handeln. In diesem Falle wären beide Banden zu addieren, um die Insertlänge zu erhalten. Es könnte sich bei der längeren Bande auch um eine DNA-Fraktion des BACs handeln, bei der der Verdau mit *Not* I nicht vollständig war (Schibler et al. 1998). Das bedeutet, der Größenunterschied der beiden Banden entspricht der Größe des Vektors, der bei der längeren Bande mit dem *Insert* migriert. In diesem Fall wäre für die Ermittlung der Insertgröße nur die kleinere der beiden Banden zu werten. Je nach Art des verwendeten Markers ist dieser geringe Größenunterschied unter Umständen schwer zu beurteilen. Bei der Ermittlung der Insertgrößen zur Charakterisierung der hier beschriebenen BAC-Bank wurde im Zweifelsfall die kleinere der beiden Banden gewertet. Dadurch könnte die tatsächlich erreichte Insertlänge unterschätzt worden sein.

4.1.2 Chimärismusgrad

Der Anteil an chimärischen BAC-Klonen in der erstellten BAC-Bank wurde mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) untersucht (2.7). Bei der Untersuchung von 44 BAC-Klonen wurde ein Chimärismusgrad von 4,5 % ermittelt (3.2.2).

Bei YAC-Banken sind hohe Chimärismusgrade ein häufiges Phänomen. Dies wird auf Rekombinationsereignisse zwischen den *Inserts* der sehr großen künstlichen Hefechromosomen zurückgeführt (Wada et al. 1994). Für YAC-Banken des Rindes wird von Chimärismusgraden

von 18-33 % berichtet (Libert et al. 1993, Smith et al. 1996). Der Chimärismusgrad von BAC-Banken wird auf unter 5 % geschätzt (Vaiman 1999). Viele Autoren berichten von FISH-Experimenten, bei denen überhaupt keine chimärischen Klone gefunden wurden (Anderson et al. 2000, Cai et al. 1995, Li et al. 1999, Zimmer und Verrinder Gibbins 1997). Die ermittelten Chimärismusgrade von einigen BAC-Banken verschiedener Spezies reichen von 4 % (Rogel-Gaillard et al. 1999, Schibler et al. 1998) bis 6 % (Zhu et al. 1999). Chimärische BAC-Klone sind hauptsächlich eine Folge von ungünstigen Ligationsbedingungen, bei denen zwei DNA-Fragmente in den Vektor ligiert werden. Dies geschieht, wenn im Verhältnis zum Vektor zu viel DNA in der Ligationsreaktion eingesetzt wird. Daher wird ein Verhältnis von Vektor zu *Insert*-DNA von 10:1 empfohlen (Osoegawa et al. 1998) und auch ausnahmslos bei der Erstellung der hier zitierten BAC-Banken angewendet.

Schibler et al. (1998) weisen daraufhin, dass bei der Kartierung anonymer Klone mittels FISH der Chimärismusgrad eher unterschätzt wird. Sie vermuteten dies aufgrund der Ergebnisse von Kartierungen von BAC-Klonen, über die *a priori* Information vorlag, die aber nicht auf die erwartete Position kartierten. Diese Klone enthielten die Sequenz, mit der die BAC-Bank gescreent wurde, wie mittels PCR bestätigt wurde. Schibler et al. (1998) schlossen daraus, dass ein solcher Klon zwei Fragmente enthält:

- das Fragment, das durch FISH sichtbar wurde, aber nicht auf die erwartete Position kartierte und
- das Fragment, das beim Screenen der BAC-Bank das Signal verursachte, dessen erwartete Position durch FISH bestätigt werden sollte und dessen Vorhandensein durch die PCR bestätigt wurde;

Das letztgenannte Fragment war wahrscheinlich zu kurz, um ein FISH-Signal zu erzeugen. Dieses Beispiel zeigt, dass der mit FISH ermittelte Chimärismusgrad basierend auf anonymen Klonen eine Unterschätzung des Vorkommens von chimärischen Klonen bedeuten könnte. In dieser Arbeit wurden zur Charakterisierung der erstellten BAC-Bank vor allem Klone, über die keine *a priori* Information über die chromosomale Position vorlag, kartiert.

4.1.3 Genomabdeckung

Die Genomabdeckung der erstellten BAC-Bank wurde theoretisch, aus der ermittelten durchschnittlichen Insertlänge und der Anzahl von Klonen in der Bank, und praktisch, durch Screenen mit locusspezifischen Proben, ermittelt. Die theoretisch ermittelte Genomabdeckung beträgt 3,1. Das Screenen der BAC-Bank resultierte in $2 \pm 0,5$ Signalen (1-3 Signale pro Probe bei 8 Proben) und damit einer etwas geringeren Genomabdeckung (3.2.3). Diskrepanzen zwischen theoretisch und praktisch ermittelten Genomabdeckungen könnten auf eine eventuelle Fehleinschätzung der ermittelten durchschnittlichen Insertlänge (4.1.1) zurückzuführen sein. Zu beachten ist ebenfalls, dass der hier praktisch ermittelte Wert nur für BTA20 zutrifft. Um die Repräsentation des gesamten Genoms abschätzen zu können, sind weitere *Screening*-Experimente mit Sonden für andere Chromosomen nötig.

4.2 Charakterisierung der QTL-Region auf BTA20

4.2.1 Physische Begrenzung der QTL-Region

Die Lage eines QTL wird meist durch ein 95 %-Vertrauensintervall definiert (1.3). Im Falle von BTA20 sprechen die Autoren (Coppieters et al. 1999) von einem *support interval*, das beschrieben wird als „essentially encompasses its (BTA20) entire distal halve, i. e. as much as 30 million basepairs, or the order of 1000 genes“. Daraus geht nicht hervor, über welchen Bereich sich das *support interval* erstreckt. Die Angabe „... as much as 30 million base pairs...“ indiziert bei der angegebenen Länge von BTA20 von 109 cM (Abb. 2, Einleitung) und einem Verhältnis der Distanzen von 1 cM:1 Mb (Kappes et al. 1997), die Grenze des Intervalls bei 79 cM. Die Angabe „... its entire distal halve...“ spricht für eine Grenze des Intervalls bei einer Position von 55 cM. Letzteres wird auch durch die Verteilung der *Bootstrap-counts* unterstützt, die an der Position des Markers *BMS703* ein weiteres Maximum, zusätzlich zu dem an der Position des Markers *BMS521*, erreichen. Da sich in der Publikation von Coppieters et al. (1999) keine Angaben über die *Bootstrap*-Analyse finden, wurde hier die Grenze des 95%-Vertrauensintervalls anhand der Graphik aus der Publikation (Abb. 2, Einleitung) geschätzt. Das so ermittelte Intervall ist zum Zentromer durch den Marker *BMS2461* begrenzt. Diese Begrenzung sollte für die vorliegende Arbeit physisch, durch die Kartierung von BAC-Klonen, vorgenommen werden, da weitere BAC-Klone in diesen Bereich kartiert werden sollten. Zusätzlich wurde aus der zytogenetischen Karte der Locus *MAP1B* gewählt. Neben diesen beiden Loci wären *GHR* und *PRLR* aus der zytogenetischen Karte in Frage gekommen. Eine Begrenzung des Intervalls durch diese Loci erschien allerdings als zu eng. Es wurde vermutet, dass *GHR* und *PRLR* etwa 2 cM entfernt von *BMS703* liegen (4.2.2). Damit wäre das Intervall, das durch diese beiden Loci definiert ist, zu konservativ gewesen.

4.2.2 Kartierung der Loci *BMS521*, *BMS703*, *GHR* und *PRLR*

Mit der physischen Kartierung von *BMS521* und *BMS703* wurden die beiden wahrscheinlichsten Positionen des QTL physisch definiert. Es sollte evaluiert werden, wie weitere BAC-Klone relativ zu diesen beiden Loci kartieren. Wie Abb. 21 S. 72A und Tab. 17 (Ergebnisse) zeigen, war eine Auflösung der beiden Loci mittels FISH zu erzielen. Dies war aufgrund der genetischen Distanz dieser beiden Loci von etwa 20 cM (Kappes et al. 1997) zu erwarten. Die Auflösung konventioneller Metaphasepräparationen beträgt etwa 2 Mb (Lichter et al. 1990). In dieser Arbeit wurde kein BAC-Klon zwischen die beiden Mikrosatelliten kartiert.

Die Lage der positionellen Kandidatengene *GHR* und *PRLR* sollte sowohl zueinander als auch im Verhältnis zu den beiden Mikrosatelliten *BMS521* und *BMS703* durch Zwei-Farben-FISH-Experimente aufgeklärt werden. Physische Kartierungen der beiden Gene beim Menschen ließen vermuten, dass sie in geringer Distanz auf HSA5 lokalisiert sind (Arden et al. 1990). Ähnliches ließen die Kartierungen beim Rind vermuten. Hier wurden diese Loci sowohl physisch (Hayes et al. 1996, Moody et al. 1995) als auch genetisch kartiert (Barendse et al. 1997). Die Kartierung von *GHR* und *PRLR* beim Menschen mittels *Radiation Hybrid Panel* ließ allerdings vermuten, dass diese beiden Gene weiter voneinander entfernt sind, als die physische

Kartierung mittels FISH zeigte. *GHR* wurde auf die Position 158,33 cR₃₀₀₀ kartiert und *PRLR* auf 124,27 cR₃₀₀₀ (URL 5). Die Differenz von 35,06 cR₃₀₀₀ entspricht bei einer Länge von HSA5 von 194 Mb (Weissenbach et al. 1992) und 664 cR₃₀₀₀ einer Distanz von etwa 10 Mb. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *GHR* und *PRLR* auch beim Rind nicht in so geringer Distanz zueinander lokalisiert sind, wie ursprünglich angenommen (Abb. 21 S. 72A, Ergebnisse).

Basierend auf den Kartierungen von Barendse et al. (1997) und Kappes et al. (1997) konnte vermutet werden, dass die Positionen von *GHR* und *BMS703*, bzw. von *PRLR* und *BMS703* mittels FISH aufzulösen sind. Die aufgrund der Kopplungskarten berechnete Distanz der Loci beträgt 2,3 cM und liegt somit etwas über der Auflösungsgrenze von FISH.

Die ermittelte Reihenfolge der Loci ergab sich als: Zentromer – *GHR* – *PRLR* – *BMS703* – Telomer, wobei die Positionen von *GHR* und *BMS703*, sowie die von *PRLR* und *BMS703* nahezu zweifelsfrei aufgelöst werden konnten (Abb. 22 S. 72B, Tab. 17, 18 und 19, Ergebnisse).

4.2.3 Kartierung weiterer positioneller Kandidatengene

Die Kartierung von 13 Loci (3 Mikrosatelliten, 10 Gene) erweiterte die zytogenetische Karte um 9 Loci (Abb. 17, Ergebnisse), davon sind sieben positionelle Kandidatengene (*ANPRC*, *FST*, *HMGCS1*, *IL7R*, *LIFR*, *SDHA*, *SLC1A3*, 4.2.8).

Die Kartierung von TypI-Loci (Gene) ist beim Rind auch in Zukunft von Bedeutung. Aufgrund der langen Generationsintervalle beim Rind fallen erst jetzt vermehrt Daten aus aufwändigen Versuchsanlagen, wie sie das *Granddaughter-Design* (Weller et al. 1990) darstellt, an. Wenn die so identifizierten Genomregionen weiter untersucht werden, ist eine dichte Karte kodierender Sequenzen und Marker in der entsprechenden Region erforderlich (Riquet et al. 1999).

4.2.4 Anordnung der BAC-Klone mit Zwei-Farben-FISH

Die Ermittlung der Reihenfolge der BAC-Klone auf BTA20 war für die Positionierung weiterer Kandidatengene in das physisch begrenzte Intervall von Interesse. Außerdem wurde die Anordnung der BAC-Klone im Hinblick auf die weiterführende Untersuchung der QTL-Region vorgenommen, da für eine QTL-Kartierung die korrekte Anordnung der Gene von entscheidender Bedeutung ist (Barendse et al. 1997).

Die Durchführung der statistischen Auswertung der Anordnung der BAC-Klone basiert auf dem Vorgehen von Guo und Flejter (1996). Die 15 wahrscheinlichsten Anordnungen mit den zugehörigen Wahrscheinlichkeiten sind in Tab.18 (Ergebnisse) dargestellt. Die drei wahrscheinlichsten Anordnungen sind zu 7,2 % korrekt. Dies ist im Vergleich zu der höchsten von Guo und Flejter (1996) ermittelten Wahrscheinlichkeit von 99,8 % sehr gering. Zwei Erklärungsansätze sind denkbar:

- Guo and Flejter (1996) verwendeten für ihre Auswertung eine geringere Zahl von Datensätzen. Sie verwendeten in ihren Analysen die Ergebnisse von maximal 24 FISH-Experimenten (Zwei-Farben-FISH und Drei-Farben-FISH) für die Anordnung von 12 bzw. 14 Loci. Für die Anordnung der 11 Loci auf BTA20 wurden in dieser Arbeit die Daten von 38 FISH-Experimenten (Tab. 17, Ergebnisse) einbezogen. Je mehr Datensätze verwendet werden, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass es zwischen diesen zu Konflikten kommt, sofern nicht eindeutige Anordnungen beobachtet werden. Eine solche Situation verringert die Wahrscheinlichkeit, die für die „ersten“ Reihenfolgen ermittelt wird, da auch andere Anordnungen „glaubwürdiger“ erscheinen. Insgesamt waren die von Guo und Flejter (1996) verwendeten Datensätze „eindeutiger“.
- In dem Material, das Guo und Flejter (1996) verwendet haben, waren zwei Loci nicht zueinander anzuordnen. Guo und Flejter (1996) zeigten, dass die Wahrscheinlichkeit der „ersten Reihenfolge“ steigt, wenn die Loci eindeutig einer Anordnung zugeordnet werden können. Sie ermittelten in einer Analyse für die Anordnung von 14 Loci zwei Reihenfolgen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit von 49 %. Diese beiden Anordnungen variierten in der Position der letzten drei Loci. Guo und Flejter (1996) wiederholten die Analyse, bezogen aber einen zusätzlichen Datensatz mit ein, der die Reihenfolge der letzten beiden Loci festlegte. Das Ergebnis zeigte eine Anordnung mit der höchsten Wahrscheinlichkeit von 99 %. Ähnliches wurde auch in dieser Arbeit beobachtet. Unter den 11 Loci waren 3 (*IL7R*, *LIFR*, *SLC1A3*) nicht zueinander anzuordnen. In der Analyse, deren Ergebnisse in Tab. 18 (Ergebnisse) dargestellt sind, wurden drei Anordnungen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit von 7,2 % ermittelt, die sich in der Reihenfolge eben dieser drei Loci unterscheiden (Abb. 23, Ergebnisse). In einer weiteren Analyse wurden die fraglichen Loci zu einem Locus zusammengefasst. Die Wahrscheinlichkeit für die „erste“ Anordnung erhöhte sich daraufhin auf 48 % (Tab. 19, Ergebnisse).

Aussagekräftiger als die für die „erste Reihenfolge“ ermittelte Wahrscheinlichkeit ist vermutlich das Verhältnis der ermittelten Wahrscheinlichkeiten der jeweiligen Anordnungen (in Tab. 18 und Tab. 19 als „odds ratio“ bezeichnet). Wurden die drei nicht zueinander anzuordnenden Loci einzeln betrachtet, waren die „ersten drei“ Anordnungen 2,64 mal wahrscheinlicher als die nächste Anordnung. Wurden allerdings die drei Loci zusammengefasst, war die wahrscheinlichste Anordnung 4,16 mal so wahrscheinlich wie die nächste.

Eine Möglichkeit, die ermittelte Anordnung experimentell zu überprüfen, wäre die Hybridisierung der BAC-Klone auf höher auflösende Chromosomenpräparationen, wie z. B. *mechanically stretched chromosomes* (Laan et al. 1995), meiotische Präparationen (Gallagher et al. 1998) oder *extended chromatin fibres* (Houseal et al. 1994).

4.2.5 Kartierung von Loci mittels Analyse des *Radiation Hybrid Panels BOVRH5*

Durch die Analyse des *Radiation Hybrid Panels BOVRH5* (Womack et al. 1997) wurden die sieben Loci *ANPRC*, *BMS2461*, *FST*, *GHR*, *IL7R*, *PRLR* und *SDHA* in die bereits bestehende Karte von BTA20 (Band et al. 2000) eingefügt (Abb. 24 und Tab. 20, Ergebnisse). Die hierbei ermittelte Anordnung der Loci stimmt mit der durch Zwei-Farben-FISH ermittelten Reihen-

folge überein (Abb. 25, Ergebnisse). Überraschenderweise zeigte die Methode der FISH an allen Positionen (*ANPRC/SDHA*, *BMS2461/FST*, *IL7R/PRLR*), bis auf eine (*IL7R/SLC1A3*), ein größeres Auflösungsvermögen (Tab. 17 und Abb. 25, Ergebnisse).

Die Auflösung des verwendeten *Radiation Hybrid Panels* sollte größer sein als die der FISH auf Metaphasechromosomen. Die Auflösung von Metaphasechromosomen wird auf 1-3 Mb geschätzt (Lichter et al. 1990). In dem verwendeten *Panel* entspricht 1 cR₅₀₀₀ etwa der physischen Distanz von 0,3 Mb (1.2.3). Das heißt, bereits eine Auflösung von etwa 7 cR₅₀₀₀ entspricht der Auflösung, wie sie mittels FISH zu erzielen ist. In der Karte von Band et al. (2000) finden sich geringere Auflösungen. Zwischen den beiden Loci *BM713* und *EST0008* auf BTA20 wurde eine Distanz von 4,5 cR₅₀₀₀ ermittelt. Dies entspricht etwa einer physischen Distanz von 1,35 Mb. Das Auflösungsvermögen des *Panels* sollte, basierend auf einem praktischen Versuch, noch höher sein. Womack et al. (1997) ermittelten durch die Kartierung eines Locus relativ zu zwei Mikrosatelliten, deren genetische Distanz bekannt war, ein Verhältnis von 1 cM zu 9 cR₅₀₀₀ (1.2.3). Damit entspricht 1 cR₅₀₀₀ einer physischen Distanz von 0,1 Mb. Das bedeutet, bereits etwa 20 cR₅₀₀₀ entsprechen der Auflösung von 2 Mb, die mit FISH zu erzielen ist. Die Distanz von 4,5 cR₅₀₀₀ würde in diesem Falle einer physischen Distanz von 0,45 Mb entsprechen.

Ein wichtiger Parameter bei der Analyse eines *Radiation Hybrid Panels* ist die Retentionsfrequenz. Aus ihr wird die Bruchfrequenz geschätzt und diese ist die Grundlage für die Berechnung der Distanz zwischen den Loci (Jones 1997). Weiterhin ist sie ein Anhaltspunkt für die „Güte“ der PCR. Bei der ersten Charakterisierung des verwendeten *Panels* ermittelten Womack et al. (1997) Retentionsfrequenzen von 19 % bis 86 % für Marker auf den Chromosomen BTA1, BTA13 und BTA19. Die Retentionsfrequenz für den Marker *ETH3* erscheint mit 86 % sehr hoch. Dieser Marker kartiert auf BTA19. Hier wird ebenfalls das Gen für Thymin Kinase (*TK*) vermutet. *TK* wurde als selektiver Marker bei der Herstellung des *Panels* verwendet. Sollten *ETH3* und *TK* eng zusammenliegen, könnte dies die hohe Retentionsfrequenz für diesen Marker erklären. Band et al. (2000) ermittelten Retentionsfrequenzen für alle bovinen Chromosomen mit einem durchschnittlichen Wert von 22,4 %, wobei der höchste Wert mit 45,3 % erwartungsgemäß BTA19 betraf und der niedrigste mit 13,3 % für BTA9 beobachtet wurde. Mit der Kartierung der sieben Loci im Rahmen dieser Arbeit wurden Werte von 10,2 % bis 17,6 % ermittelt (Tab. 20, Ergebnisse). Der niedrigste Wert von 10,2 % betrifft den Locus *ANPRC*, welcher telomerisch lokalisiert wurde. Retentionsfrequenzen von etwa 10 % in Telomernähe werden häufig beobachtet (Jones 1997). Die Retentionsfrequenz nimmt in der Regel Richtung Telomer ab und ist am Zentromer am größten. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Chromosomenfragmente, um in der Wirtszelle stabil zu bleiben für eine Mitose Zentromere benötigen (Jones 1997). Die ermittelten Retentionsfrequenzen geben somit keinen Aufschluß über das geringere Auflösungsvermögen des *Panels* wie es sich im Rahmen dieser Arbeit präsentierte.

4.2.6 Integration der Genomkarten des Rindes

Ein wichtiger Aspekt bei der Untersuchung des Genoms von Nutztieren ist die Integration von Informationen, die aus verschiedenen Experimenten anfallen. Die drei Arten von Genomkarten (genetische Karte, zytogenetische Karte und *Radiation Hybrid* Karte) waren für BTA20 im QTL-Bereich nur schwer vergleichbar (Abb. 1, Einleitung). Durch die physische Kartierung von 3 Mikrosatelliten (*BMS521*, *BMS703*, *BMS2461*) und 2 Genen (*ANPRC*, *SDHA*) wurde der „Vergleichsbereich“ der zytogenetischen und genetischen Karte zum telomerischen Ende (dem QTL-Bereich) ausgedehnt. Durch die Kartierung der 7 Loci wurde die zytogenetische Karte in die *Radiation Hybrid* Karte integriert (Abb. 25, Ergebnisse).

4.2.7 Die Anordnung der Loci auf BTA20 und HSA5

Bei der Anordnung der Loci mittels FISH ergaben sich unterschiedliche Reihenfolgen nach der Auswertung der gemessenen FLcen-Werte und mit Zwei-Farben-FISH. Dies wird am deutlichsten an der Position des Locus *ANPRC*, der aufgrund seines FLcen-Wertes weiter proximal kartiert wurde als mit Zwei-Farben-FISH (Abb. 25, Ergebnisse).

Bei der Ermittlung der FLcen-Werte durch Ausmessen der Signalposition auf den hybridisierten Chromosomen (1.2.2, 2.7.7.2) kann es zu Meßfehlern und -ungenauigkeiten kommen. In dieser Arbeit wurde grundsätzlich die längste Strecke vom Signal zu einem der Chromosomenenden gemessen, um solche Ungenauigkeiten zu minimieren. Trotzdem wurden für einige Loci identische FLcen-Werte ermittelt (Tab. 21, Ergebnisse). Die Qualität der Chromosomenpräparation spielt ebenfalls eine wichtige Rolle, vor allem im Hinblick darauf, die Grenze des Telomers, bzw. des Zentromers für die Messung zu bestimmen (Bray-Ward et al. 1996). Die Präzision der chromosomalen Position ist abhängig vom Grad der Chromosomenkondensation. Lichter et al. (1990) fanden eine wesentlich geringere Variation der FLpter-Werte, wenn die Chromosomen weniger stark kondensiert waren. Die hier untersuchte Zelllinie lieferte in der Regel recht stark kondensierte Chromosomen. Bei Zwei-Farben-FISH dagegen ist es nicht immer eindeutig möglich, ein Signalpaar einer Reihenfolge zuzuordnen oder es als „Überlappung“ zu bezeichnen. In dieser Arbeit wurde in einer solchen Situation die „Überlappung“ gewählt.

Die Homologie, die zwischen BTA20 und HSA5 besteht, bedeutet nicht auch Konservierung der Anordnung der Gene auf den beiden Chromosomen. Band et al. (2000) zeigten vielfache interne Umordnungen für die Genreihenfolgen der bovinen Chromosomen, die komplett homolog zu einem humanen Chromosom sind. Allerdings wurden alle im Rahmen dieser Arbeit kartierten Gene beim Menschen durch Sequenzierung angeordnet (Lander et al. 2001). Die dabei ermittelte Reihenfolge unterstützt die, wie sie durch Zwei-Farben-FISH für das Rind ermittelt wurde. Auch die physischen Abstände zwischen den Loci entsprechen sich in ihren Relationen (Tab. 21 und Abb. 25, Ergebnisse). Zusammen mit den anderen Karten für BTA20 (genetische Karte, *Radiation Hybrid* Karte) wird hiermit die Anordnung der BAC-Klone, die durch Zwei-Farben-FISH ermittelt wurde, unterstützt.

Die Bestätigung der Homologie zwischen BTA20 und HSA5 durch die FISH-Experimente ist von Bedeutung, da aus dem humanen Genomprojekt sehr viele Daten anfallen. Diese sind bereits jetzt in Form der *Draft*-Sequenz öffentlich verfügbar und vor allem im Hinblick auf die Auswahl von Kandidatengenen zu nutzen. Die physische Kartierung der QTL-Region charakterisiert zusammen mit den Angaben aus der komparativen Karte von Band et al. (2000) das Intervall von HSA5, das in diesem Zusammenhang von Interesse ist. Dies betrifft den Bereich von 116 cR₃₀₀₀ bis 356 cR₃₀₀₀ des *GeneBridge Radiation Hybrid Panels* GB4, welcher von Band et al. (2000) für die vergleichende Kartierung verwendet wurde. Allerdings zeigte sich in dieser Arbeit durch die physische Kartierung des Locus *SDHA*, dass dieser Bereich bis zur Position 7,64 cR₃₀₀₀ ausgedehnt werden muß. Diese Region (URL 5) sollte im Hinblick auf neue Kandidatengene beobachtet werden.

4.2.8 Kandidatengenanalyse

Das Vorgehen der Auswahl von Kandidatengenen aus komparativen Karten aufgrund ihrer Position und ihre nachfolgende Klonierung wird auch als „comparative candidate positional cloning“ bezeichnet (Womack et al. 1997). Diese Methode setzt nicht nur die Identifizierung von Regionen mit konservierter Syntänie voraus, sondern auch die Bestimmung von Neu- anordnungen von Genen (Womack et al. 1997).

Da das QTL-Intervall in dieser Arbeit mit der physischen Kartierung der Loci *BMS2461* und *MAP1B* begrenzt wurde, können alle distal zu diesen Loci kartierten Gene als positionelle Kandidatengene angesehen werden. Dies betrifft alle in dieser Studie kartierten Gene (*ANPRC*, *FST*, *GHR*, *HMGCS1*, *IL7R*, *LIFR*, *PRLR*, *SDHA*, *SLC1A3*). Die vier Loci *FST*, *GHR*, *IL7R* und *PRLR* wurden auf SNPs untersucht (3.8). Von sechs Aminosäureaustauschen ist nur einer auf Unterschiede zwischen den Subspezies *Bos taurus taurus* und *Bos taurus indicus* zurückzuführen. Die anderen Basenaustausche, die zu Aminosäureaustauschen führten, wurden innerhalb der Gruppe der taurinen Rinder beobachtet und können Kandidaten für den QTL sein.

Im Locus *GHR* wurden 9 Austausche gefunden, von denen vier bereits beschrieben sind (Ge et al. 2000). Im Locus *PRLR* wurden 5 Austausche gefunden. *GHR* und *PRLR*, *growth hormone receptor* und *prolactin receptor*, gehören zur Familie der Zytokinrezeptoren Klasse I. Ihre Funktion beruht auf der Signalweiterleitung nach der Ligandenbindung. Der Prolaktinrezeptor ist ein Kandidatengen für die Wurfgröße des Schweins (Vincent und Evans 1998). Ein Überblick über die zahlreichen Funktionen von Prolaktin und seinem Rezeptor, sowie die Auswirkungen einer Nullmutation des Prolaktinrezeptors bei Mäusen findet sich bei Bole-Feysot et al. (1998). Aggrey et al. (1999) untersuchten Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLPs) in der 5' flankierenden Region des bovinen *GHR*-Gens. Sie fanden Unterschiede der Allelfrequenzen, die assoziiert waren mit höheren Zuchtwerten für Milchfett- und -proteingehalt. Falaki et al. (1996) untersuchten ebenfalls RFLPs, in der intrazellulären Region des *GHR*. Sie fanden signifikante Unterschiede zwischen den Zuchtwerten der untersuchten Bullen, die verschiedene Allele bei der Analyse mit dem Restriktionsenzym *Taq I* aufwiesen, für Milchproteingehalt und Milchmenge. Die vier SNPs, die Ge et al. (2000)

im Exon 10 des *GHR* fanden und die in dieser Arbeit ebenfalls identifiziert wurden, werden derzeit auf Assoziationen mit Wachstums- und Schlachtkörpermerkmalen des Rindes getestet (URL 15).

ANPRC, *atrionatriuretic peptide receptor type C*, beim Menschen auch als *NPR3*, *natriuretic peptide receptor C* bezeichnet, ist an der Ausscheidung natriuretisch wirkender Peptide beteiligt. Diese Peptide sind neben anderen Faktoren für die Aufrechterhaltung des Blutdrucks und des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens verantwortlich. Jaubert et al. (1999) wiesen eine Beteiligung dieses Rezeptors an drei Mutationen, die extremes Körperlängenwachstum bei Mäusen zur Folge haben, nach. Infolgedessen gilt dieses Gen als Kandidatengen für Syndrome des Menschen, die übergroßes Wachstum umfassen.

FST, *Follistatin*, ist ein Peptid, das von zahlreichen Zellen der Hypophyse sezerniert wird und auch in der Follikelflüssigkeit vorkommt. Es hemmt die Synthese und Ausschüttung des Follikel-stimulierenden Hormons (*FSH*). Zudem bindet es an Activin und vermindert so die durch dieses Peptid hervorgerufene Steigerung der *FSH*-Sekretion. In einer Studie, in der 37 Kandidatengene für das *polycystic ovary syndrome* des Menschen untersucht wurden, war der Beweis für eine Kopplung mit dem beobachteten Phänotypen für dieses Kandidatengen am überzeugendsten (Urbanek et al. 1999). In einer Folgestudie (Urbanek et al. 2000) konnte dies jedoch nicht bestätigt werden.

Das beim Abbau der Fettsäuren über die Enzymkette der β -Oxidation in den Mitochondrien der Hepatozyten entstehende Acetyl-CoA verbindet sich zu einem geringen Teil, unter der Katalisation von *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMGCS1)* mit Acetyl-CoA zu HMG-CoA. Ein Teil hiervon wird in Acetacetat und Acetyl-CoA zerlegt. Acetacetat wird in Aceton und β -Hydroxybutyrat umgewandelt. Diese drei Verbindungen werden unter dem Begriff „Ketonkörper“ zusammengefasst und treten unter physiologischen Bedingungen nur in kleinen Mengen aus den Hepatozyten aus. Bei Wiederkäuern findet im Hungerzustand, z. B. bei hoher Milchleistung in den ersten Wochen der Laktation, eine beträchtliche Bildung von Ketonkörpern statt, die vom bovinen Gehirn, im Gegensatz zu dem des Menschen, nicht verwertet werden können. Es kommt zur Ketose, einer Stoffwechselkrankheit die mit Störungen der Funktion des Nervensystems einhergeht (Schenck und Kolb 1990).

Der Interleukin 7 Rezeptor, *IL7R*, ist ein Kandidatengen für *severe combined immunodeficiency* (Puel et al. 1998). Diese Krankheit wird durch verschiedene genetische Defekte verursacht, die vor allem die Funktion der T-Zellen, der B-Zellen und der NK- (natural killer) Zellen betreffen. Defekte in der Signalwirkung des *IL7R* scheinen sich vor allem auf die T-Zellen, hingegen nicht auf die B- oder NK-Zellen, auszuwirken (Puel et al. 1998).

LIFR, *leukemia inhibitory factor receptor*, ist ein Teil des Rezeptorkomplexes, der die Wirkung des *leukemia inhibitory factors* vermittelt. Dieser Faktor gehört zu den Zytokinen und beeinflusst die Differenzierung, das Überleben und die Vermehrung einer großen Zahl von verschiedenen Zellen (z. B. embryonale Stammzellen der Maus und adrenerge Neuronen), sowohl beim Erwachsenen als auch beim Embryo (Thiel et al. 1999).

Neuronale Mikrotubuli spielen vermutlich eine Rolle bei der Formierung von Dendriten und Axonen (URL 1). Sie sind mit verschiedenen Proteinen, den *microtubule-associated proteins* (*MAP*), assoziiert. *MAP1B* ist beim Menschen ein Kandidatengen für spinale Muskelatrophie (Lien et al. 1991) und wurde in dieser Hinsicht auch beim Rind untersucht und im Rahmen dieser Untersuchung kartiert (Eggen et al. 1998b), konnte hierbei aber als Kandidatengen nicht bestätigt werden.

SDHA, *succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)*, ist ein Protein des Komplex II der Atmungskette, das im Zellkern kodiert wird. Der Komplex II ist an der Oxidation von Succinat und so an der Elektronentransportkette in den Mitochondrien beteiligt. Ein Überblick über die genetischen und phänotypischen Aspekte von Defekten der Komplex II Gene findet sich bei Baysal et al. (2001).

SLC1A3, *solute carrier family 1 (glial high-affinity glutamate transporter), member 3*, gehört zu einer großen Gruppe von Transportermolekülen, die die Konzentration von Neurotransmittern an den Synapsen des zentralen Nervensystems regulieren (URL 1).

4.3 Schlussfolgerungen

Das Ziel dieser Arbeit war die Erstellung einer bovinen BAC-Bank, als Ressource zur Erforschung des Rindengenoms, und deren Anwendung auf die physische Kartierung einer QTL-Region auf Chromosom 20 des Rindes (BTA20).

Mit wenigen Ligations- und Transformationsansätzen konnte eine ausreichende Zahl von BAC-Klonen erzeugt werden. Für das Erreichen der angestrebten durchschnittlichen Insertlänge von über 100 kb stellte sich vor allem die verwendete Strategie der Größenfraktionierung der DNA-Fragmente vor der Ligation mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese als wirkungsvoll heraus. Durch die Zusammenarbeit mit dem Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) in Berlin ist die Handhabung der erstellten BAC-Bank effizient. Über die öffentliche Bereitstellung der BAC-Bank in Form von *high density* Filtern und DNA-Pools kann diese bei der Aufklärung unterschiedlichster Fragestellungen verwendet werden. Es wurden bereits vergleichende Sequenzierungsprojekte, basierend auf BAC-Klonen gestartet (URL 16). Diese sollen unter anderem Hinweise dafür liefern, welche Genome nach denen des Menschen und der Maus systematisch durchsequenziert werden sollen. Für ein solches Projekt könnte die erstellte BAC-Bank an Bedeutung gewinnen.

Die Kartierung und Anordnung von 13 Loci im QTL-Bereich auf BTA20 erfolgte unter Verwendung von FISH und durch das Screenen eines *Radiation Hybrid Panels*. Obwohl das Auflösungsvermögen des verwendeten *Radiation Hybrid Panels* im submegabasenbereich erwartet wurde, konnte mit Zwei-Farben-FISH eine höhere Auflösung erreicht werden. Die Anordnung der Loci anhand ihrer FLCen-Werte resultierte in einer anderen Reihenfolge als diejenige, die mit Zwei-Farben-FISH ermittelt wurde. Sowohl die Anordnung der Gene auf HSA5 als auch die Genomkarten von BTA20 unterstützen das Ergebnis der Zwei-Farben-FISH. Die physische Kartierung ermöglichte die Bestätigung von *GHR* und *PRLR* als Kandidatengene und die Identifikation weiterer positioneller Kandidatengene.

Die kartierten BAC-Klone können als Ausgangspunkte für die weitere Untersuchung der QTL-Region dienen. Sie können Startpunkte für Sequenzierungen sein oder als Substrat für die gezielte Markerentwicklung dienen, wie im Rahmen dieser Arbeit durch die Entwicklung von *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) gezeigt wurde. Unter Verwendung von Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und mittels der erstellten BAC-Bank konnte somit ein Beitrag zur Charakterisierung der QTL-Region auf BTA20 geleistet werden.

5 Literaturverzeichnis

- Adams, M.D.; Celniker, S.E.; Holt, R.A.; Evans, C.A.; Gocayne, J.D., Venter, J.C. und et al.: The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287:2185-2195, 2000.
- Aggrey, S.E.; Yao, J.; Sabour, M.P.; Lin, C.Y.; Zadworny, D.; Hayes, J.F. und Kuhnlein, U.: Markers within the regulatory region of the growth hormone receptor gene and their association with milk-related traits in Holsteins. *J Hered*, 90(1):148-51, 1999.
- Altschul, S.F.; Boguski, M.S.; Gish, W. und Wootton, J.C.: Issues in Searching Molecular Sequence Databases. *Nat Genet*, 6(2):119-129, 1994.
- Anderson, S.I.; Lopez-Corrales, N.L.; Gorick, B. und Archibald, A.L.: A large-fragment porcine genomic library resource in a BAC vector. *Mamm Genome*, 11(9):811-4, 2000.
- Arden, K.C.; Boutin, J.M.; Djiane, J.; Kelly, P.A. und Cavenee, W.K.: The receptors for prolactin and growth hormone are localized in the same region of human chromosome 5. *Cytogenet Cell Genet*, 53(2-3):161-5, 1990.
- Arranz, J.J.; Coppieters, W.; Berzi, P.; Cambisano, N.; Grisart, B.; Karim, L.; Marcq, F.; Moreau, L.; Mezer, C.; Riquet, J.; Simon, P.; Vanmanshoven, P.; Wagenaar, D. und Georges, M.: A QTL affecting milk yield and composition maps to bovine chromosome 20: a confirmation. *Anim Genet*, 29(2):107-15, 1998.
- Band, M.R.; Larson, J.H.; Rebeiz, M.; Green, C.A.; Heyen, D.W.; Donovan, J.; Windish, R.; Steining, C.; Mahyuddin, P.; Womack, J.E. und Lewin, H.A.: An ordered comparative map of the cattle and human genomes. *Genome Res*, 10(9):1359-68, 2000.
- Barendse, W.; Armitage, S.M.; Ryan, A.M.; Moore, S.S.; Clayton, D.; Georges, M.; Womack, J.E. und Hetzel, J.: A genetic map of DNA loci on bovine chromosome 1. *Genomics*, 18(3):602-8, 1993.
- Barendse, W.; Armitage, S.M.; Kossarek, L.M.; Shalom, A.; Kirkpatrick, B.W.; Ryan, A.M.; Clayton, D.; Li, L.; Neiberghs, H.L.; Zhang, N. und et al.: A genetic linkage map of the bovine genome. *Nat Genet*, 6(3):227-35, 1994.
- Barendse, W.; Vaiman, D.; Kemp, S.J.; Sugimoto, Y.; Armitage, S.M.; Williams, J.L.; Sun, H.S.; Eggen, A.; Agaba, M.; Aleyasin, S.A.; Band, M.; Bishop, M.D.; Buitkamp, J.; Byrne, K.; Collins, F.; Cooper, L.; Coppettiers, W.; Denys, B.; Drinkwater, R.D.; Easterday, K.; Elduque, C.; Ennis, S.; Erhardt, G.; Li, L.; Lil, L. und et al.: A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mamm Genome*, 8(1):21-8, 1997.

- Barendse, W. und Fries, R.: Genetic linkage mapping, the gene maps of cattle and the list of loci. In: Fries, R. und Ruvinsky, A., eds.: The genetics of cattle. New York: CABI Publishing, 1999.
- Baysal, B.E.; Rubinstein, W.S. und Taschner, P.E.: Phenotypic dichotomy in mitochondrial complex II genetic disorders. *J Mol Med*, 79(9):495-503, 2001.
- Berghmans, S.; Segers, K.; Shay, T.; Georges, M.; Cockett, N. und Charlier, C.: Breakpoint mapping positions the callipyge gene within a 450-kilobase chromosome segment containing the DLK1 and GTL2 genes. *Mamm Genome*, 12(2):183-5, 2001.
- Birnboim, H. C. und Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6):1513-23, 1979.
- Bishop, M.D.; Kappes, S.M.; Keele, J.W.; Stone, R.T.; Sunden, S.L.; Hawkins, G.A.; Toldo, S.S.; Fries, R.; Grosz, M.D.; Yoo, J. und et al.: A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136(2):619-39, 1994.
- Bole-Feysot, C.; Goffin, V.; Edery, M.; Binart, N. und Kelly, P.A.: Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*, 19(3):225-68, 1998.
- Bray-Ward, P.; Menninger, J.; Lieman, J.; Desai, T.; Mokady, N.; Banks, A. und Ward, D.C.: Integration of the cytogenetic, genetic, and physical maps of the human genome by FISH mapping of CEPH YAC clones. *Genomics*, 32(1):1-14, 1996.
- Buitkamp, J.; Ewald, D.; Schalkwyk, L.; Weiher, M.; Masabanda, J.; Sazanov, A.; Lehrach, H. und Fries, R.: Construction and characterisation of a gridded chicken cosmid library with four-fold genomic coverage. *Anim Genet*, 29(4):295-301, 1998.
- Burke, D.T.; Carle, G.F. und Olson, M.V.: Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science*, 236:806-812, 1987.
- Cai, L.; Taylor, J.F.; Wing, R.A.; Gallagher, D.S.; Woo, S.S. und Davis, S.K.: Construction and characterization of a bovine bacterial artificial chromosome library. *Genomics*, 29(2):413-25, 1995.
- Chakravarti, A.: Population genetics--making sense out of sequence. *Nat Genet*, 21(1 Suppl):56-60, 1999.
- Chowdhary, B.P.; Fronicke, L.; Gustavsson, I. und Scherthan, H.: Comparative analysis of the cattle and human genomes: detection of ZOO- FISH and gene mapping-based chromosomal homologies. *Mamm Genome*, 7(4):297-302, 1996.

- Churchill, G.A. und Doerge, R.W.: Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, 138(3):963-71, 1994.
- Collins, F.S.: Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nat Genet*, 1(1):3-6, 1992.
- Coppieters, W.; Kvasz, A.; Farnir, F.; Arranz, J.J.; Grisart, B.; Mackinnon, M. und Georges, M.: A rank-based nonparametric method for mapping quantitative trait loci in outbred half-sib pedigrees: application to milk production in a granddaughter design. *Genetics*, 149(3):1547-55, 1998.
- Coppieters, W.; Blott, S.; Farnir, F.; Grisart, B.; Riquet, J. und Georges, M.: From phenotype to genotype: towards positional cloning of quantitative trait loci in livestock? *From Jay Lush to Genomics: Visions for Animal Breeding and Genetics*. Iowa State University, Ames, Iowa, USA, 1999. pp. 70-76.
- Cox, D.R.; Burmeister, M.; Price, E.R.; Kim, S. und Myers, R.M.: Radiation hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. *Science*, 250(4978):245-50, 1990.
- Cribiu, E.P.; Di Berardino, D.; Di Meo, G.P.; Eggen, A.; Gallagher, D.S.; Gustavsson, I.; Hayes, H.; Iannuzzi, L.; Popescu, C.P.; Rubes, J.; Schmutz, S.; Stranzinger, G.; Vaiman, A. und Womack, J.: International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids (ISCNDB 2000). *Cytogenet Cell Genet*, 92(3-4):283-99, 2001.
- Darvasi, A.; Weinreb, A.; Minke, V.; Weller, J.I. und Soller, M.: Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics*, 134(3):943-51, 1993.
- Darvasi, A.: Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nat Genet*, 18(1):19-24, 1998.
- Dayhoff, M.O.; Schwartz, R.M. und Orcutt, B.C.: A model of evolutionary change in proteins. In: Dayhoff, M.O., ed.: Atlas of protein sequence and structure. Washington: National Biomedical Research Foundation, 1978. pp. 345-352.
- De Donato, M.; Gallagher, D.S.; Davis, S.K.; Ji, Y.; Burzlaff, J.D.; Stelly, D.M.; Womack, J.E. und Taylor, J.F.: Physical assignment of microsatellite- containing BACs to bovine chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 87(1-2):59-61, 1999.
- Di Berardino, D.; Hayes, H.; Fries, R. und Long, S.: ISCNDA 1989 International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals The Second International Conference on Standardization of Domestic Animal Karyotypes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 53(2-3):65-79, 1990.

- Eggen, A. und Fries, R.: An integrated cytogenetic and meiotic map of the bovine genome. *Anim Genet*, 26(4):215-36, 1995.
- Eggen, A.; Masabanda, J.; Pfister Genskow, M.; Fries, R. und Bishop, M.: The bovine survival motorneuron (*SMN*) maps to bovine chromosome 20q14. *Animal Genetics*, 29:398-413, 1998a.
- Eggen, A.; Solinas-Toldo, S. und Fries, R.: A cosmid specific for sequences encoding a microtubule-associated protein, MAP1B, contains a polymorphic microsatellite and maps to bovine chromosome 20q14. *J Hered*, 89(4):359-63, 1998b.
- Eggen, A.; Gautier, M.; Billaut, A.; Petit, E.; Hayes, H.; Laurent, P.; Urban, C.; Pfister-Genskow, M.; Eilertsen, K. und Bishop, M.D.: Construction and characterization of a bovine BAC library with four genome-equivalent coverage. *Genet Sel Evol*, 33:543-548, 2001.
- Elo, K.T.; Vilkki, J.; de Koning, D.J.; Velmala, R.J. und Maki-Tanila, A.V.: A quantitative trait locus for live weight maps to bovine chromosome 23. *Mamm Genome*, 10(8):831-5, 1999.
- Elston, R.C.: Methods of linkage analysis--and the assumptions underlying them. *Am J Hum Genet*, 63(4):931-4, 1998.
- Ewing, B.; Hillier, L.; Wendl, M.C. und Green, P.: Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*, 8(3):175-85, 1998.
- Falaki, M.; Gengler, N.; Sneyers, M.; Prandi, A.; Massart, S.; Formigoni, A.; Burny, A.; Portetelle, D. und Renaville, R.: Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J Dairy Sci*, 79(8):1446-53, 1996.
- Falconer, D.S. und Mackay, T.F.C.: Introduction to quantitative genetics: Longman Group Limited, 1996.
- Farnir, F.; Coppieters, W.; Arranz, J.J.; Berzi, P.; Cambisano, N.; Grisart, B.; Karim, L.; Marcq, F.; Moreau, L.; Mni, M.; Nezer, C.; Simon, P.; Vanmanshoven, P.; Wagenaar, D. und Georges, M.: Extensive genome-wide linkage disequilibrium in cattle. *Genome Res*, 10(2):220-7, 2000.
- Flint, J. und Mott, R.: Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nat Rev Genet*, 2(6):437-45, 2001.

- Ford, C.E.; Pollock, D.L. und Gustavsson, I.: Proceedings of the First International Conference for the Standardisation of Banded Karyotypes of Domestic Animals. University of Reading, Reading, England. 2nd-6th August 1976. *Hereditas*, 92(1):145-62, 1980.
- Frengen, E.; Weichenhan, D.; Zhao, B.; Osoegawa, K.; van Geel, M. und de Jong, P.J.: A modular, positive selection bacterial artificial chromosome vector with multiple cloning sites. *Genomics*, 58(3):250-3, 1999.
- Fries, R. und Popescu, P.: Cytogenetics and physical chromosome maps. In: Fries, R. und Ruvinsky, A., eds.: The genetics of cattle. New York: CABI Publishing, 1999.
- Fujii, J.; Otsu, K.; Zorzato, F.; de Leon, S.; Khanna, V.K.; Weiler, J.E.; O'Brien, P.J. und Mac Lennan, D.H.: Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with Malignant Hyperthermia. *Science*, 253:448-451, 1991.
- Gallagher, D.S., Jr.; Yang, Y.P.; Burzlaff, J.D.; Womack, J.E.; Stelly, D.M.; Davis, S.K. und Taylor, J.F.: Physical assignment of six type I anchor loci to bovine chromosome 19 by fluorescence in situ hybridization. *Anim Genet*, 29(2):130-4, 1998.
- Ge, W.; Davis, M.E.; Hines, H.C. und Irvin, K.M.: Rapid communication: Single nucleotide polymorphisms detected in exon 10 of the bovine growth hormone receptor gene. *J Anim Sci*, 78(8):2229-30, 2000.
- Geldermann, H.: Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers I. Methods. *Theor Appl Genet*, 46:319-330, 1975.
- Georges, M.; Nielsen, D.; Mackinnon, M.; Mishra, A.; Okimoto, R.; Pasquino, A.T.; Sargeant, L.S.; Sorensen, A.; Steele, M.R.; Zhao, X. und et al.: Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*, 139(2):907-20, 1995.
- Gill, C.A.; Davis, S.K.; Taylor, J.F.; Cockett, N.E. und Bottema, C.D.: Construction and characterization of an ovine bacterial artificial chromosome library. *Mamm Genome*, 10(11):1108-11, 1999.
- Gordon, D.; Abajian, C. und Green, P.: Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res*, 8(3):195-202, 1998.
- Grobet, L.; Martin, L.J.; Poncelet, D.; Pirottin, D.; Brouwers, B.; Riquet, J.; Schoeberlein, A.; Dunner, S.; Menissier, F.; Massabanda, J.; Fries, R.; Hanset, R. und Georges, M.: A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in cattle. *Nat Genet*, 17(1):71-4, 1997.

- Guo, S.W. und Flejter, W.L.: Statistical methods for gene map construction by fluorescence in situ hybridization. *Genome Res*, 6(12):1133-50, 1996.
- Gyapay, G., Schmitt, K., Fizames, C., Jones, H., Vega-Czarny, N., Spillett, D., Muselet, D., Prud'Homme, J.F., Dib, C., Auffray, C., Morissette, J., Weissenbach, J. und Goodfellow, P.N.: A radiation hybrid map of the human genome. *Hum Mol Genet*, 5(3):339-46, 1996.
- Haldane, J.B.S.: The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. *Journal of Genetics*, 8:299-309, 1919.
- Haley, C.S.: Livestock QTLs--bringing home the bacon? *Trends Genet*, 11(12):488-92, 1995.
- Hayes, H.: Chromosome painting with human chromosome-specific DNA libraries reveals the extent and distribution of conserved segments in bovine chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 71(2):168-74, 1995.
- Hayes, H.; Le Chalony, C.; Goubin, G.; Mercier, D.; Payen, E.; Bignon, C. und Kohno, K.: Localization of ZNF164, ZNF146, GGTA1, SOX2, PRLR and EEF2 on homologous cattle, sheep and goat chromosomes by fluorescent in situ hybridization and comparison with the human gene map. *Cytogenet Cell Genet*, 72(4):342-6, 1996.
- Heyen, D.W.; Weller, J.I.; Ron, M.; Band, M.; Beever, J.E.; Feldmesser, E.; Da, Y.; Wiggans, G.R.; VanRaden, P.M. und Lewin, H.A.: A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiol Genomics*, 1(3):165-75, 1999.
- Hills, D., Tracey, S., Masabanda, J., Fries, R., Schalkwyk, L.C., Lehrach, H., Miller, R.J., und Williams, J.L.: A bovine YAC library containing four - to five-fold genome equivalents. *Mamm Genome*, 10(8):837-8, 1999.
- Houseal, T.W.; Dackowski, W.R.; Landes, G.M. und Klinger, K.W.: High resolution mapping of overlapping cosmids by fluorescence in situ hybridization. *Cytometry*, 15(3):193-8, 1994.
- Ioannou, P.A.; Amemiya, C.T.; Garnes, J.; Kroisel, P.M.; Shizuya, H.; Chen, C.; Batzer, M.A. und de Jong, P.J.: A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet*, 6(1):84-9, 1994.
- Ioannou, P.A. und de Jong, P.: Construction of a bacterial artificial chromosome library using the modified p1 (pac) system. *Current protocols in human genetics*, Supplement 9:5.15.1-5.15.24, 1996.
- Jaubert, J.; Jaubert, F.; Martin, N.; Washburn, L.L.; Lee, B.K.; Eicher, E.M. und Guenet, J.L.: Three new allelic mouse mutations that cause skeletal overgrowth involve the natriuretic peptide receptor C gene (Npr3). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(18):10278-83, 1999.

- Joerg, H.; Garner, D.; Rieder, S.; Suwattana, D. und Stranzinger, G.: Molecular genetic characterization of Robertsonian translocations in cattle. *J Anim Breed Genet*, 118:371-377, 2001.
- Jones, H.B.: Estimating physical distances from radiation hybrid mapping data. *Genomics*, 43(3):258-66, 1997.
- Kappes, S.M.; Keele, J.W.; Stone, R.T.; McGraw, R.A.; Sonstegard, T.S.; Smith, T.P.; Lopez-Corrales, N.L. und Beattie, C.W.: A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res*, 7(3):235-49, 1997.
- Karlsen, A.: A genetic study of twinning rate in Norwegian Cattle. Department of Animal Science: Agricultural University of Norway, 2000.
- Knott, S.A. und Haley, C.S.: Maximum likelihood mapping of quantitative trait loci using full-sib families. *Genetics*, 132(4):1211-22, 1992.
- Kosambi, D.D.: The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen*, 12:172-175, 1944.
- Kruglyak, L.: The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet*, 17(1):21-4, 1997.
- Kruglyak, L.: Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nature Genetics*, 22:139-144, 1999.
- Laan, M.; Kallioniemi, O.P.; Hellsten, E.; Alitalo, K.; Peltonen, L. und Palotie, A.: Mechanically stretched chromosomes as targets for high-resolution FISH mapping. *Genome Res*, 5(1):13-20, 1995.
- Lander, E.S. und Botstein, D.: Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, 121(1):185-99, 1989.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Frazier, M. und et al.: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860-921, 2001.

- Li, R.; Mignot, E.; Faraco, J.; Kadotani, H.; Cantanese, J.; Zhao, B.; Lin, X.; Hinton, L.; Ostrander, E.A.; Patterson, D.F. und de Jong, P.J.: Construction and characterization of an eightfold redundant dog genomic bacterial artificial chromosome library. *Genomics*, 58(1):9-17, 1999.
- Libert, F.; Lefort, A.; Okimoto, R.; Womack, J. und Georges, M.: Construction of a bovine genomic library of large yeast artificial chromosome clones. *Genomics*, 18(2):270-6, 1993.
- Lichter, P.; Tang, C.-J.C.; Call, K.; Hermanson, G.; Evans, G.A.; Housman, D. und Ward, D.C.: High resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science*, 247:64-69, 1990.
- Lien, L.L.; Boyce, F.M.; Kleyn, P.; Brzustowicz, L.M.; Menninger, J.; Ward, D.C.; Gilliam, T.C. und Kunkel, L.M.: Mapping of human microtubule-associated protein 1B in proximity to the spinal muscular atrophy locus at 5q13. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(17):7873-6, 1991.
- Lien, S.; Karlsen, A.; Klemetsdal, G.; Vage, D.I.; Olsaker, I.; Klungland, H.; Aasland, M.; Heringstad, B.; Ruane, J. und Gomez-Raya, L.: A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting twinning rate. *Mamm Genome*, 11(10):877-82, 2000.
- Litt, M. und Luty, J.A.: A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet*, 44:397-401, 1989.
- Liu, B.-H.: Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis. Boca Raton: CRC Press LLC, 1998.
- Lyons, L.A., Laughlin, T.F., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Womack, J.E. und O'Brien, S.J.: Comparative anchored tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nat Genet*, 15(1):47-56, 1997.
- Ma, R.Z.; Beever, J.E.; Da, Y.; Green, C.A.; Russ, I.; Park, C.; Heyen, D.W.; Everts, R.E.; Fisher, S.R.; Overton, K.M.; Teale, A.J.; Kemp, S.J.; Hines, H.C.; Guerin, G. und Lewin, H.A.: A male linkage map of the cattle (*Bos taurus*) genome. *J Hered*, 87(4):261-71, 1996.
- Mackay, T.F.: The genetic architecture of quantitative traits. *Annu Rev Genet*, 35:303-39, 2001.
- Mangin, B.; Goffinet, B. und Rebai, A.: Constructing confidence intervals for QTL location. *Genetics*, 138(4):1301-8, 1994.

- McPherson, J.D., Marra, M., Hillier, L., Waterston, R.H., Asakawa, S. und et al.: A physical map of the human genome. *Nature*, 409(6822):934-41, 2001.
- Meuwissen, T.H. und Goddard, M.E.: Fine mapping of quantitative trait loci using linkage disequilibria with closely linked marker loci. *Genetics*, 155(1):421-30, 2000.
- Meyerowitz, E.M.; Guild, G.M.; Prestidge, L.S. und Hogness, D.S.: A new high-capacity cosmid vector and its use. *Gene*, 11(3-4):271-82, 1980.
- Milan, D.; Le Roy, P.; Woloszyn, N.; Caritez, J.C.; Elsen, J.M.; Sellier, P. und Gellin, J.: The *RN* locus for meat quality maps to pig chromosome 15. *Genet Sel Evol*, 27:195-199, 1995.
- Moody, D.E.; Pomp, D.; Barendse, W. und Womack, J.E.: Assignment of the growth hormone receptor gene to bovine chromosome 20 using linkage analysis and somatic cell mapping. *Anim Genet*, 26(5):341-3, 1995.
- Morton, N.E.: Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet*, 7:277-318, 1955.
- Neimann-Sorensen, A. und Robertson, A.: The association between blood groups and several production characteristics in three Danish cattle breeds. *Acta Agric Scand*, 11, 1961.
- Nickerson, D.A.; Tobe, V.O. und Taylor, S.L.: PolyPhred: automating the detection and genotyping of single nucleotide substitutions using fluorescence-based resequencing. *Nucleic Acids Res*, 25(14):2745-51, 1997.
- Nickerson, D.A.; Taylor, S.L.; Weiss, K.M.; Clark, A.G.; Hutchinson, R.G.; Stengard, J.; Salomaa, V.; Vartiainen, E.; Boerwinkle, E. und Sing, C.F.: DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nat Genet*, 19(3):233-40, 1998.
- O'Brien, S.J.: Mammalian genome mapping: lessons and prospects. *Curr Opin Genet Dev*, 1(1):105-11, 1991.
- Osoegawa, K.; Woon, P.Y.; Zhao, B.; Frengen, E.; Tateno, M.; Catanese, J.J. und de Jong, P.J.: An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries. *Genomics*, 52(1):1-8, 1998.
- Pinkel, D.; Straume, T. und Gray, J.W.: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(9):2934-8, 1986.
- Popescu, C.P.; Long, S.; Riggs, P.; Womack, J.; Schmutz, S.; Fries, R. und Gallagher, D.S.: Standardization of cattle karyotype nomenclature: report of the committee for the standardization of the cattle karyotype. *Cytogenet Cell Genet*, 74(4):259-61, 1996.

- Puel, A.; Ziegler, S.F.; Buckley, R.H. und Leonard, W.J.: Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet*, 20(4):394-7, 1998.
- Rigby, P.W.J.; Dieckmann, M.; Rhodes, C. und Berg, P.: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol*, 113:237-251, 1977.
- Riquet, J.; Coppieters, W.; Cambisano, N.; Arranz, J.J.; Berzi, P.; Davis, S.K.; Grisart, B.; Farnir, F.; Karim, L.; Mni, M.; Simon, P.; Taylor, J.F.; Vanmanshoven, P.; Wagenaar, D.; Womack, J.E. und Georges, M.: Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: application to milk production in dairy cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(16):9252-7, 1999.
- Roach, J.C.; Boysen, C.; Wang, K. und Hood, L.: Pairwise end sequencing: a unified approach to genomic mapping and sequencing. *Genomics*, 26(2):345-53, 1995.
- Rogel-Gaillard, C.; Bourgeaux, N.; Billault, A.; Vaiman, M. und Chardon, P.: Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. *Cytogenet Cell Genet*, 85(3-4):205-11, 1999.
- Ron, M.; Kliger, D.; Feldmesser, E.; Seroussi, E.; Ezra, E. und Weller, J.I.: Multiple quantitative trait locus analysis of bovine chromosome 6 in the israeli holstein population by a daughter design. *Genetics*, 159(2):727-35, 2001.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T.: *Molecular cloning -- A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463-7, 1977.
- Schenck, M. und Kolb, E.: *Grundriß der physiologischen Chemie*. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1990.
- Schibler, L.; Vaiman, D.; Oustry, A.; Guinec, N.; Dangy-Caye, A.L.; Billault, A. und Cribiu, E.P.: Construction and extensive characterization of a goat bacterial artificial chromosome library with threefold genome coverage. *Mamm Genome*, 9(2):119-24, 1998.
- Schuler, G.D.; Boguski, M.S.; Stewart, E.A.; Stein, L.D.; Gyapay, G.; Hudson, T.S. und et al.: A gene map of the human genome. *Science*, 274:540-546, 1996.
- Shizuya, H.; Birren, B.; Kim, U.J.; Mancino, V.; Slepak, T.; Tachiiri, Y. und Simon, M.: 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 U S A*, 89(18):8794-7, 1992.

- Siegel, A.F.; van den Engh, G.; Hood, L.; Trask, B. und Roach, J.C.: Modeling the feasibility of whole genome shotgun sequencing using a pairwise end strategy. *Genomics*, 68:237-246, 2000.
- Smith, T.P.; Alexander, L.J.; Sonstegard, T.S.; Yoo, J.; Beattie, C.W. und Broom, M.F.: Construction and characterization of a large insert bovine YAC library with five-fold genomic coverage. *Mamm Genome*, 7(2):155-6, 1996.
- Solinas-Toldo, S.; Lengauer, C. und Fries, R.: Comparative genome map of human and cattle. *Genomics*, 27(3):489-96, 1995.
- Sonstegard, T.S. und Kappes, S.M.: Mapping of the SDHA locus to bovine chromosome 20. *Anim Genet*, 30(6):473, 1999.
- Steele, M.R. und Georges, M.: Generation of bovine multisite haplotypes using random cosmid clones. *Genomics*, 10(4):889-904, 1991.
- Stone, R.T.; Pulido, J.C.; Duyk, G.M.; Kappes, S.M.; Keele, J.W. und Beattie, C.W.: A small-insert bovine genomic library highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Mamm Genome*, 6(10):714-24, 1995.
- Stone, R.T.; Kappes, S.M.; Keele, J.W. und Beattie, C.W.: Characterization of 109 bovine microsatellites. *Anim Genet*, 28(1):62-6, 1997.
- Strong, S.J.; Ohta, Y.; Litman, G.W. und Amemiya, C.T.: Marked improvement of PAC and BAC cloning is achieved using electroelution of pulsed-field gel-separated partial digests of genomic DNA. *Nucleic Acids Res*, 25(19):3959-61, 1997.
- Takeda, H.; Yamakuchi, H.; Ihara, N.; Hara, K.; Watanabe, T.; Sugimoto, Y.; Oshiro, T.; Kishine, H.; Kano, Y. und Kohno, K.: Construction of a bovine yeast artificial chromosome (YAC) library. *Anim Genet*, 29(3):216-9, 1998.
- Tautz, D.: Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res*, 17(16):6463-71, 1989.
- Terwilliger, J.D.: A powerful likelihood method for the analysis of linkage disequilibrium between trait loci and one or more polymorphic marker loci. *Am J Hum Genet*, 56(3):777-87, 1995.
- Thaller, G.: Fortran 90 Programm zur Auswertung der möglichen Anordnungen von 11 Loci. unveröffentlicht, 2001.

- Thiel, S.; Behrmann, I.; Timmermann, A.; Dahmen, H.; Muller-Newen, G.; Schaper, F.; Tavernier, J.; Pitard, V.; Heinrich, P.C. und Graeve, L.: Identification of a Leu-Ile internalization motif within the cytoplasmic domain of the leukaemia inhibitory factor receptor. *Biochem J*, 339(Pt 1):15-9, 1999.
- Thomsen, H.; Reinsch, N.; Xu, N.; Looft, C. und Grupe, S.: A male bovine linkage map for the ADR granddaughter design. *Journal of animal breeding and genetics*, 117:289-306, 2000.
- Urbanek, M.; Legro, R.S.; Driscoll, D.A.; Azziz, R.; Ehrmann, D.A.; Norman, R.J.; Strauss, J.F., 3rd; Spielman, R.S. und Dunaif, A.: Thirty-seven candidate genes for polycystic ovary syndrome: strongest evidence for linkage is with follistatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(15):8573-8, 1999.
- Urbanek, M.; Wu, X.; Vickery, K.R.; Kao, L.C.; Christenson, L.K.; Schneyer, A.; Legro, R.S.; Driscoll, D.A.; Strauss, J.F., 3rd; Dunaif, A. und Spielman, R.S.: Allelic variants of the follistatin gene in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(12):4455-61, 2000.
- Vaiman, D.; Mercier, D.; Moazami-Goudarzi, K.; Eggen, A.; Ciampolini, R.; Lepingue, A.; Velmala, R.; Kaukinen, J.; Varvio, S.L.; Martin, P. und et al.: A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mamm Genome*, 5(5):288-97, 1994.
- Vaiman, D.: The molecular genetics of cattle. In: Fries, R. und Ruvinsky, A., eds.: The genetics of cattle. New York: CABI Publishing, 1999.
- Vincent, A.L. und Evans, G.: The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs. 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 11th-16th January, Armidale, Australien, 1998.
- Visscher, P.M.; Thompson, R. und Haley, C.S.: Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics*, 143(2):1013-20, 1996.
- Vogeli, P.; Bertschinger, H.U.; Stamm, M.; Stricker, C.; Hagger, C.; Fries, R.; Rapacz, J. und Stranzinger, G.: Genes specifying receptors for F18 fimbriated *Escherichia coli*, causing oedema disease and postweaning diarrhoea in pigs, map to chromosome 6. *Anim Genet*, 27(5):321-8, 1996.
- Wada, M.; Abe, K.; Okumura, K.; Taguchi, H.; Kohno, K.; Imamoto, F.; Schlessinger, D. und Kuwano, M.: Chimeric YACs were generated at unreduced rates in conditions that suppress coligation. *Nucleic Acids Res*, 22(9):1651-4, 1994.

- Wang, D.G.; Fan, J.B.; Siao, C.J.; Berno, A.; Young, P.; Sapolsky, R.; Ghandour, G.; Perkins, N.; Winchester, E.; Spencer, J.; Kruglyak, L.; Stein, L.; Hsie, L.; Topaloglou, T.; Hubbell, E.; Robinson, E.; Mittmann, M.; Morris, M.S.; Shen, N.; Kilburn, D.; Rioux, J.; Nusbaum, C.; Rozen, S.; Hudson, T.J.; Lander, E.S. und et al.: Large-scale identification, mapping, and genotyping of single nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280(5366):1077-82, 1998.
- Warren, W.; Smith, T.P.; Rexroad, C.E., 3rd; Fahrenkrug, S.C.; Allison, T.; Shu, C.L.; Catanese, J. und de Jong, P.J.: Construction and characterization of a new bovine bacterial artificial chromosome library with 10 genome-equivalent coverage. *Mamm Genome*, 11(8):662-3, 2000.
- Watson, J.D.; Gilman, M.; Witkowski, J. und Zoller, M.: Rekombinierte DNA. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1993.
- Weber, J.L. und May, P.E.: Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*, 44(3):388-96, 1989.
- Weiss, K.M. und Terwilliger, J.D.: How many diseases does it take to map a gene with SNPs? *Nat Genet*, 26(2):151-7, 2000.
- Weissenbach, J.; Gyapay, G.; Dib, C.; Vignal, A.; Morissette, J.; Millasseau, P.; Vaysseix, G. und Lathrop, M.: A second-generation linkage map of the human genome. *Nature*, 359(6398):794-801, 1992.
- Weller, J.I.; Kashi, Y. und Soller, M.: Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 73(9):2525-37, 1990.
- Wilson, T.; Wu, X.Y.; Juengel, J.L.; Ross, I.K.; Lumsden, J.M.; Lord, E.A.; Dodds, K.G.; Walling, G.A.; McEwan, J.C.; O'Connell, A.R.; McNatty, K.P. und Montgomery, G.W.: Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod*, 64(4):1225-35, 2001.
- Womack, J.E. und Kata, S.R.: Bovine genome mapping: evolutionary inference and the power of comparative genomics. *Curr Opin Genet Dev*, 5(6):725-33, 1995.
- Womack, J.E.; Johnson, J.S.; Owens, E.K.; Rexroad, C.E.; Schlapfer, J. und Yang, Y.P.: A whole-genome radiation hybrid panel for bovine gene mapping. *Mamm Genome*, 8(11):854-6, 1997.

Zhang, Q.; Boichard, D.; Hoeschele, I.; Ernst, C.; Eggen, A.; Murkve, B.; Pfister-Genskow, M.; Witte, L.A.; Grignola, F.E.; Uimari, P.; Thaller, G. und Bishop, M.D.: Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. *Genetics*, 149(4):1959-73, 1998.

Zimmer, R. und Verrinder Gibbins, A.M.: Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics*, 42(2):217-26, 1997.

Eigene Publikationen:

Buitkamp, J.; Kollers, S.; Durstewitz, G.; Fries, R.; Welzel, K.; Schafer, K.; Kellermann, A. und Lehrach, H.: Construction and characterization of a gridded cattle BAC library. *Anim Genet*, 31(6):347-51, 2000.

Kollers, S.; Buitkamp, J.; Grisart, B.; Georges, M. und Fries, R.: Physische Kartierung von Markern und Kandidatengenen für Milchleistungsmerkmale auf dem Chromosom 20 des Rindes. Vortrag auf der Vortragstagung der DGfZ und GfT am 15./16. September 1999, Giessen, Deutschland.

Kollers, S. und Fries, R.: Physical mapping of the interleukin-7 receptor gene (IL7R) to bovine chromosome 20q15-q17. *Anim Genet*, 31(4):290-1, 2000.

Kollers, S.; Buitkamp, J.; Grisart, B.; Georges, M. und Fries, R.: Physical mapping of markers and candidate genes in a QTL-region on bovine chromosome 20. 27nd ISAG, Minnesota, USA, 22-26 July, 2000.

Zhu, B.; Smith, J.A.; Tracey, S.M.; Konfortov, B.A.; Welzel, K.; Schalkwyk, L.C.; Lehrach, H.; Kollers, S.; Masabanda, J.; Buitkamp, J.; Fries, R.; Williams, J.L. und Miller, J.R.: A 5x genome coverage bovine BAC library: production, characterization, and distribution. *Mamm Genome*, 10(7):706-9, 1999.

Zhu, B.; Smith, J.A.; Buitkamp, J.; Kollers, S.; Tracey, S.M.; Williams, J.L.; Fries, R. und Miller, J.R.: Construction and characterization of a high genome coverage bacterial artificial chromosome library for bovine genome. 26nd ISAG, Auckland, New Zealand, 9-14 August, *Anim Genet*, 29,suppl. 1,42, 1998.

Verwendete Internetadressen (URLs):

- URL 1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
- URL 2: <http://morgan.angis.su.oz.au/Databases/BIRX/omia>
- URL 3: <http://www.ornl.gov/hgmis/publicat/primer/prim2.html>
- URL 4: <http://www.thearkdb.org/anubis>
- URL 5: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap99>
- URL 6: <http://locus.jouy.inra.fr>
- URL 7: <http://www.rzpd.de>
- URL 8: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- URL 9: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
- URL 10: <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3-www.cgi>
- URL 11: <http://www.gdb.org/gdbreports/GenByChromosome.5.alpha.html>
- URL 12: <http://www.neb.com/neb/products/nucleic/355-1.html>
- URL 13: <http://www.cmbi.kun.nl/gv/aainfo/pam250.shtml>
- URL 14: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/MmLibrary.html>
- URL 15: http://ohioline.osu.edu/sc170/sc170_5.html
- URL 16: <http://www.nisc.nih.gov/projects/zooseq.html>

6 Anhang

Tab.23A: Lösungen und Puffer

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung
10 x <i>Bam</i> HI-Reaktionspuffer	1,5 M NaCl (Merck, 1.06404), 0,1 M Tris (Roth, 4855.2), 0,1 M MgCl ₂ (Merck, 814733), 10 mM Dithiothreitol (Sigma, D-9163), 1 mg/ml BSA (Sigma, A-9647)
<i>Church</i> Puffer	0,34 M Na ₂ HPO ₄ (Merck, 106586), 0,16 M NaH ₂ PO ₄ (Merck, 106370), 5 % SDS (Roth, 2326.2), 1 mM EDTA (Sigma, ED2SS) pH 8,0
dNTP-Mischung	dNTP set 100 mM solutions (MBI Fermentas, R0181), Mix herstellen, in dem jedes der vier dNTPs 2 mM vorliegt
1 x <i>Dpn</i> II-Reaktionspuffer	50 mM Tris, 0,1 M NaCl, 1 mM Dithiothreitol
Dulbecco's Minimum Essential Medium (Biochrom KG seromed®, T041-10) komplementiert	365,3 mg L-Glutamin (Biochrom, K0283) pro Liter, 10 % Fötale Kälberserum (Biochrom, S0115), 1 % Antibiotic-antimycotic (Gibco BRL), 1 % Brenztraubensäure Natriumsalz (Merck, 106619)
10 x <i>Eco</i> RI-Reaktionspuffer	0,5 M NaCl, 1 M Tris, 0,1 M MgCl ₂ , 2,5 % Triton X-100 (Serva, 37240)
10 x <i>Hind</i> III-Reaktionspuffer	0,5 M NaCl, 0,1 M Tris, 0,1 M MgCl ₂ , 10 mM Dithiothreitol
Hybridisierungsmischung	10 % Dextransulfat (Sigma D-6001), 50 % Formamid (Fluka, 47670), 1 % Tween 20 (polyoxyethylenesorbitanmonolaurate, Sigma, 5927) in 2 x SSC
10 x <i>Mlu</i> I-Reaktionspuffer	1 M NaCl, 0,5 M Tris, 0,1 M MgCl ₂ , 10 mM Dithiothreitol
10 x <i>Nick</i> -Translationspuffer	0,5 M Tris, 50 mM MgCl ₂ , 500 µg/ml BSA
P1 für Plasmid-Präparation (nach Qia-gen)	50 mM Tris, 10 mM EDTA
P2 für Plasmid-Präparation (nach Qia-gen)	0,2 M NaOH, 1 % SDS
P3 für Plasmid-Präparation (nach Qia-gen)	3 M KAc (Merck, 104820)
1 x PBS	0,14 M NaCl, 3 mM KCl (Merck, 104936), 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ (Merck, 104871)
1 x Proteinase K-Reaktionspuffer	0,1 M EDTA, pH 8,0, 10 mM Tris, 20 mM NaCl
1 x <i>RBC-lysis solution</i>	0,18 M NH ₄ Cl (Merck, 101145), 3 mM NH ₄ HCO ₃ (Merck, 101131)
SOC-Medium	2 % Trypton (Gibco BRL, 30392-021), 0,5 % Hefe-Extrakt (Gibco BRL, 30393-029), 0,05 % NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM Glucose (Merck, 108337), 10 mM MgSO ₄ (Sigma, M7506)
Söhrensens Puffer pH 6,8	0,67 mM KH ₂ PO ₄ , 0,67 mM Na ₂ HPO ₄
20 x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat
10 x T4-DNA-Ligase-Reaktionspuffer	0,4 M Tris, 0,1 M MgCl ₂ , 0,1 M Dithiothreitol, 5 mM ATP (Sigma, A3377)
1 x TAE	40 mM Tris, 1,1 ml Eisessig (Fisher Scientific, A/0400/PB17) pro l, 2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 pro l
10 x TBE	0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 20 mM EDTA
1 x TE	10 mM Tris, 1 mM EDTA

Tab.24A: Enzyme

Enzym	Konzentration	Firma
<i>Bam</i> HI	20 U/ μ l	New England Biolabs, R0136L
<i>Dpn</i> II	10 U/ μ l	New England Biolabs, R0543L
<i>Eco</i> RI	20 U/ μ l	New England Biolabs, R0101S
<i>Hind</i> III	20 U/ μ l	New England Biolabs, R0104S
<i>Mlu</i> I	10 U/ μ l	New England Biolabs, R0198L
<i>Not</i> I	10 U/ μ l	MBI Fermentas ER0592
Proteinase K	20 mg/ml	MBI Fermentas E00491
Shrimp Intestine Phosphatase (SIP)	1 U/ μ l	Boehringer Mannheim, 713023
T4-DNA-Ligase	5 U/ μ l	MBI Fermentas, EL0011

Tab.25A: Kits

Art	Name	Firma (Katalognummer)
<i>Kit</i> für die Biotin-Markierung	BioNick™ Labeling System	Gibco BRL (18247-015)
<i>Kit</i> für die Midi-Präparation	Qiagen Plasmid Midi Kit (100)	Qiagen (12145)
<i>Kit</i> für die Maxi-Präparation	Qiagen Large-Construct Kit (10)	Qiagen (12462)
<i>Kit</i> für die Sondenmarkierung zum Filterscreenen	Megaprime™ DNA labelling systems	Amersham Pharmacia (RPN 1605)
PCR-Aufreinigungskit	Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen (28104)
PCR- <i>Kit</i>	AmpliTaq®DNA Polymerase	Perkin Elmer Applied Biosystems (Roche, N808-0156)

Tab.26A: Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma
Streptavidin-Cy3™	1:1000	Rockland, S000-04
Mouse-anti-Digoxigenin	1:200	Boehringer Mannheim, 1333062
Avidin-FITC	1:200	Vector Laboratories, A-2011
Sheep-anti-Mouse-FITC	1:500	Sigma, F30088

Tab.27A: Reaktionsgefäße

Art	Firma
200 ml Erlenmeyerkolben	Roth, C147.1
1 l Erlenmeyerkolben	Roth, C151.1
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorff, 0030 120.086
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorff, 0030 120.094
15 ml Reaktionsgefäße	Becton Dickinson, 352097
50 ml Reaktionsgefäße	Becton Dickinson, 352070

Tab.28A: Details zur Entwicklung der PCR-Primer

Locus	Spezies ¹	GenBank Accession no.	Lokalisation des PCR-Produktes
<i>ANPRC</i>	BTA	D90364	Bishop et al. 1994
<i>BMS1120</i>	BTA	G18620	Stone et al. 1995
<i>BMS2461</i>	BTA	G19013	Stone et al. 1997
<i>C6</i>	HSA	J04506	Exon 7
<i>FST</i>	BTA	L21716	Exon 5 (SSC) ²
<i>GHR</i>	BTA	AF044258	Exon 10 (HSA) ³
<i>HMGCS1</i>	HSA	NM_002130	Exon 3 (MAU) ⁴
<i>HTR1A</i>	HSA	M83181	„Trial and Error“
<i>IL7R</i>	HSA	NM_002185	Exon 8
<i>LIFR</i>	HSA	X61615	„Trial and Error“
<i>MAP1B</i>	BTA	Z29519	„Trial and Error“
<i>MYO10</i>	BTA	U55042	„Trial and Error“
<i>PRLR</i>	BTA	L02549	„Trial and Error“
<i>PTGER2</i>	HSA	U19487	„Trial and Error“
<i>SDHA</i>	BTA	M60879	Exon 9 (HSA) ³
<i>SLC1A3</i>	BTA	D82056, D29661	Exon 4 (HSA) ³

¹Spezies aufgrund deren Sequenz die Primer entwickelt wurden

²Primerposition in der bovinen Sequenz entspricht in der porcinen Sequenz Exon 5

³Primerposition in der bovinen Sequenz entspricht in der humanen Sequenz dem angegebenen Exon

⁴Primerposition in der bovinen Sequenz entspricht in der Sequenz des Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*) Exon 3

Tab.29A: Spezifität der BAC-Klone, die unter der Verwendung von *a priori* Wissen isoliert wurden

Locus	BAC-Klon TUM-Nr.	Kolonie-PCR Ergebnis ¹	GenBank Accession no. ²	chromosomale Position
<i>ANPRC</i>	518	+	- ³	BTA20
	519	-		n. H. ⁴
<i>BMS2461</i>	748	+	-	BTA20
	749	+	-	BTA20
	750	+	-	BTA20
	751	-	-	n. H. ⁴
	752	+	-	BTA20
	753	-	-	n. H. ⁴
	754	-	-	n. H. ⁴
	755	+	-	BTA20
	756	+	-	BTA20
	768	+	-	BTA20
<i>FST</i>	725	+	L21716	BTA20
	727	-		BTA15
	730	+	L21716	BTA20
<i>GHR</i>	510	-		n. H. ⁴
	511	+	AF044258	BTA20
	512	+	AF044258	BTA20
	513	+	AF044258	BTA20
	514	-		BTA1
<i>HMGCS1</i>	729	+	X66435	BTA20
	733	+	X66435	BTA20
<i>IL7R</i>	507	+	XM004013	BTA20
<i>LIFR</i>	732	+	U91518	BTA20
<i>MAP1B</i>	778	+	Z29519	BTA20
<i>PRLR</i>	508	+	AF027403	BTA20
	509	-		n. H. ⁴
<i>SDHA</i>	735	+	M60879	BTA20
	736	+	M60879	BTA20
	758	+	M60879	BTA20
	759	-		n. H. ⁴
	770	+	M60879	BTA20
	771	-		n. H. ⁴
<i>SLCIA3</i>	520	-		BTA17
	731	+	D82056	BTA20

¹+ = PCR-Produkt, - = kein PCR-Produkt

²GenBank Accession no. der Sequenz, die die beste Übereinstimmung mit der Sequenz des PCR-Produktes aus der Kolonie-PCR zeigt, ermittelt durch *BLAST*

³es wurde keine Sequenzübereinstimmung über *BLAST* identifiziert

⁴der Klon wurde nicht hybridisiert

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hans-Rudolf Fries danke ich für die Überlassung des Themas, seine Hilfe in schwierigen Situationen, sowie die stetige Bereitschaft zur Lösung von Problemen.

Herrn Dr. Johannes Buitkamp danke ich für seine Hilfsbereitschaft und die Betreuung während der Erstellung und der Charakterisierung der BAC-Bank.

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei Herrn Wolfgang Krämer, „dem Mann aus meinem Büro“ für seine Unterstützung und Kameradschaft.

Bei Herrn Dr. Gregor Durstewitz möchte ich mich für die kritische Durchsicht meiner Arbeit bedanken. Ebenfalls danke ich ihm für die Kameradschaft und die ständige Bereitschaft zu neuen Schandtaten.

Bei Herrn Dr. Georg Thaller bedanke ich mich für die statistische Auswertung der Zweifarbigen-FISH und etliche abendliche Biere sowie einige Niederlagen beim Dart-Spiel.

Für Unterstützung und Freundschaft möchte ich mich bei einigen weiteren „Laborratten“ bedanken: Carmen Biet, Dr. Katalin Bodis, Dr. Dagmar Ewald, Petra Feichtlbauer-Huber, Ute Finkel.

Bedanken möchte ich mich bei: Rudi Antes für die Präparation der bovinen DNA; E. Frengen und P. de Jong für die Bereitstellung des Klonierungsvektors; M. Georges und B. Grisart für die Überlassung der BAC-Klone; allen Mitarbeitern des RZPD, die eine Zusammenarbeit durch ihre schnelle Reaktion auf sämtliche Anfragen angenehm gemacht haben; J. Womack und S. Kata für die Überlassung des *Radiation Hybrid Panels* und die Auswertung der Kartierungsergebnisse; G. Stranzinger für die Überlassung der Translokationszelllinie.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die zwar nie genau gewußt hat, was ich so treibe, aber immer an meinen Erfolg geglaubt hat.

Ich danke allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tierzucht, die zu einem angenehmen Arbeitsklima und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Diese Arbeit wurde dankenswerterweise für drei Jahre durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziert.