

**Erstellung eines BAC/PAC-Contigs auf
SSC 6q1.2 und vergleichende Analyse
dieser Genomregion**

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Biol. Rodja Christoph Voß-Nemitz

geboren am 06.07.1973 in Bad Segeberg

2005

Referent: Prof. Dr. Tosso Leeb

Korreferent: Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen

Tag der Promotion: 17.März 2005

meinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit

Vollständige Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Originalartikel:

1. C Drögemüller, H Kuiper, R Voß-Nemitz, B Brenig, O Distl, T Leeb (2001)
Molecular characterization of the porcine gene *COX7A1* for the muscle specific cytochrome c oxidase subunit VIIa-M. *Cytogenet Cell Genet* **94**:190-193.
2. F Martins, R Voß-Nemitz, C Drögemüller, B Brenig, T Leeb (2002)
Construction of a 1.2 Mb BAC/PAC contig of the porcine *RYS1* gene region on SSC 6q1.2 and comparative analysis with HSA 19q13.13. *Genomics* **80**: 416-422.
3. F Martins-Wess, D Milan, C Drögemüller, R Voß-Nemitz, B Brenig, A Robic, M Yerle, T Leeb (2003)
A high resolution physical and RH map of pig chromosome 6q1.2 and comparative analysis with human chromosome 19q13.1. *BMC Genomics* **4**: 20.
4. F Martins-Wess, G Rohrer, R Voß-Nemitz, C Drögemüller, B Brenig, A Robic, M Yerle, D Milan, T Leeb (2003)
Generation of a 5.5 Mb BAC/PAC contig of a pig chromosome 6q1.2 and its integration with existing RH, genetic and comparative maps. *Cytogenet Genome Res* **102**:116-120.

Poster und Kongressbeiträge:

1. F Martins-Wess, R Voß-Nemitz, C Drögemüller, B Brenig, T Leeb
Erzeugung eines BAC/PAC-Contigs in der Region des porcinen *RYR1* Gens auf SSC 6q1.2 und vergleichende Analyse mit der syntänischen Region auf HSA 19q13.13 - Poster auf der DGfZ/GfT - Gemeinschaftstagung 2002 in Halle, Deutschland, 18.-19.09.2002
2. F Martins, R Voß-Nemitz, C Drögemüller, B Brenig, T Leeb
Construction of a 1.2 Mb BAC/PAC Contig of the Porcine Gene *RYR1* Region on SSC 6q1.2 and Comparative Analysis with Human 19q13.13 - Poster auf dem 28. International Society of Animal Genetics (ISAG) Meeting in Göttingen, Deutschland, 11.-15.08.2002; A15, Blackwell Publishing (2002) ISBN 3-00-010597-2
3. F Martins-Wess, R Voß-Nemitz, C Drögemüller, O Distl, D Milan, G Rohrer, B Brenig, T Leeb
Feinkartierung von Schweinechromosom SSC6 q1.2 und vergleichende Genomanalyse mit syntänischen Genomabschnitten anderer Säugetiere - DGfZ/GfT - Gemeinschaftstagung, 17./18. September 2003 in Göttingen

Zusammenfassung

In dem Projekt sollte ein BAC/PAC-Contig von der Region SSC 6q1.2 erzeugt werden. In dieser chromosomalen Region befindet sich beim Schwein mit dem *RYR1* Gen der Genort für die maligne Hyperthermie (MH), die zur Streßanfälligkeit führt. Eng gekoppelt mit der Stressanfälligkeit werden auch günstige Merkmale wie starke Bemuskelung und hoher Magerfleischanteil vererbt. Trotz weltweiter, intensiver Forschungsaktivitäten ist bis heute nicht klar, ob die ursächliche Mutation für die Streßanfälligkeit im *RYR1* Gen gleichzeitig auch für den positiven Effekt auf die Fleischleistung verantwortlich ist, oder ob dieser Effekt von einer zweiten Mutation in einem eng benachbarten Gen verursacht wird.

Die Klonierung dieser genomischen Region als BAC/PAC-Contig ist ein wichtiger Schritt zur Identifizierung aller Gene dieser chromosomalen Region. Die Kenntnis aller Gene der Region wäre eine Grundvoraussetzung für die rationale Auswahl von Kandidatengen bei der Analyse der Fleischleistungsmerkmale. Weiterhin würde ein solcher BAC/PAC-Contig eine wesentlich genauere Integration der existierenden physikalischen und genetischen Karten sowie letztendlich die vollständige Sequenzierung der Region ermöglichen. Die Aufklärung der DNA-Sequenz der codierenden Bereiche dieser chromosomalen Region ist wiederum die Grundvoraussetzung für eine systematische Mutationsanalyse. Diese ist notwendig, um die funktionellen Polymorphismen aufdecken zu können, die für die beobachteten phänotypischen Effekte hinsichtlich der Fleischleistung verantwortlich sind. Durch die Daten des humanen Genomprojektes ist die Lokalisierung von Genen auf dem Contig wesentlich erleichtert worden. Durch die detaillierte physikalische Karte ist es nun möglich, die Genreihenfolge mit anderen Spezies zu vergleichen.

Es wurde ein BAC/PAC-Contig der chromosomalen Region SSC 6q1.2 erstellt, um die Region zwischen den Genen *GPI* und *LIPE* auch beim Schwein physikalisch zu kartieren.

Hierfür wurde eine porcine PAC-Genbank (TAIGP714) mit 3,2 haploiden Genomäquivalenten und einer durchschnittlichen Insertgröße von 120 kb und eine BAC-Genbank (RPCI-44) mit 10 haploiden Genomäquivalenten und einer durchschnittlichen Insertgröße von 165 kb durchmustert. Für die Durchmusterung der BAC- und der PAC-Genbank wurden insgesamt 61 STS Marker aus den orthologen Genen der syntänischen Region auf HSA 19q13 und 157 STS Marker aus den nicht-repetitiven Randsequenzen isolierter Contig-Klone verwendet.

Der Contig umfaßt 6,2 Mb und besteht aus 268 BAC-Klonen und 93 PAC-Klonen, somit insgesamt aus 361 Klonen. Die klonbasierte physikalische Kartierung wurde durch Radiation Hybrid (RH) Kartierung von ausgewählten STS-Markern auf zwei verschiedenen RH-Panels überprüft und bestätigt. Die Genreihenfolge beim Schwein in der Region auf SSC 6q1.2 stimmt vollkommen mit der Genreihenfolge beim Menschen auf HSA 19q13 überein. Zwei Kandidatengene für muskelspezifische Merkmale, *COX7A1* und *CAPNS1* wurden umfassend charakterisiert.

Summary

The *RYS1* gene region on the porcine chromosome 6q1.2 is known to harbor the locus for malignant hyperthermia (MH) or stress susceptibility. Porcine stress syndrome (PSS) has been responsible for economic losses in stress-susceptible pigs. These animals have increased muscling and lean meat content. So far it is unknown whether only the *RYS1* mutation is responsible for the positive carcass traits in stress-susceptible pigs or if these complex growth traits are influenced by other closely linked genes on SSC 6q1.2.

The purpose of this study was to construct a detailed physical map of the *RYS1* gene region as an important resource for the DNA sequencing of the coding regions on the porcine chromosome 6q1.2. The data generated here are a prerequisite for a mutation analysis necessary to find a functional polymorphism responsible for the observed phenotypes. Another reason for the construction of the contig is to integrate the physical and genetic maps. The completion of the human genome project facilitates the identification and the localization of genes in the physical map, leading to a comparative analysis between different species.

To generate a detailed physical map between the genes *GPI* and *LIFE* on SSC 6q1.2, a porcine bacterial artificial chromosome (BAC) and a P1 derived artificial chromosome (PAC) library were screened, resulting in a sequence-ready 6.2 Mb BAC/PAC-contig. Several heterologous probes from the extensively characterized human syntenic region on HSA 19q13 were used to screen both libraries. Gaps between clones were closed using a chromosome walking strategy, so that a single contig of 361 BAC and PAC clones was obtained. During the construction of the contig 218 new sequence - tagged site (STS) markers were generated. The clone - based physical map was validated and confirmed by radiation hybrid mapping. Comparative mapping of the porcine BAC/PAC-contig with respect to the gene-rich region on the human chromosome 19q13.1 map revealed a completely conserved gene order of this segment, however, physical distances differ somewhat between HSA 19q13.1 and SSC 6q1.2.

Two candidate genes for muscle specific traits *COX7A1* and *CAPNS1* were characterized in detail.

Schlagwörter:

BAC/PAC-Contig, SSC 6, vergleichende Genomanalyse

key words:

BAC/PAC-contig, SSC 6, comparative mapping

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Summary	IV
Erklärungen	X
Verzeichnis der Abbildungen	XI
Verzeichnis der Tabellen	XII
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	XIII
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2 - 19
2.1 Genomanalyse.....	2
2.1.1 GENKARTIERUNG	2
2.1.2 VERGLEICHENDE GENOMKARTIERUNG	4
2.1.3 GENOMANALYSE BEIM SCHWEIN	6
2.1.4 GENETISCHE MARKER	10
2.1.5 REPETITIVE DNA IN SÄUGERGENOMEN	10
2.1.6 AKTUELLER STAND DER GENOMANALYSE BEIM SCHWEIN	12
2.2 Maligne Hyperthermie und das <i>RYR1</i> Gen.....	15
2.2.1 MOLEKULARGENETISCHE BETRACHTUNG	15
2.2.2 DAS MALIGNEN HYPERTHERMIE-SYNDROM (MHS) BEI MENSCH UND SCHWEIN	15
2.3 Weitere muskelspezifische Gene auf Chromosom 6q1.2 des Schweins	18
2.3.1 DAS CYTOCHROM C OXIDASE (<i>COX7A1</i>) GEN	18
2.3.2 DAS <i>CAPNS1</i> GEN	18
3 Material	20 - 23
3.1 Bakterien, Plasmide, Genbanken	20
3.1.1 BAKTERIEN	20
3.1.2 PLASMIDE	20
3.1.3 GENBANKEN	20
3.2 Enzyme, Oligonucleotide und Chemikalien	21
3.2.1 ENZYME	21
3.2.2 OLIGONUCLEOTIDE	21
3.2.3 CHEMIKALIEN UND ANDERE MATERIALIEN	21
3.3 Laborgeräte	22
4 Methoden	24 - 41
4.1 Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNA	24
4.1.1 BAKTERIENKULTUR (AUSUBEL <i>ET AL.</i> , 1990).....	24
4.1.2 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA UND BAC/PAC-DNA AUS <i>E. COLI</i>	25
4.1.3 HERSTELLUNG TRANSFORMATIONS-KOMPETENTER <i>E. COLI</i> XL1-BLUE (HANAHAN, 1983) ...	29
4.1.4 TRANSFORMATION KOMPETENTER <i>E. COLI</i>	30
4.1.5 ERSTELLEN EINER SHOTGUN PLASMID GENBANK	31

4.2 Enzymatische Manipulation und Analyse von DNA	31
4.2.1 AUFTRENNUNG VON KLEINEN DNA-FRAGMENTEN	31
4.2.2 PULSFELDDGELELEKTROPHORESE (SCHWARTZ UND CANTOR, 1984).....	32
4.2.3 ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON DNA AUS AGAROSE-GELEN.....	32
4.2.4 ENZYMATISCHE MANIPULATION VON DNA	32
4.2.5 ALKALISCHER TRANSFER VON DNA AUF TRÄGERMEMBRANEN (REED UND MANN, 1985) ..	34
4.2.6 RADIOAKTIVE HYBRIDISIERUNG VON FILTERN MIT BAC-DNA (AUSUBEL <i>ET AL.</i> , 1990)	35
4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki <i>et al.</i> , 1988).....	36
4.3.1 DURCHMUSTERN DER GENBANKEN MITTELS PCR	36
4.3.2 RADIATION HYBRID-KARTIERUNG (RH-KARTIERUNG).....	38
4.4 DNA-Sequenzierung.....	38
4.4.1 NICHTRADIOAKTIVE SEQUENZIERUNG DOPPELSTRÄNGIGER DNA.....	38
4.4.2 HOCHAUFLÖSENDE GELELEKTROPHORESE.....	39
4.4.3 AUSWERTUNG DER SEQUENZGELE	39
4.5 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	39
4.6 Bioinformatik	40
4.6.1 LOKALE PROGRAMME.....	40
4.6.2 INTERNETSEITEN.....	40
5 Ergebnisse.....	42 - 57
5.1 Experimentelle Strategie.....	42
5.2 Erstellen des Contigs.....	43
5.2.1 ENTWICKLUNG UND ENTSTEHUNG DER CONTIG-KARTE.....	43
5.2.2 STATISTISCHE ERGEBNISZUSAMMENFASSUNG	45
5.3 Verifizierung des Contig-Assembly	46
5.3.1 VERIFIZIERUNG DURCH RH-KARTIERUNG	47
5.3.2 VERIFIZIERUNG DURCH BLAST-ANALYSEN	47
5.4 Analyse des Gengehalts.....	48
5.5 Erstellung einer integrierten Karte des Contigs	49
5.5.1 KARTIERTE MIKROSATELLITEN-MARKER.....	49
5.5.2 NICHT KARTIERTE MIKROSATELLITEN-MARKER	50
5.6 Vergleichende Genkartierung	51
5.7 Identifizierung und Isolierung eines genhaltigen PAC-Klons	53
5.7.1 DAS <i>COX7A1</i> GEN	53
5.7.2 DAS <i>CAPNS1</i> GEN.....	55
6 Diskussion.....	58 - 62
6.1 Erstellung des Contigs.....	58
6.2 Sequenz-Vergleich mit den Datenbank-Einträgen	58
6.2.1 WANN IST EIN TREFFER SIGNIFIKANT ?.....	59
6.3 Basenzusammensetzung	59
6.4 Diskussion der Methodik.....	59
6.5 RH-Karten.....	60
6.6 Muskelspezifische Merkmale des <i>COX7A1</i> Gens.....	61
6.7 Vergleichende Analyse	62
7 Literaturverzeichnis.....	63 - 73

8 Anhang	74 - 95
8.1 Acc. No., BLAST-Ergebnisse, Sequenzinformationen	74
8.2 Hinterlegte Sequenzen	85
8.3 Genreihenfolge	86
8.4 Verwendete Oligonucleotide	90
8.4.1 SEQUENZPRIMER FÜR BAC/PAC-ENDSEQUENZEN UND pGEM [®] -4Z-PLASMIDE	90
8.4.2 PCR-PRIMER FÜR DIE AMPLIFIKATION DER <i>COX7A1</i> UND <i>CAPNS1</i> EXONS	90
8.4.3 VOLLSTÄNDIGE PRIMERLISTE	91
8.5 Contig-Karte.....	95

Dankeschön an...

... Herrn Prof. Dr. Tosso Leeb, der die Anregung zu dieser Arbeit gab, mich in seine Arbeitsgruppe aufnahm und mir jederzeit hilfreiche und stets zielorientierte Betreuung gewährte.

...Herrn Prof. Dr. Hans-Jörg Jacobsen für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit im Fachbereich Biologie der Universität Hannover.

... Heike Klippert-Hasberg für die unzähligen Sequenzreaktionen und die Hilfe bei Ungereimtheiten aller Art. Dankeschön !

... Herrn Neander. Einfach danke.

... Alex, Spötti, Marcel und Kathrin Löhring für die Aufmunterung und die Zeit außerhalb des Institutes.

... Jörn Wrede und Marco Fritzsche für die tatkräftige Unterstützung und Lösung der vielen „kleinen großen“ Computerprobleme.

... Flávia für die produktive Zusammenarbeit und die Hilfe bei der Zusammenstellung des Gesamtcontigs.

... alle anderen Mitstreiter aus der Tierzucht !

... meinen Bruder Torge und meine Eltern, ohne die die Durchführung dieses Vorhabens nicht gelungen wäre.

... Friederike ! Du gibst mir sehr viel Kraft und Antrieb !!!

Erklärungen

1)

Hiermit erkläre ich gemäß Verkündungsblatt der Universität Hannover vom 24.07.2002 nach §6, (1), b), daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Gemäß § 6, (1), c) erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

2)

Die vorliegende Dissertation ist im März 2000 im Rahmen eines Forschungsprojektes begonnen worden. Dieses Projekt ist im Laufe der Zeit so groß geworden, daß es zu einem Teamprojekt wurde und aufgeteilt wurde. In dem Gesamtprojekt wurde ein Contig zwischen den Genen *GPI* und *LIPE* erstellt. Flávia Martins-Wess hat ab Juni 2001 den Bereich *COX7A1* bis *LIPE* bearbeitet. Mein Beitrag bestand aus der Erstellung der Primärcontigs im Gesamtbereich bis Juni 2001 und der anschließenden Bearbeitung des Teilbereiches *GPI* bis *COX7A1*.

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Der porcine Karyotyp (G-Banden)	S.6
Abbildung 2: Vergleichende Kartierung: Syntänien zwischen SSC 6 und HSA 1, 16, 18, 19	S.13
Abbildung 3: Beispiel eines BLAST-Hits einer BES zum Humangenom	S.48
Abbildung 4: Vergleichende Kartierung von 65 Gen-assoziierten Markern	S.52
Abbildung 5: Gesamt-Contigkarte	S.95

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Links zu aktuellen Karten und Datenbanken	S.5
Tabelle 2: Homologiebeziehungen zwischen humanen und porcinen Genen	S.14
Tabelle 3: Statistische Auswertung der hinterlegten Sequenzen	S.45
Tabelle 4: Zusammenfassung der repetitiven Elemente der Klonrandsequenzen	S.46
Tabelle 5: Nicht genotypisierte Mikrosatelliten	S.50
Tabelle 6: Exon/Intron-Grenzen des porcinen <i>COX7A1</i> Gens	S.55
Tabelle 7: Exon/Intron-Grenzen des porcinen <i>CAPNS1</i> Gens	S.56
Tabelle 8: Nucleotid-Polymorphismen im porcinen <i>CAPNS1</i> Gen	S.57
Tabelle 9: BAC/PAC-Klone	S.76
Tabelle 10: Hinterlegte Sequenzen	S.85
Tabelle 11: Genreihenfolge	S.86
Tabelle 12: Sequenzprimer für BES und Plasmide	S.90
Tabelle 13: PCR-Primer für die Amplifikation der <i>COX7A1</i> -Exons	S.90
Tabelle 14: PCR-Primer für die Amplifikation der <i>CAPNS1</i> -Exons	S.91
Tabelle 15: Vollständige Primerliste	S.91

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Restriktionsenzyme:

Av	<i>AvaI</i>
Ac	<i>AccI</i>
B	<i>BamHI</i>
Bgl	<i>BglII</i>
E	<i>EcoRI</i>
EV	<i>EcoRV</i>
Hc	<i>HincII</i>
H	<i>HindIII</i>
Kp	<i>KpnI</i>
Ps	<i>PstI</i>
Sc	<i>SacI</i>
Sau	<i>Sau3A</i>
S	<i>SmaI</i>
X	<i>XbaI</i>

sonstige Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
Acc. No.	Accession Number
amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destilata
bp	Basenpaar
BAC	künstliches Bakterien-Chromosom (bacterial artificial chromosome)
BES	BAC-Klon Endsequenz (BAC end sequence)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Programm zum Sequenzabgleich mit einer Datenbank)
BSA	bovines Rinderserumalbumin
BTA	Rinderchromosom
chl	Chloramphenicol
Ci	Curie (Einheit der Aktivität einer radioaktiven Substanz: 1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Zerfälle pro Sekunde = 3,7 x 10 ¹⁰ Bequerel)
CIP	Kälberdarm-Phosphatase (calf intestinale phosphatase)
cM	centiMorgan
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP [dATP, dCTP, dGTP, dTTP]	Desoxyribonukleosidtriphosphat (A=Adenin, C=Cytosin, G=Guanin, T=Thymin)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	einzelne cDNA-Abschnitte (expressed sequence tag)
et al.	und Mitarbeiter (et altera)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	fluoresceine isothiocyanate
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GB	Giga-Basenpaar
HSA	humanes Chromosom
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IP ₃	Inositol- 1, 4, 5-triphosphat
IPS	Impulse pro Sekunde
kan	Kanamycin
kb	1000 Basenpaare (bp)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LINE	langes eingeschobenes Nucleotid-Element (long interspersed nucleotide element)
LOD-Score	Wahrscheinlichkeitsannahme zweier gekoppelter Genloci (logarithm of the odds)

LTR	lange endständige Sequenzwiederholungen (long terminal repeats)
M	molar
MARC	Meat Animal Research Center
Mb	1000 kb
μ	mikro
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	milliMolar
MMU	murines Chromosom
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nt	Nucleotid
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (open reading frame, ORF)
P	kurzer Arm des Chromosoms
PAC	von dem Phagen P1 abgeleitetes artifizielles Chromosom (p1-derived artificial chromosome)
PBS	Phosphat-gepufferte isotonische Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PRE	porcines repetitives Element (porcine repetitive element)
Q	langer Arm des Chromosoms
QTL	quantitativer Genort (quantitative trait loci)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SCF	Standard Chromatogramm Datei (standard chromatogram file)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfat)
SINE	kurzes eingeschobenes Nucleotid-Element (short interspersed nucleotide element)
SNP	Einzelbasen-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism)
snRNP	kleine Kern-Ribonucleopartikel (small nuclear ribonucleoprotein particle)
SOAc	Natriumacetat (sodium acetate)
SSC	Schweinechromosom (Sus scrofa Chromosom)
SSR	einfache Sequenz-Wiederholung (simple sequence repeat)
STR	kurze Tandem-Wiederholung (short tandem repeat)
STS	kurzer Abschnitt DNA mit bekannter Sequenz (sequence tagged site)
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Lösung
TE	Tris-EDTA-Lösung
tet	Tetracyclin
TIGR	The Institute for Genomic Research
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) Aminomethan
U	Einheit (unit)
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
VNTR	variable Anzahl von Tandem-Wiederholungen (variable number of tandem repeats)
v/v	Volumen zu Volumen
w/v	Gewicht zu Volumen
WGS	Sequenzierung per Schrotschußklonierung (whole genome shotgun), Klonierungsmethode, bei der man Zufallsfragmente eines großen DNA-Moleküls in einen Vektor einbaut, so daß eine große Zahl unterschiedlicher rekombinierter DNA-Moleküle entsteht.
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-Indol-β-D-Galaktopyranosid
Zoo-FISH	Chromosomen-Färbung zwischen verschiedenen Spezies

1 Einleitung

Als Genom einer Spezies bezeichnet man die Gesamtheit aller Nucleotide in der DNA aller Chromosomen. Um die chromosomale Lage von Loci festzustellen, bedient man sich der Kartierung. Die Reihenfolge der Nucleotid-Basenpaare ermittelt man mittels einer Sequenzierung. Die Analyse komplexer Genome durch Kartierung und Sequenzierung ist momentan ein großes Ziel der Molekulargenetik.

Es sind bereits eine Vielzahl von Genomen verschiedener Modellorganismen aufgeklärt. Die Zahl der aufgeklärten Genomen wächst fast täglich, so daß die genaue Anzahl aufgeklärter Genome hier nicht genannt werden kann. Zur Zeit sind unter anderem über 186 Spezies von Eubakterien und mehr als 19 Spezies von Archaeobakterien vollständig sequenziert. Zudem sind die Genome von circa 1.674 Virusarten, 14 Pilzen, 8 Pflanzen, und 9 Insektenarten in ihrer Rohfassung aufgeklärt. Die Kenntnis der Genome der Haustiere hat in der letzten Zeit enorme Fortschritte gemacht. So findet zur Zeit die systematische Sequenzierung der Nutztiergenome von Huhn, Hund und Rind statt.

Schon seit längerem haben vermehrt molekulargenetische Verfahren Einzug in die klassische Tierzucht erhalten, wie z.B. der 1991 im Bereich der Schweineproduktion eingeführte molekulargenetische Test zum Nachweis der malignen Hyperthermie (MHS). Der aufwendige Halothan-Test braucht damit zum Nachweis des porcinen Stress-Syndroms nicht mehr angewendet werden. Es wird daran gearbeitet, für Erbkrankheiten der Haustiere neue und weiterführende genetische Nachweisverfahren zu entwickeln sowie die genetische Grundlage wesentlicher Leistungsmerkmale aufzudecken.

Die genaue Kenntnis der Genome bzw. spezifischer Abschnitte sind Voraussetzungen für vergleichende Analysen der Genome höher entwickelter Eukaryonten.

Lage und Anzahl der Gene im Genom des Schweines können zumindest teilweise durch den Vergleich mit dem menschlichen Genom ermittelt werden. Die vorliegende Arbeit soll durch die Analyse eines BAC/PAC-Contigs in einer ausgewählten Region auf dem Schweinechromosom 6 einen Beitrag zur Aufklärung der Positionen, der Reihenfolge und der Abstände verschiedener Loci zueinander liefern. In dieser Region sind unter anderem die Gene für den porcinen Ryanodin Rezeptor-1 (*RYR1*) sowie für die muskelspezifische Polypeptid-Untereinheit VIIa der Cytochrom C Oxidase (*COX7A1*) lokalisiert.

Die Ziele dieser Arbeit waren es, einen Beitrag zur Aufklärung des Schweinegenoms zu liefern. Mittels einer detaillierten Analyse eines BAC/PAC-Contigs in dieser Region sollte die Organisation ausgewählter Gene aufgeklärt werden. Die Informationen wurden für die Erstellung physikalischer Karten verwendet, um eine vollständige DNA-Sequenzierung sowie eine speziesübergreifende Analyse verschiedener Organismen zu ermöglichen. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die exemplarische Sequenzierung und Charakterisierung zweier ausgewählter Gene des Contigs.

2 Literaturübersicht

2.1 Genomanalyse

2.1.1 Genkartierung

Die Genkartierung ermöglicht die Zuordnung von Genorten zu Chromosomen. Außerdem kann die Anordnung der Genorte einschließlich ihrer Abstände auf den einzelnen Chromosomen ermittelt werden. Diese Untersuchungsergebnisse werden in den Genkarten zusammengefasst. Es werden grundsätzlich zwei Arten der Genkartierung unterschieden, die genetische sowie die physikalische Genkartierung.

2.1.1.1 GENETISCHE GENKARTIERUNG

Eine genetische Genkarte wird auch als Kopplungskarte bezeichnet. Sie beruht auf den in einem informativen Familienmaterial beobachteten Rekombinationshäufigkeiten. Mit Hilfe von Kartierungsfunktionen werden die relativen Abstände von Genloci in einheitliche Abstände transformiert. Crossing-Over-Ereignisse in der Meiose erzeugen Rekombinationen. Je größer der Abstand zweier Genorte auf einem Chromosom ist, umso häufiger kann es zu einem Crossing-Over und damit zu einer Rekombination kommen. Crossing-Over-Ereignisse zeigen keine Gleichmäßigkeit oder Regelmäßigkeit. So können an einigen Lokalisationen gehäuft, an anderen wiederum seltener Rekombinationen beobachtet werden. Die Rekombinationshäufigkeit ist beim weiblichen Geschlecht generell höher als beim männlichen Geschlecht. Daher erfolgt die Darstellung genetischer Karten entweder als Mittelwert beider Geschlechter („sex averaged“) oder geschlechtsspezifisch. Auf einem Chromosom lokalisierte Genorte können zu einer Kopplungsgruppe zusammengefasst werden. Die Maßeinheit der genetischen Kartierung ist das centiMorgan (cM), wobei 1 cM einer 1 %igen Rekombinationshäufigkeit entspricht.

Bei vielen Säugetieren entspricht 1 cM etwa 1×10^6 bp, wobei dies allerdings nur als grobe Näherung gilt und das cM/bp-Verhältnis innerhalb des Genoms nicht konstant ist.

2.1.1.2 PHYSIKALISCHE GENKARTIERUNG

Bei der physikalischen Genkartierung werden Genorte entweder direkt am Chromosom oder an Chromosomenabschnitten nachgewiesen. Die physikalische Genkarte liefert Informationen über die realen Abstände zwischen den Genorten. Je nach Kartierungsmethode kann mittels dieser Technik ein Genort einer DNA-Sequenz, einem Chromosomenabschnitt oder einem Chromosom zugeordnet werden.

2.1.1.3 SOMATISCHE ZELLHYBRID-PANELS

Die physikalische Kartierung an somatischen Zellhybriden erfolgt durch die Fusion von Nagetierzelllinien (zumeist Hamster und/oder Maus) mit Zelllinien von Nichtnagetier-Spezies. Während der Fusion und der folgenden Zellpassagen gehen Chromosomen zufällig verloren, wobei es sich meistens um Chromosomen der Nicht-Nager-Spezies handelt. So ist jeweils nur noch ein Bruchteil des Genoms der Nicht-Nager-Spezies, oft in Form eines Chromosoms, vorhanden. Werden verschiedene Genorte in einer Zelllinie nachgewiesen, sind sie mit großer Wahrscheinlichkeit auf dem gleichen Chromosomenabschnitt lokalisiert (Strachan und Read, 1996). Heute findet die Kartierung an somatischen Zellhybrid-Panels nur noch selten Anwendung, da Informationen über Chromosomensegmente und die Reihenfolge von Genen kaum gewonnen werden können. Allerdings ist eine schnelle und sichere Zuordnung von Genen zu Chromosomen möglich, weshalb diese Form der Kartierung bei wenig erforschten Spezies Anwendung findet.

2.1.1.4 RADIATION-HYBRID-PANELS (RH-PANELS)

Eine Weiterentwicklung des somatischen Zellhybrid-Panels stellen die Radiation-Hybrid-Panels dar. Diese Panels können durch Bestrahlung mit Röntgen- oder Gamma-Strahlen erstellt werden. Bei dieser Methode übernehmen letal bestrahlte Nichtnagerzellen die Rolle der Donorzellen, die mit Nagerzellen fusioniert werden. Über ein Selektionssystem wird Sorge getragen, daß von den neu entstandenen Hybridzellen nur diejenigen überleben, die Fragmente der Donorspezies enthalten. Es ist notwendig, daß das Chromosomensegment der Donorzelle in die Chromosomen der Nagetierzelle eingebaut wird, um eine stabile Weitergabe dieser Segmente zu gewährleisten (Strachan und Read, 1996). Die Häufigkeit der gekoppelten Loci ist auch hier bezüglich der physikalischen Anordnung aussagekräftig. Das Auflösungsvermögen des RH-Panels hängt dabei von der Intensität und von der Art der Strahlung ab (Walter, 1994). Somit ist eine Zuordnung sowohl zu Chromosomen als auch zu kleineren Chromosomenfragmenten möglich (Cox *et al.*, 1990). RH-Panels besitzen mit circa 5×10^5 bp ein sehr hohes Auflösungsvermögen, welches um das 15 bis 20 fache höher ist als bei der genetischen Kartierung. Es ist zudem kein Familienmaterial notwendig, und es können monomorphe Genorte lokalisiert werden.

2.1.1.5 FLUORESCENZ *IN SITU* HYBRIDISIERUNG (FISH) SPEZIFISCHER DNA-SEQUENZEN

Das Verfahren der *in situ* Hybridisierung beruht auf der Bildung von Basenpaaren hochgradig komplementärer DNA-Sequenzen oder RNA-Sequenzen zu einem Doppelstrangmolekül. Eine direkte Zuweisung dieser Sequenzen an morphologisch differenzierbare Strukturen wie Chromosomen, Zellen oder Zellkernen ist somit möglich. Man unterscheidet die radioaktive *in situ* Hybridisierung von der nichtradioaktiven *in situ*

Hybridisierung, je nach Markierung der als Sonde eingesetzten DNA. Bei der ersten Methode wird die Sonden-DNA über radioaktive Isotope (z.B. ^{125}I , ^{35}S , ^{32}P oder ^3H) markiert, während beim letzteren Verfahren der Nachweis über Fluoreszenzfarbstoffe (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung = FISH) erfolgt.

Die nichtradioaktive *in situ* Hybridisierung kann wiederum in eine direkte und in eine indirekte Methode unterteilt werden. Nucleotide werden bei dem direkten Verfahren direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FITC oder Rhodamin) markiert. So kann die Sonden-DNA nach der Hybridisierung sofort mikroskopisch nachgewiesen werden. Bei der indirekten Methode binden Antikörper an Reportermoleküle, die in die DNA eingebaut werden. Als Reportermoleküle können zum Beispiel Digoxigenin oder Biotin dienen. Nach der Hybridisierung kann über den Einsatz von Enzymen (z.B. Peroxidase, alkalische Phosphatase) oder über an Antikörper gebundene Fluorochrome eine Detektion vorgenommen werden.

Heutzutage hat die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen eine eben so hohe Sensitivität wie die radioaktive Markierung erreicht (Lemieux *et al.*, 1992; Schriml, 1999). Zudem bietet ein hoher technischer Standard die Möglichkeit der digitalen Bildverarbeitung, so daß Bilder nachbearbeitet und Signale verstärkt werden können. Maßgebliche Vorteile der Hybridisierung mit Fluoreszenzfarbstoffen sind die schnelle Durchführbarkeit, die lange Stabilität der Sonden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ (Arnold *et al.*, 1992) und die Möglichkeit zur Mehrfachmarkierung mit Hilfe mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe bzw. unterschiedlicher Antikörper (Ried *et al.*, 1993; Karhu *et al.*, 2001).

2.1.2 Vergleichende Genomkartierung

Die vergleichende Genomkartierung („comparative mapping“) beruht auf einer Konservierung von Genen oder ganzen Chromosomensegmenten zwischen verschiedenen Wirbeltierspezies. Durch das Aufweisen von Homologiebeziehungen kann aus dem Wissen über eine gut untersuchte Spezies Nutzen für eine weniger gut untersuchte Spezies gezogen werden. Laut dem „Comittee on Comparative Gene Mapping“ (O'Brien und Graves, 1991) gelten Sequenzen zweier Spezies als homolog, wenn sie eine sehr hohe Ähnlichkeit in ihrer molekularen Struktur (> 80 % Ähnlichkeit in der Basenfolge) aufweisen oder die Genprodukte gleiche biologische oder biochemische Funktionen im Organismus besitzen.

Es ist zwar im Laufe der Evolution zu Neuordnungen von Segmenten im Genom der verschiedenen Spezies gekommen, woraus unter anderem die unterschiedliche Chromosomenanzahl resultiert, aber zu einem bestimmten Prozentsatz ist die Abfolge von Genen erhalten geblieben.

Eine besondere Form der vergleichenden Genomkartierung, die sich der *in situ* Hybridisierung mit Fluoreszenzfarbstoffen bedient, ermöglicht die Zoo-FISH, mit deren

Hilfe Chromosomenrearrangements detektiert werden können. Das Prinzip der Zoo-FISH basiert auf der heterologen Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung chromosomenspezifischer DNA-Bibliotheken des Menschen oder einer anderen Spezies auf das Genom einer weiteren zu untersuchenden Spezies. Damit wird die Identifikation homologer evolutionär konservierter Chromosomenbereiche ermöglicht. Eine bidirektionale heterologe Hybridisierung im Zoo-FISH bei zwei zu vergleichenden Tierarten liefert noch genauere Einblicke in evolutive Entwicklungen (Breen *et al.*, 1999; Wienberg *et al.*, 1997).

Die jüngsten Fortschritte bei der Genomkartierung und Sequenzierung komplexer Genome in den verschiedensten Projekten weltweit haben zur Entwicklung von repräsentativen Genomkarten für viele Spezies geführt.

Bereits im Oktober 2004 sind eine Vielzahl von Genomen verschiedener Modellorganismen aufgeklärt. Neben den eingangs erwähnten Spezies sind die Genome der Säugetierspezies Mensch, Maus, Ratte, Schimpanse und Hund in ihrer Rohfassung aufgeklärt. Die Aufklärung des Rindergenoms macht schnelle Fortschritte, während die systematische Sequenzierung des Schweinegenoms in Kürze beginnen wird.

Der syntänische Vergleich von Genomkarten verwandter Spezies bietet die Möglichkeit, Informationen über Kopplungsgruppen von gut kartierten Spezies (z.B. Mensch) auf weniger gut kartierte Spezies (z.B. Schwein) zu übertragen, um somit Gene identifizieren und lokalisieren zu können. Syntänie bezeichnet die konservierte Anordnung von Genen in verwandten Organismen (z.B. Säugetier) über große chromosomale Abschnitte.

Der Zuwachs und die Verfügbarkeit neuer Informationen verläuft derart rasant, daß täglich Aktualisierungen bestehender Genkarten der verschiedenen Spezies stattfinden. Viele Labore und Arbeitsgruppen stellen die Daten und Informationen in die Datenbanken des World Wide Web, so daß Informationen zum aktuellen Stand diesen Karten entnommen werden können.

Tab. 1: Links zu aktuellen Karten und Datenbanken

Cytogenetische Karten:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi>

<http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>

<http://ws4.niai.affrc.go.jp/dbsearch2/mmap/homap.html>

Vergleichende Genkarten:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/compare.html>

Genomdatenbanken:

1. NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
 2. ENSEMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>)
 3. UCSC (<http://genome.ucsc.edu>)
 4. TIGR (<http://www.tigr.org/>)
 5. <http://www.rzpd.de>
 6. <http://www.thearkdb.org>
-

2.1.3 Genomanalyse beim Schwein

2.1.3.1 DER PORCINE KARYOTYP

Der porcine Karyotyp besteht aus 19 Chromosomen ($2n = 38$, inklusive metazentrischer und akrozentrischer Chromosomen; 18 Autosomen = haploider Chromosomensatz sowie 2 Geschlechtschromosomen). Das Schweine-Genom umfaßt circa 2.7×10^9 bp (Schmitz *et al.*, 1992), und weist eine ungefähre Genomlänge von 2.300 cM auf. Die Größe des Schweinegenoms entspricht ungefähr der des Menschen und wird auf 2.7 Gb geschätzt. Um eine einheitliche Größe zu definieren, wurde die 2.286 cM große Kopplungskarte von Rohrer *et al.* (1996a) mit der 1.837 cM großen Karte des „PiGMap consortium“ (Archibald *et al.*, 1995) vereint (Robic *et al.*, 1999; Rohrer *et al.*, 1996).

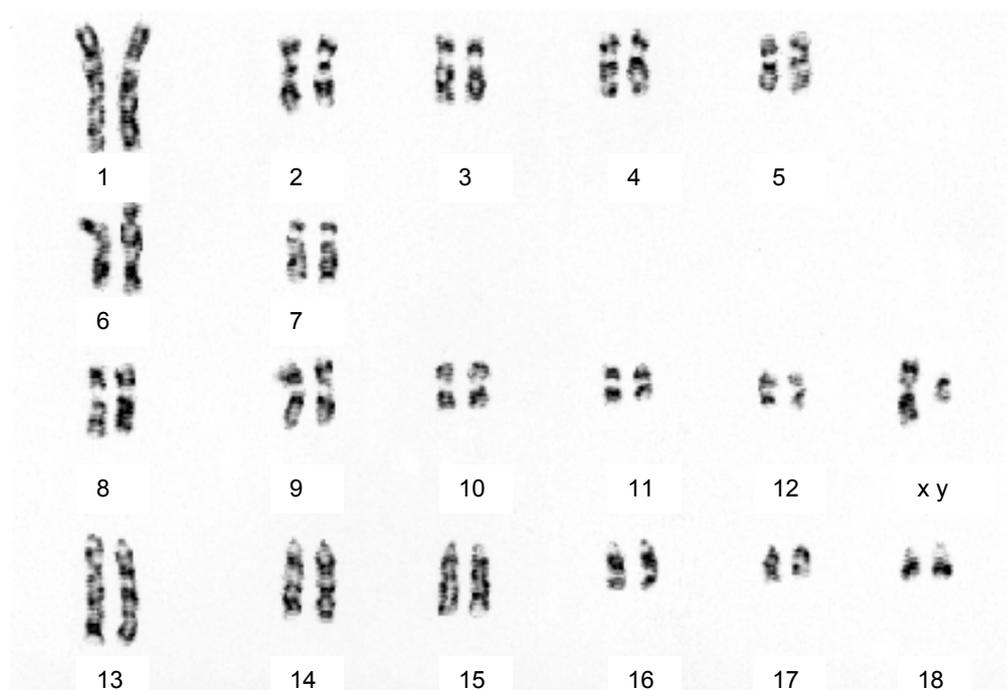


Abb. 1: Der porcine Karyotyp (G-Banden)

Ordnung der Chromosomen nach ihrer Größe, der Lage des Centromers und dem Bandenmuster. Die geordnete Darstellung der Chromosomen bezeichnet man als Karyotyp.

2.1.3.2 GENOMKARTIERUNG BEIM SCHWEIN

Das „PiGMaP consortium“ wurde mit Beteiligung von INRA, UIUC, USDA-ARS MARC, Roslin Institute, BBSRC und Sanger gegründet, um das Genom beim Schwein systematisch zu analysieren. Mit physikalischen Kartierungsmethoden wie der Somatischen Zellhybrid-Analyse, der *in situ* Hybridisierung und der Zoo-FISH ist es gelungen, eine vergleichende physikalische Karte mit über 2.390 kartierten Loci zu erstellen. Die aktuellen Kopplungskarten enthalten derzeit mehr als 2.900 Loci, die ungefähr 1.700 Mikrosatelliten und 1.200 SNPs/RFLPs einschließen (<http://www.marc.usda.gov/>).

Weiterhin wurden genetische Marker identifiziert, die sich gleichmäßig über das Schweinegenom verteilen. Anhand dieser Marker wurde sowohl eine genetische als auch eine physikalische Karte erstellt.

Die genetischen Marker werden den einzelnen Chromosomen zugeordnet, um Verteilung und Lage festzustellen. Dies erfolgt durch *in situ* Hybridisierung (Fischer *et al.*, 1997; Viggiano *et al.*, 1997) und mit Hilfe somatischer Zellhybridlinien (Leach *et al.*, 1996). Zur Zeit existieren mindestens zwei somatische Zellhybrid-Panels (Rettenberger *et al.*, 1994) sowie zwei Bestrahlungszellhybrid-Panels (Radiation hybrid cell panel) (Hawken *et al.*, 1999; Milan *et al.*, 2000; Yerle *et al.*, 2003). Eine daraus resultierende Genkarte wird als physikalische Karte bezeichnet.

Heute stehen drei porcine RH-Karten zur Verfügung: die IMpRH-Karte (7.000 rad), die IMNpRH2-Karte (12.000 rad) sowie die Goodfellow T43-Karte (3.000 rad) (<http://compngen.rutgers.edu/rhmap/>). Auf dem 7.000 rad IMpRH-Panel wurden inzwischen so viele Marker typisiert, daß eine Gesamt-Genomkarte des Schweins erstellt werden konnte (Yerle *et al.*, 1998, 2003). Die Verfügbarkeit des 12.000 rad IMNpRH2-Panels erlaubt die noch detailliertere Kartierung ausgewählter Chromosomenabschnitte. Große Anstrengungen sind unternommen worden, um Mikrosatelliten und genomische Sequenzen auf der porcinen RH-Karte zu vereinen (Hawken *et al.*, 1999; Kiuchi *et al.*, 2002). Mehr als 4.500 Marker, ESTs und Gene sind auf der IMpRH-Karte zusammengefaßt, woraus eine Karte der zweiten Generation resultierte (Milan *et al.*, 2002). Hamasima *et al.* (2003) berichten über die Zusammenstellung einer gesamt-genomischen Rahmenkarte, die 589 Mikrosatelliten auf einem 5.000 rad RH-Panel erfaßt.

2.1.3.3 VERGLEICHENDE ANALYSE

Eine vergleichende Analyse von noch wenig genetisch charakterisierten Spezies kann nur vorgenommen werden, wenn detaillierte Gen-Karten von nah verwandten Spezies vorliegen (z.B. Mensch-Schwein). Die vergleichende Gen-Kartierung ist ein wichtiges Werkzeug für die Extrapolation von Informationen über Genome verschiedener Spezies und zeigt Bereiche konservierter Syntänie zwischen ihnen auf. Konservierte Syntänie

beschreibt das Phänomen einer gleichen Anordnung der Gene zweier unterschiedlicher Spezies und kann zum Beispiel über eine bidirektionale Chromosomen-Färbung bestimmt werden.

Die bidirektionale Chromosomen-Färbung, auch bekannt als Zoo-FISH, hat viel zu dem Verständnis über die Verwandtschaft von Genomen unterschiedlicher Spezies beigetragen.

Das Schwein war das erste Nutztier, das für vergleichende Chromosomenfärbungen mit humanen Proben benutzt wurde (Rettenberger *et al.*, 1995; Chowdhary *et al.*, 2001). Fröncke und Mitarbeiter (1996) berichtet über die Identifizierung von 47 Segmenten auf Metaphase-Chromosomen, die homolog zu humanen Segmenten sind. Diese Untersuchung zeigte, daß das Schweine-Chromosom 6 Homologien zu den humanen Chromosomen 1, 18 und 19 zeigt. Der q-Arm des HSA 19 zeigt eine Färbung mit dem SSC 6cen-q21 (Chaudhary *et al.*, 1998).

Auch die Konstruktion von vergleichenden Karten zwischen Menschen, Schweinen, Schafen und Rindern wurde beschrieben (Fröncke *et al.*, 2001). Sowohl die porcine Genomkarte als auch die vergleichenden Karten zwischen Schweinen, Ziegen und Menschen sind verbessert worden, als 113 ursprünglich auf Ziegen BAC-Klonen entdeckte Gene durch die Zoo-FISH Methode zu den porcinen Chromosomen zugehörig getestet wurden (Pinton *et al.*, 2000).

Jeon und Mitarbeiter (2001) berichten über eine vergleichende Analyse zwischen einem porcinen Contig in der Region des *RN*-Gens und humanen RH-Daten. Außer einer kleineren Diskrepanz in der Anordnung von zwei Genen weicht die Reihenfolge der Gene nicht von den humanen RH-Daten ab. Van Poucke und Mitarbeiter (2001) beschreiben die Syntanie zwischen dem humanen Chromosom 3 und dem porcinen Chromosom 13cen-q46. Die Studie zeigte, daß in dieser Region die Reihenfolge der Gene nicht komplett übereinstimmte. Die Lokalisation von 18 Loci auf der cytogenetischen Karte auf dem porcinen Chromosom 13 bestätigt, daß intrachromosomale Rearrangements stattgefunden haben. Allerdings scheint die Reihenfolge der Gene in den Hauptblöcken konserviert zu sein.

In einer weiteren Studie geht es um die Syntanie zwischen dem Schweine- und dem Human-Genom auf der RH-Karte. Shi und Mitarbeiter (2001) zeigten, daß die Gen-Reihenfolge zwischen dem porcinen Chromosom 12 und dem humanen Chromosom 17 übereinzustimmen scheint, jedoch war die Orientierung der Chromosomen invertiert.

Die Homologie zwischen dem porcinen Chromosom 2 (SSC 2) und dem humanen Chromosom 11 (HSA 11) ist untersucht worden (Rattink *et al.*, 2001). Es wurden zwei konservierte Segmente mit identischer Gen-Reihenfolge zwischen HSA 11pter-q13 und SSC 2 gefunden. Dieses Ergebnis beruht darauf, daß 20 Gene sowohl auf der porcinen RH-Karte als auch auf der humanen RH-Karte kartiert wurden. Zusätzlich wurden einzelne BAC-Klone aus dieser Region sequenziert, deren Sequenz homolog zu dem humanen Chromosom 11 war.

Robic und Mitarbeiter (2001) stellen eine Studie vor, die das humane und das porcine Genom nicht nur durch RH-Daten vergleicht, sondern auch durch die Konstruktion eines Contigs. Zehn Gene konnten auf dem 2.4 Mb langen BAC Contig identifiziert werden. Die Reihenfolge der Gene war bei beiden Spezies gleich.

In einer Studie wird die konservierte Syntanie zwischen dem porcinen und dem humanen Genom in der Region der Haupthistokompatibilitätskomplex-Gene (MHC) beschrieben (Genet *et al.*, 2001). Die gut charakterisierte Region der Schweine Leukozyten Antigene (SLA) auf dem porcinen Chromosom 7 wurde mit der IMpRH-Karte kartiert, wodurch diese verbessert wurde. Insgesamt wurden 23 neue Marker auf der IMpRH-Karte typisiert (Genet *et al.*, 2001).

Eine Gesamtgenom RH-Karte wurde konstruiert, um die vergleichende Karte zwischen porcinem und humanem Genom zu vervollständigen und zu verfeinern. Dadurch konnten Bruchpunkte in der Syntanie und Rearrangements identifiziert werden und gleichzeitig die Auflösung verbessert werden. Es wurden 1.058 EST Marker auf der IMpRH-Karte getestet (Goureau *et al.*, 1996; Rink *et al.*, 2002).

Detaillierte vergleichende Analysen sind auch vorgenommen worden zwischen den Genomen von Mensch/Maus, Mensch/Ratte sowie folgenden Säugetieren oder Vertebraten:

Eine auf PAC-Klonen basierende physikalische Karte einer circa 1.5 Mb großen Region des Ratten-Chromosoms 4, welches das *CFTR* Gen beherbergt, ist durch die bidirektionale Overgo-Methode konstruiert worden (Summers *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, daß die meisten Gene/EST-Sequenzen zwischen Maus und Ratte so ähnlich waren, daß sie als Overgo-Proben für eine hybridisierungsgestützte Durchmusterung einer Ratten PAC-Genbank genutzt werden konnten. Im Vergleich zu den Genomen von Mensch und Maus, ist die Reihenfolge der Gene und der Gehalt der *CFTR* Region bei der Ratte gut konserviert (Summers *et al.*, 2001; Ellsworth *et al.*, 2000).

Ein 2 Mb großer PAC-Contig der Ratte in der dem humanen Chromosom 7q21 homologen Region, welche das *CDK6* Gene enthält (Summers *et al.*, 2001), deckte Unterschiede in der Reihenfolge der Gene zwischen beiden Spezies auf. Diese Region ist von besonderem Interesse hinsichtlich der Anwesenheit eines evolutionären Bruchpunktes zwischen den korrespondierenden genomischen Regionen von Mensch und Maus (Thomas *et al.*, 1999).

Fahrenkrug und Mitarbeiter (2000) berichten über die Konstruktion einer RH-Karte in der Region um das ovine *CLPG* Gen auf Chromosom 18. Es wurde eine bovine RH-Karte benutzt, da ein hoher Konservierungsgehalt sowohl in der Sequenz als auch in der Reihenfolge der Marker vorhanden war (Cockett *et al.*, 1994). Diese Studie konnte die komplette Homologie und Syntanie in der von den Genen *BDKRB2* und *AKT* begrenzten Region zwischen den Genomen von Mensch, Schaf und Rind aufdecken. Die *CLPG* Genregion ist auch physikalisch mit einer ovinen BAC-Bank kartiert. Zu diesem Zweck

sind bovine STSs für die PCR gestützte Durchmusterung der ovinen BAC-Bank benutzt worden (Segers *et al.*, 2000).

Die Studie von Puttagunta und Mitarbeitern (2000) zeigt die konservierte Reihenfolge der Gene zwischen dem humanen Chromosom 19p13.3 und dem murinen Chromosom 10, allerdings ist ein 1.2 Mb großer Inversionsbereich gefunden worden, der von der konservierten Kopplungsgruppe umgeben wird. Die Reihenfolge der Gene im Inversionsbereich scheint zwischen den Spezies identisch zu sein.

Smith und Mitarbeiter (2002) zeigten Syntänie zwischen dem humanen Chromosom 19 und 5 Mikro-Chromosomen des Huhnes. Sie benutzten eine Kombination aus einer PCR-gestützten Durchmusterung von BAC- und Cosmid-Banken vom Huhn, Sequenzierung, genetische Kartierung und FISH-Experimente. Die Autoren beobachteten syntänische Bereiche zwischen Teilen des humanen Chromosoms 19 und dem Chromosom E25 des Huhns, allerdings ist die Reihenfolge der Gene zwischen den Genen *CAPN4* bis *TGFB1* invertiert.

2.1.4 Genetische Marker

Im Eukaryontengenom liegen Gene oft weit voneinander entfernt, getrennt durch genfreie DNA.

Man unterscheidet Typ 1 Marker, zu denen Gene sowie codierende Sequenzen gehören. Sie sind zwischen verschiedenen Spezies evolutionär konservierte Bereiche des Genoms. Ihr Gehalt an repetitiven Sequenzen im codierenden Bereich ist gering, außerdem sind sie oft nur monomorph und für die physikalische Kartierung geeignet.

Typ 2 Marker sind polymorphe DNA-Sequenzen. Die am häufigsten verwendeten Typ 2 Marker sind die Mikrosatelliten, die auch als short tandem repeats (STR) oder simple sequence repeats (SSR) bezeichnet werden. Mikrosatelliten sind häufig sehr polymorph, d.h. es kommt eine Vielzahl von Allelen mit relativ gleichmäßiger Verteilung in der Population vor. Sie sind nur selten zwischen den Spezies konserviert. Marker mit diesen Eigenschaften sind besonders wertvoll für genetische Kopplungsanalysen, da sie einen hohen Informationsgehalt zeigen. Darüberhinaus lassen sich Mikrosatelliten-Marker mit Hilfe der PCR relativ einfach analysieren. Weitere Beispiele für polymorphe Sequenzen, die als Typ 2 Marker eingesetzt werden, sind unter anderem SNPs (single nucleotide polymorphism) oder RFLPs (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen).

2.1.5 Repetitive DNA in Säugergenomen

Bei den Retroposons und Transposons werden Short Interspersed Nucleotide Elements (SINEs) und Long Interspersed Nucleotide Elements (LINEs) unterschieden.

2.1.5.1 SINE-ELEMENTE (SINEs)

Short interspersed nuclear elements (SINEs) sind Abschnitte von 250-300 Basenpaaren, wobei mehrere Familien von SINE-Abschnitten bekannt sind (Brenig, 1999). Insgesamt bestehen bis zu 20 % eines Säugetier-Genoms aus SINE-Sequenzen. Es besteht die Annahme, daß es sich um Abkömmlinge von zellulären Polymerase III-Transkripten wie z.B. tRNAs handelt (Coltmann *et al.*, 1994). Bei Säugetieren ist die *Alu*-Familie des Menschen am besten untersucht (Deininger *et al.*, 1981; Fuhrmann *et al.*, 1981; Jurka und Smith, 1988; Nelson *et al.*, 1989). Ihre Mitglieder bestehen aus etwa 300 Basenpaaren mit sehr ähnlichen, aber nicht identischen Sequenzen. Die hochrepetitiven *Alu* I-Elemente im Humangenom sowie die vergleichbaren PRE-Elemente im Schweinegenom sowie die B1- und B2-Elemente im Nagetier-Genom (Hastie, 1989; Zietkiewicz und Labuda, 1996) enthalten interne Kontrollregionen, an die RNA-Polymerase III-spezifische Transkriptionsfaktoren binden können. Daher können diese repetitiven Elemente von der Polymerase III transkribiert werden. Man vermutet, daß solche Transkripte gelegentlich durch reverse Transkription in DNA überführt werden, und sich auf diese Weise im Genom verbreiten. Pro haploidem Genom beträgt die Kopienzahl der *Alu*-Sequenzen beinahe eine Million. Sie können Gene flankieren, in Introns oder innerhalb von Satelliten-DNA und in Clustern mit anderen eingestreuten repetitiven Sequenzen vorliegen. Der durchschnittliche Abstand beträgt 3 kb, jedoch gibt es Bereiche, in denen sie bevorzugt oder überhaupt nicht vorkommen (Moyzis *et al.*, 1989). So sind SINE-Sequenzen vornehmlich in GC-reichen Regionen, sehr oft im 3'-untranslatierten Bereich von Genen vorhanden.

2.1.5.2 LINE-ELEMENTE (LINEs)

Der Prototyp einer LINE-Sequenz besteht aus etwa 7000 Basenpaaren. Die Sequenz schließt einen offenen Leserahmen ein, der die Information für eine reverse Transkriptase trägt, die Ähnlichkeit zu dem retroviralen Enzym hat. Jedoch entsprechen nur wenige der vielen zehntausend LINE-Sequenzen im menschlichen Genom der vollen Länge des Prototyps (Knippers *et al.*, 1997). Die meisten sind um verschieden lange Abschnitte im 5'-Bereich verkürzt, aber alle tragen ein Poly(A)-Ende. Alle LINEs sind von kurzen direkten Sequenzwiederholungen eingerahmt. Alle Kennzeichen sprechen dafür, daß die meisten LINEs Produkte einer unvollständigen reversen Transkription von RNAs sind, die ins Genom integriert wurden (Smit *et al.*, 1999). In Säugetierzellen findet man tatsächlich Transkripte von LINEs, auch extrachromosomale LINE-DNA, die womöglich zukünftig integriert wird. Allerdings ist die Frage der Herkunft der ursprünglichen LINE-Sequenz und ihre mögliche genetische Funktion noch nicht abschließend beantwortet. LINE-Sequenzen haben sich früh in der Evolution im Genom von Säugetieren eingerichtet. Ihre Position ist im Genom relativ fixiert, allerdings

beobachtet man gelegentlich Mutationen, die durch Transposition von LINE-Sequenzen in aktive Gene entstanden sind.

LINEs sind Retrotransposons, die mit circa 50.000 Kopien im Genom vertreten sind. Charakteristisch für diese verstreut liegenden repetitiven Sequenzen sind zwei offene Leseraster (open reading frame, ORF) auf einem Strang, von denen eines eine Reverse Transkriptase codiert.

2.1.5.3 EINFACHE SEQUENZWIEDERHOLUNGEN

Bei einfachen Sequenzwiederholungen unterscheidet man Mikrosatelliten, Minisatelliten und Satelliten.

Bei Mikrosatelliten (STR) wie z.B. (CA)₂₄, (GAA)₁₂, oder (CAA)₁₉, handelt es sich um DNA mit sich wiederholenden Sequenz-Motiven von 2-7 Nucleotiden. Sie kommen im ganzen Genom vor und sind für die Abstammungskontrolle und genetische Kontrolle von Bedeutung.

Minisatelliten haben Wiederholungseinheiten von 20-100 bp, kommen im ganzen Genom vor und sind für die Abstammungskontrolle über Fingerprint von Bedeutung.

Echte Satelliten haben Wiederholungseinheiten von > 100 bp und kommen nur im Bereich der Centromere vor.

2.1.6 Aktueller Stand der Genomanalyse beim Schwein

Es existiert eine physikalische Karte des porcinen Genoms, die unter Mitarbeit vier internationaler Laboratorien (The Sanger Institute, Roslin Institute, University of Illinois, INRA) erstellt worden ist. Durch Fingerprint-Analysen und die Randsequenzierung von BACs konnte eine integrierte physikalische Karte des gesamten Schweinegenoms erstellt werden (Marra *et al.*, 1997).

Diese bakterielle physikalische Klonkarte wurde mittels Restriktionsenzym-Fingerprint erstellt. Zur Zeit sind 267.820 Fingerprints in 8.416 Contigs assembliert. Diese streng automatisiert assemblierten Daten wurden in Form von Sets überlappender Klone als Contigs dargestellt. Endziel ist es, zusammen mit allen verfügbaren Daten eine Chromosomenaufklärung durch Fingerprint und RH-Kartierung zu erreichen. Eine solche Karte könnte als Vorlage für die Selektion von Klonen aus dem tiling path dienen. Damit wäre die Voraussetzung für das Sequenzieren und weitere funktionelle Anwendungen wie z.B. genomische BAC-Mikroarrays geschaffen.

Das europäische Pendant zur Aufklärung des Schweinegenoms ist die GENETPIG Datenbank (Karsenty *et al.*, 2003). Ihr erklärtes Ziel ist neben der Genomaufklärung die Identifikation von Genen, die ökonomisch nutzbare Eigenschaften des Schweines kontrollieren. Sie enthält Informationen von circa 747 ESTs, von denen 632 auf dem

Schweinegenom bereits kartiert sind. Derzeit sind mehr als 4.081 Loci identifiziert, von denen 1.588 Gene sind.

2.1.6.1 SYNTÄNIEN

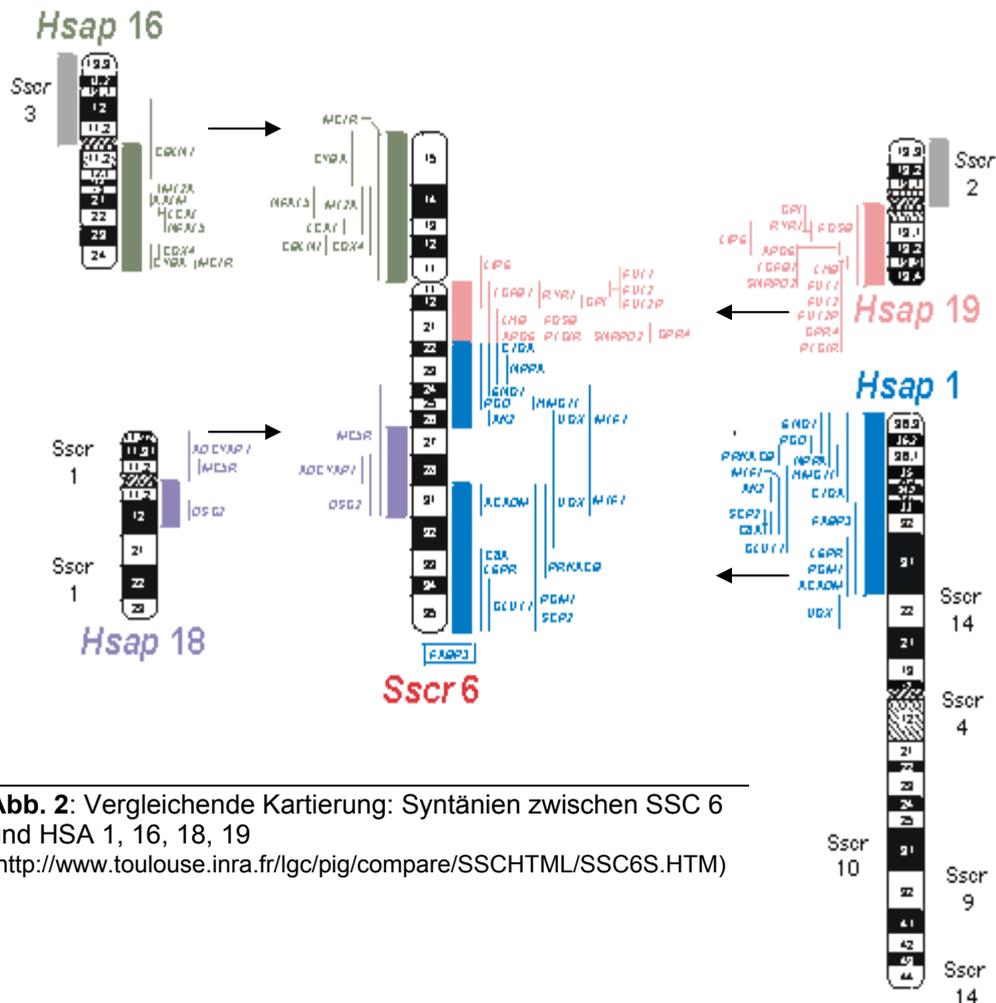


Abb. 2: Vergleichende Kartierung: Syntänien zwischen SSC 6 und HSA 1, 16, 18, 19 (<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/SSHTML/SSC6S.HTM>)

In der internationalen Forschungsgemeinschaft haben sich hinsichtlich der systematischen Aufklärung des Schweinegenoms unter anderem das „Roslin Institute“ (www.ri.bbsrc.ac.uk/pgmaps/pigmap.html), die „University of Illinois“ (www.biotech.uiuc.edu/), „INRA“ (www.inra.fr) sowie das „NLRI Korea“ (www.nlri.go.kr/english/) bemüht.

Zugang über die sich ständig erweiternde Informationsfülle bietet die „NAGRP Pig Gene Map“ (www.genome.iastate.edu/maps/recent).

Neben den graphisch dargestellten Homologiebeziehungen gibt es eine Vielzahl von Syntänien zwischen dem humanen und dem porcinen Genom (Tab. 2).

Tab. 2: Homologiebeziehungen zwischen dem humanen und porcinen Genom
 (<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/SSC.htm>; <http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/compare/HSA.htm>)
 sortiert nach porcinen Chromosomen sortiert nach humanen Chromosomen

SSC	HSA	HSA	SSC
01	06, 09, 14, 15, 18	01	04, 06, 09, 10, 14
02	05, 11, 17*, 19	02	03, 15
03	02, 07*, 16	03	13
04	01; 08	04	06*, 08, 15*, 17*
05	12, 19*, 22	05	02, 16
06	01, 04*, 16, 18, 19, 21	06	01, 07
07	06, 14, 15, 19 *	07	03*, 09, 18
08	04	08	04, 14, 15*
09	01, 07, 11, 21*	09	01, 10*, 14*
10	01, 09*, 10	10	10, 14
11	13	11	02, 09
12	17	12	05, 14
13	03, 21	13	11
14	01, 08, 09*, 10, 12, 22	14	01, 07
15	02, 04*, 08	15	01, 07
16	05	16	03, 06
17	04*, 20	17	02*, 12
18	07	18	01, 06
		19	02, 05*, 06, 07*
		20	17
		21	06*, 09*, 13
		22	05, 14

Nicht durch Chromosomenfärbung identifizierte Homologien sind mit einem Stern „*“ markiert, zunächst nur vorläufige Homologien sind „*kursiv*“ dargestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst ein 1.2 Mb große BAC/PAC-Contig in der Region des porcinen *RYS1* Gens fertiggestellt (Martins *et al.*, 2002). Dieser Contig ist während der weiteren Arbeit auf 5.5 Mb erweitert worden (Martins *et al.*, 2003b). Der jetzt vorliegende und fertiggestellte BAC/PAC-Contig auf dem Schweinechromosom 6q1.2 ist 6.2 Mb groß und in bestehende RH-, genetische und vergleichende Karten integriert worden (Martins-Wess *et al.*, 2003a).

2.2 Maligne Hyperthermie und das *RYR1* Gen

2.2.1 Molekulargenetische Betrachtung

Das porcine Chromosom 6q1.2 beherbergt denjenigen Genlocus, der die Maligne Hyperthermie (MH) verursacht. Der Malignen Hyperthermie liegt eine Störung im skelettalen Muskelgewebe zugrunde, die von einer Mutation im Ryanodin Rezeptor-1 Gen (*RYR1*) herrührt. Diese Punktmutation ist im Exon 17 des *RYR1* Gens an der Position +1843 lokalisiert. Eine Transition von C nach T bewirkt eine Aminosäure-Substitution von Arginin nach Cystein an Position 615 (Fujii *et al.*, 1991; Leeb und Brenig, 1998).

2.2.2 Das Maligne Hyperthermie-Syndrom (MHS) bei Mensch und Schwein

Der Ryanodin-Rezeptor der Skelettmuskulatur ist ein Calciumkanal, der den Ausstrom von Calcium-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Myoplasma während des Exzitations-Kontraktions-Vorganges steuert. Patienten, die an der MH erkrankt sind, leiden an einer zu schnellen und zu langen Öffnung des Calciumkanals. Die Erkrankung ist klinisch durch Spasmen, Hypermetabolismus, Muskelsteifheit, einer raschen Zunahme der Körpertemperatur, Tachykardie und Azidose bis zum Tod charakterisiert (Mickelson *et al.*, 1996; McCarthy *et al.*, 2000; Melzer *et al.*, 2001; Brem und Brenig, 1992). MH ist auslösbar durch Inhalationsnarkotika wie Halothan und Muskelrelaxantien wie Succinylcholin.

Das Maligne Hyperthermie-Syndrom bei Schweinen ist dem bei Menschen ähnlich und hat vergleichbare physiologische und klinische Effekte. MH ist durch Streß und Aufregung z.B. bei der Mast und beim Transport auslösbar. Der früher eingesetzte Halothan-Test erlaubte zwar eine Identifizierung der streßempfindlichen Tiere, aber keine Differenzierung zwischen heterozygot und homozygot streßresistenten Tieren.

2.2.2.1 DER MHS-TEST

Durch den Einsatz des gendiagnostischen MHS-Testes liegt ein sicheres, zuverlässiges und einfaches Verfahren zur Genotyp-Diagnostik von Streßanfälligkeit vor:

In dem 134 bp langen Exon 17, welches die codierenden Positionen 1795 bis 1928 enthält, wurde die beschriebene Punktmutation in Position 1843 analysiert. Diese Punktmutation, die die Ursache für den MHS-Gendefekt ist, kann bei der PCR-Amplifikation identifiziert werden. Das C an Position +1843 ist Teil einer *HhaI*-Schnittstelle, so daß die 134 bp langen Amplifikate des C-Allels in 2 Fragmente mit jeweils 50 bp und 84 bp gespalten werden können. Die Mutation von C nach T zerstört

diese Schnittstelle, so daß das 134 bp-Fragment mit T-Allelen durch *HhaI* ungespalten bleibt. Die beiden Allele führen deshalb zu einer 134 bp langen Bande bei homozygoten MHS-Tieren, zu 2 Banden (50 bp und 84 bp) bei homozygoten MHS-freien Tieren und entsprechend zu drei Banden bei heterozygoten Tieren (Brem und Brenig, 1992).

Die Maligne Hyperthermie kann durch Streß ausgelöst werden. Daher wird synonym oft vom Porcinen Streß Syndrom (PSS) (Leeb und Brenig, 1998) gesprochen. Die schon angesprochenen drei *RYR1* Genotypen lassen sich nach der aktuellen Nomenklatur wie folgt unterteilen:

- NN (homozygot streßresistent, Halothan-negativ, C/C)
- NP (heterozygote streßresistent, Halothan-negativ, C/T)
- PP (homozygot streßempfindlich, Halothan-positiv, T/T)

2.2.2.2 SCHLACHTKÖRPEREIGENSCHAFTEN

Die Mutation des *RYR1* Gens bewirkt eine höhere Öffnungswahrscheinlichkeit des Calciumkanals. Dieses wiederum führt zu erhöhten Calciumkonzentrationen im Myoplasma und letztendlich zu einem erhöhten Muskelmetabolismus. Im Schlachtkörper äußert sich dieses Phänomen im sogenannten „Pale“, „Soft“ und „Exsudativ“ PSE-Fleisch, welches blaß, weich und wässrig erscheint (Brem *et al.*, 1999). Der Zusammenhang zwischen verschiedenen Genotypen und der Fleischqualität hinsichtlich des PSE-Fleisches ist beschrieben (de Smet *et al.*, 1996). Der PSE-Zustand kann in Schlachtkörpern mit einem raschen Sinken des pH-Wertes und einem letztlich niedrigen pH-Wert durch Proteindenaturierung beobachtet werden. Die PP-Schweine waren in dieser Studie signifikant verschieden von den NP- und NN-Schweinen. Zwischen NN- und NP-Schweinen war hinsichtlich des Magerfleischanteils kein signifikanter Unterschied feststellbar. Laut Monin und Mitarbeitern (1999) ist die Dominanz des N-Allels rasseabhängig.

In verschiedenen Studien wurden über die Zusammenhänge zwischen den Genotypen und der Fütterungsintensität sowie den Schlachtkörpergewichten und dem Magerfleischanteil berichtet (Leach *et al.*, 1996; Pommier *et al.*, 1998; Tam *et al.*, 1998). Danach weisen die PP-Tiere eine schlechtere Fleischqualität als homozygote streßresistente NN-Tiere auf. Heterozygote streßresistente NP-Tiere haben signifikant kürzere Schlachtkörper als die streßresistenten NN-Tiere, allerdings gibt es hinsichtlich der Rückenspeckdichte keine Unterschiede zwischen den Genotypen (Hamilton *et al.*, 2000).

In einem weiteren Vergleich zwischen NN-Tieren und NP-Tieren, wiesen die heterozygot streßresistenten Tiere eine bessere Futterverwertung, höhere Schlachtausbeuten und einen höheren Magerfleischanteil als die homozygot streßresistenten Tiere (Leach *et al.*, 1996) auf. In der Studie von Fujii und Mitarbeitern (1991) wurde beim Schwein durch

den Vergleich der cDNA-Sequenzen eines streßresistenten Yorkshire-Schweins und eines streßempfindlichen Piétrain-Schweins eine Punktmutation im Skelettmuskel-Ryanodin-Rezeptor Gen (*RYR1*) als genetische Ursache identifiziert.

Das Ryanodin Rezeptor 1-Gen konnte molekulargenetisch auf dem HSA 19 bzw. dem SSC 6 als primärer MHS-Locus lokalisiert werden (MacLennan *et al.*, 1990; McCarthy *et al.*, 1990). Die Vererbung des P-Allels erfolgt hinsichtlich der Fleischqualität nicht übereinstimmend rezessiv, sondern kann je nach Rasse variieren (de Smet *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse nähren die Vermutung, daß nicht nur die *RYR1* Mutation für positive Schlachtkörpereigenschaften streßanfälliger Schweine verantwortlich ist. Diese komplexen Wachstumseigenschaften könnten von anderen, eng benachbarten Genen auf SSC 6q1.2 beeinflußt werden (MacLennan und Phillips, 1992). Alternativ wurde aber auch vorgeschlagen, daß die *RYR1*-Mutation für alle Effekte verantwortlich sei.

Aufgrund der biochemischen Eigenschaften von Ryanodin-Rezeptoren mit der MH-Mutation (Tong *et al.*, 1997) erscheint die Hypothese mit einem unbekanntem Gen in der Nähe des *RYR1* Gens ebenfalls plausibel, jedoch ist diese Frage nicht abschließend geklärt (Grimm *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1999).

2.2.2.3 QUANTITATIVE TRAIT LOCI (QTL)-STUDIEN

Alle bisherigen Studien, die mit Hilfe von Kopplungsanalysen die Frage zu klären versuchten, ob ein zweiter Genort für die Fleischleistungsmerkmale beteiligt ist, scheiterten an der zu geringen Markerdichte bzw. zu seltenen Rekombinationsereignissen zwischen dem hypothetischen zweiten Genort und dem *RYR1* Gen. Das Ergebnis einer großen QTL-Studie deutete aber ebenfalls eher auf mehrere sehr eng benachbarte Genorte als auf den Einfluß eines einzelnen QTLs an der Position des *RYR1* Gens (Geldermann *et al.*, 1996). Die zahlreichen Bemühungen der Vergangenheit zur Klärung dieser Frage führten dazu, daß diese Region des Schweinengenoms 6 sehr eingehend untersucht wurde und eine Vielzahl von Markern zur Verfügung steht (Archibald *et al.*, 1995; Rohrer *et al.*, 1996; Grimm *et al.*, 1997; Mejerink *et al.*, 1997; Harbitz *et al.*, 1999; Hawken *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 1999).

Eine Studie über Fleischqualität von Grindflek und Mitarbeitern (2001) ergab, daß in einer Kreuzung aus Duroc, Norwegischer Landrasse und Yorkshire-Züchtungen ein QTL auf dem porcinen SSC 6 vorliegt, der den intramuskulären Fettgehalt beeinflußt. Die höchste Wahrscheinlichkeit für die QTL-Position ist zwischen den Markern SW1823 und S0003, lokalisiert zwischen 74 und 79 cM ausgehend vom ersten Marker auf dem Chromosom. Dieser QTL könnte ebenso die Fleischweichheit, nicht aber die Rückenspeckdichte beeinflussen (Grindflek *et al.*, 2001).

Ein QTL für intramuskulären Fettgehalt wird auf dem langen Arm von SSC 6 erwartet (de Koning *et al.*, 1999).

Diese Studie basiert auf einer F2-Kreuzung zwischen Chinesischen Meishan-Schweinen und einer kommerziellen niederländischen Zuchtlinie. Die Autoren vermuten eine Überdominanz hinsichtlich des QTL für die Rückenspeckdichte, obwohl nicht sicher bewiesen ist, ob einzelne Gene oder dicht benachbarte andere Gene dafür verantwortlich sind. Der auf SSC 6 kartierte QTL liegt circa 70 cM vom *RYS1* Gen entfernt zwischen den Markern SW1057 und S0220.

Es wurde kein Beweis für einen QTL in denjenigen Studien gefunden, in denen die *RYS1* Mutation nicht in der Population präsent war (Rohrer et al., 1998).

2.3 Weitere muskelspezifische Gene auf Chromosom 6q1.2 des Schweins

2.3.1 Das Cytochrom C Oxidase (*COX7A1*) Gen

Die Cytochrom C Oxidase ist die letzte Komponente der mitochondrialen Elektronenübertragungskette. Sie besteht aus drei großen katalytischen, vom mitochondrialen Genom kodierten Untereinheiten, sowie aus zehn kleineren Untereinheiten, die vom nucleären Genom kodiert werden (Lenka et al., 1998). Von der vom Kerngenom kodierten Untereinheit VIIa sind drei unterschiedliche Isoformen bekannt, die wiederum von unterschiedlichen Genen kodiert werden: Eine Isoform, vom *COX7A1* Gen kodiert, wird spezifisch im Herzen und in Muskelzellen exprimiert (Arnaudo et al., 1992; Grossman et al., 1998). Das *COX7A2* Gen kodiert eine zweite konstitutive Isoform. Kürzlich ist eine östrogen-abhängige Isoform bekannt geworden, welche vom *COX7A2L* Gen kodiert wird (Watanabe et al., 1998). Die abgeleiteten Peptide des Säuger-Gens *COX7A1* enthalten 79 oder 80 Aminosäuren und weisen eine Übereinstimmung von ungefähr 80 % der Aminosäureidentität auf, während die Identitäten der *COX7A2* oder *COX7A2L* Peptide innerhalb einer Spezies nur zu 60 % übereinstimmen (Schmidt et al., 1999). Bislang ist das komplette *COX7A1* Gen, das eine genomische Länge von 1.5 kb aufweist, beim Rind und beim Menschen mit vier gering entfernten Exonen untersucht worden (Seelan et al., 1992; Wolz et al., 1997). Das humane *COX7A1* Gen ist auf HSA 19q13.1 lokalisiert, einer GC-reichen Region mit einem sehr hohen Gen-Gehalt.

2.3.2 Das *CAPNS1* Gen

Das *CAPNS1* Gen kodiert die kleine Untereinheit der Calpain-Proteasen. Die Calpaine sind eine Familie von Ca^{2+} -abhängigen intracellulären Cystein Proteasen. Die zwei bekanntesten Mitglieder dieser Familie sind μ -Calpain und m-Calpain. Sie bestehen aus 80 kDa großen katalytischen Untereinheiten, welche von dem *CAPN1* bzw. *CAPN2* Gen

kodiert werden. Sie bilden Heterodimere mit einer kleinen 28 kDa regulatorischen Untereinheit, welche vom *CAPNS1* Gen kodiert wird (früher *CAPN4*). Die genaue physiologische Funktion der Calpaine ist immer noch unklar. Arthur und Mitarbeiter (2000) zeigten, daß es bei *CAPNS1* knockout-Mäusen während der Trächtigkeit über hämorrhagische Schäden und Entwicklungsstörungen im kardiovaskulären System bis zum Tod kommt.

CAPNS1 cDNAs konnten von einer Vielzahl von Vertebraten-Spezies wie Mensch, Maus, Ratte, Kaninchen, Rind und Schwein isoliert werden. Partielle cDNA wurde vom Huhn gewonnen (Ohno *et al.*, 1986; Arthur *et al.*, 1998; Sorimachi *et al.*, 1996; Emori *et al.*, 1986; McCelland *et al.*, 1989; Sakihama *et al.*, 1995). Die orthologen kleinen Calpain Untereinheiten bestehen aus 263 bis 269 Aminosäuren und sind zu 90 % identisch. Die genomische Struktur der Säuger *CAPNS1* Gene ist von Mensch und Maus bekannt. Sie bestehen aus 11 Exons, die ungefähr 7 kb genomischer DNA überspannen (Miyake *et al.*, 1986; Arthur *et al.*, 1998).

3 Material

3.1 Bakterien, Plasmide, Genbanken

Aus der Stammsammlung der Abteilung Molekularbiologie des Instituts für Tierzucht und Vererbungsforschung der Tierärztlichen Hochschule Hannover und des Tierärztlichen Instituts der Georg-August-Universität Göttingen wurden folgende Bakterien, Plasmide und Genbanken verwendet:

3.1.1 Bakterien

Stratagene, Heidelberg :

E. coli XL1-blue mit folgenden genetischen Eigenschaften:

rec-a1m endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, rellA1, lac [F'*proAB, lacI*^{qZ} ΔM15, Tn10(tetI)]

Invitrogen, Groningen, Niederlande:

TOP10 One Shot™, chemisch kompetent

F⁻*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ* ΔM15, Δ*lacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)*7697, *gal U, gal K, rpsL(Str^R), endA1, nupG*

3.1.2 Plasmide

Es wurden die Plasmide pGEM™-4Z (Promega, Heidelberg) und pCR4Blunt-Topo (Invitrogen, Groningen, Niederlande) verwendet.

3.1.3 Genbanken

3.1.3.1 BAC-BANK

Das System der bakteriellen artifiziellen Chromosomen (BAC) wurde von Shizuya und Mitarbeitern (1992) entwickelt. Es basiert auf dem *E. coli* F-Faktor Plasmid mit einer Kapazität von bis zu 300 kb. Es stehen zur Zeit fünf porcine BAC-Banken zur Verfügung (Rogel-Gaillard *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2000; Fahrenkrug *et al.*, 2001; <http://bacpac.chori.org/porcine242.htm>).

Die porcine RPCI-44 BAC-Bank (Fahrenkrug *et al.*, 2001) besteht aus 185.500 Klonen mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 165 kb und weist 10.2 Genomäquivalente auf.

3.1.3.2 PAC-BANK

Für die Isolierung von PAC-Klonen auf SSC 6q1.2 stand die porcine PAC-Genbank TAIGP714 zur Verfügung, die etwa 3.2 haploide Genomäquivalente und eine durchschnittliche Insertgröße von 120 kb aufweist (Al-Bayati *et al.* 1999). Sie wurde in das „Reference Library“ System (Nr. 714) des Deutschen Humanen Genomprojektes aufgenommen und besteht aus 90.240 Klonen, die in 235 384-well Mikrotiterplatten angeordnet sind (<http://www.rzpd.de/>).

Es wurden DNA-Pools angelegt, um die Genbank mittels PCR durchmustern zu können. Die Isolierung eines positiven Klons ist bei diesem Verfahren nach vier PCR-Durchläufen auf unterschiedlich komplexen DNA-Pools der Genbank möglich.

3.2 Enzyme, Oligonucleotide und Chemikalien

3.2.1 Enzyme

Es wurden Enzyme der Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) verwendet.

3.2.2 Oligonucleotide

Die verwendeten IRD700- und IRD800-fluoreszenzmarkierten Oligonucleotide sowie unmarkierte Oligonucleotide wurden von der Firma MWG-Biotech GmbH (Ebersberg) synthetisiert.

3.2.3 Chemikalien und andere Materialien

Die eingesetzten Chemikalien und sonstigen Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Applicem (Darmstadt), Bio-Rad Laboratories (München), Biozym Diagnostik GmbH (Hessisch Oldendorf), Clontech Laboratories, Inc (Palo Alto, USA) Difco Laboratories (USA), Eastman Kodak Company (Rochester, New York, USA), Eppendorf Gerätebau (Hamburg), Fluka-Feinchemikalien (Neu-Ulm), GibcoBRL Life Technologies (Heidelberg), Greiner GmbH (Nürtingen), E. Merck AG (Darmstadt), MWG-Biotech GmbH (Ebersberg), New England Biolabs (Schwalbach), Nunc GmbH (Wiesbaden), Octurno Medizintechnik GmbH (Oldenburg), Qiagen (Hilden), Quantum Appligene (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht), Sartorius

GmbH (Göttingen), Schleicher und Schuell GmbH (Dassel), Sigma Chemie (München) und Whatman Limited (Springfield Mill, USA) bezogen.

3.3 Laborgeräte

- Automatisches DNA-Sequenziergerät
 - LI-COR IR² Analyzer Gene Reader
4200 L2/S2, MWG-BIOTECH GmbH, Ebersberg

- Geldokumentationssystem
 - BioDocAnalyze 312 nm, Biometra, Göttingen

- Pipetten
 - 0,1-10 µl Multi-12-Kanalpipette, Micronic[®], Lelystadt, NL
 - Matrix Impact[®] Multi-8-Kanalpipette, Integra Biosciences, Fernwald
 - Multipette[®] plus, Eppendorf, Hamburg
 - Gilson 2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl

- PCR-Prozessoren
 - Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc, Watertown (USA), BIOzym, Hess. Oldendorf
Thermocycler für Mikrotiterplatten: PTC-100TM und PTC-200TM

- Sonstige
 - Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen: Hybridisierungsöfen Typ u230So
 - B. Braun, Melsungen: Certomat H Schüttler, Certomat R Inkubatorhaube
 - Benda Laborgeräte und Ultraviolettstrahler, Wiesloch: UV-Flächenstrahler N-90L 366 nm,
 - Bender & Hobein, Zürich: Vortex Genie2
 - Bethesda Research Laboratories GmbH, Neu-Isenburg: Electrophoresis Sequencing System
 - Bio-Rad Laboratories, München: Gelelektrophoresekammern für Agarosegel, Pulsfeldgelelektrophorese-System CHEF DR III, Power PAC 3000
 - Brutschrank VT 5042, Heraeus, Osterode
 - Eppendorf Gerätebau, Hamburg: Heizblock, *BioPhotometer*
 - EquiBio, Kent (GB): Easyject T Basic Elektroporator

- Flachbettelektrophoresekammern: Bio-Rad, München; Hofer, Serva, Heidelberg; Biometra, Göttingen
 - Heidelph, Kehlheim: Magnetrührer MR2002
 - Infors, Bottingen: Schüttelinkubator CH-4103
 - Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen: Magnetrührer
 - Knick Elektronische Messgeräte, Berlin: Digital-pH-Meter 643
 - Millipore, Eschborn: MilliQ biocell, Vacuum manifold MAVM 096 0R
 - Octurno Medizintechnik GmbH, Oldenburg: Standard-Vernebler
 - Pharmacia, Freiburg: Elektrophoresis Power Supply ES 3500
 - Sartorius AG, Göttingen: Waage BL1500S, Feinwaage 1801
 - QIAGEN, Hilden: QIAvac 96 Vacuum Regulator
- Wasserbäder
 - Haake, Karlsruhe: Wasserbad DC3
 - GFL mbH, Burgwedel: GFL-Schüttelwasserbad 1083
- Zentrifugen
 - Eppendorf Gerätebau, Hamburg: Tischzentrifugen 5415D
 - Heraeus Instruments, Osterode: Megafuge 1.0R (Rotor BS 4402/A), Inkubator
 - Kontron Instruments, Neufahrn: Centrikon H-401 (Rotor A6.14)
 - Kühlzentrifuge 5417R, Heizblock
 - Savant, München: Speed Vac Plus SC110A
 - Sigma, Osterode: Sigma Zentrifuge 4-15 (Rotor 09100)

4 Methoden

4.1 Vermehrung und Isolierung von Plasmid-DNA

4.1.1 Bakterienkultur (Ausubel *et al.*, 1990)

4.1.1.1 FLÜSSIGKULTUR

Autoklaviertes Luria-Broth Medium (LB-Medium) wurde, nach Zugabe entsprechender Antibiotika, mit Bakterien einer Plattenkultur oder einer anderen Flüssigkultur angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden 8-20 Stunden bei 37 °C bei 225 U/min im Schüttler inkubiert.

LB-Medium:	Trypton	10,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	NaCl	5,0 g
	H ₂ O bidest.	ad 1000 ml

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf circa 50 °C wurden dem Medium je nach Bedarf Antibiotika zugesetzt:

1000 x Tetracyclin-Stammlösung:

12,5 mg/ml in 70 %igem Ethanol, gelagert bei -20 °C, (lichtempfindlich)

1000 x Kanamycin-Stammlösung:

25 mg/ml in H₂O bidest., gelagert bei -20 °C

1000 x Chloramphenicol-Stammlösung:

20 mg/ml in 100 % EtOH, gelagert bei -20 °C

1000 x Ampicillin-Stammlösung:

50 mg/ml in H₂O bidest., gelagert bei -20 °C

1000 x X-Gal-Stammlösung:

40 mg/ml in N,N-Dimethylformamid (DMF), gelagert bei -20 °C

4.1.1.2 PLATTENKULTUR

LB-Agar wurde autoklaviert, auf ca. 50 °C abgekühlt und je nach Selektionsanforderung mit Ampicillin (50 µg/ml), Tetracyclin (12,5 µg/ml), Kanamycin (25 µg/ml), Chloramphenicol (20 µg/ml) oder X-Gal (40 µg/ml) versetzt. Anschließend wurde der warme LB-Agar ca. 5 mm hoch in sterile Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren wurden die Platten 45 Minuten lang offen in einer sterilen Laminarhaube getrocknet und danach steril verpackt.

Mit einer sterilen Pipette wurden 150 µl bis 250 µl Flüssigkultur auf eine Platte pipettiert und mit einer sterilen Glaspipette ausgestrichen. Daraufhin wurden die Platten 16 bis 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

LB-Agar:	Trypton	10,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	NaCl	5,0 g
	Bacto-Agar	15,0 g
	H ₂ O bidest.	ad 1000 ml

Die Plattenkulturen wurden bei 4 °C maximal 1 Monat aufbewahrt.

4.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA und BAC/PAC-DNA aus *E. coli*

4.1.2.1 ISOLIERUNG GRÖßERER MENGEN PLASMID-DNA MIT Qiagen PLASMID KITS

Zur Isolierung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurden Qiagen Plasmid Kits verwendet. Die Bakterien wurden dabei durch eine NaOH/SDS-Behandlung lysiert. Assoziierte genomische DNA und Proteine wurden durch KOAc gefällt. Die weitere Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie.

20 bis 200 ml Bakterienkultur wurden 15 Minuten bei 5.500 Umdrehungen pro Minute (Upm) und 4 °C in der Centrikon H-401 (Rotor A6.14) zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in einer entsprechenden Menge Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurde das gleiche Volumen Puffer P2 zugegeben, vorsichtig gemischt und maximal 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde ein weiteres Volumen Puffer P3 zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis, wurde der Ansatz 30 Minuten bei 6.000 Upm und 4 °C in der Centrikon H-401 (Rotor A6.14) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 30 ml des Puffers QC, wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Unmittelbar nach der Zugabe von 0,7 Volumen (= 10,5 ml) Isopropanol wurde die DNA 90 Minuten bei 6.000 Upm und 4 °C in der Megafuge 1.0R zentrifugiert. Das Pellet wurde mit -20 °C kaltem 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in einem entsprechenden Volumen TE (10/1) gelöst und die Konzentration durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm im Spektralphotometer bestimmt.

4.1.2.2 ISOLIERUNG GRÖßERER MENGEN BAC/PAC-DNA (Qiagen LARGE-CONSTRUCT KIT)

Für die Isolierung von BAC/PAC-DNA, die frei von genomischer DNA war, wurde der Large-Construct Kit von QIAGEN verwendet.

Die Bakterien wurden dabei ebenfalls durch eine NaOH/SDS-Behandlung lysiert. Proteine und assoziierte genomische DNA wurden durch modifizierte alkalische Lyse und eine integrierte ATP-abhängige Exonuklease-Behandlung gefällt. Die weitere Reinigung der DNA erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie.

20 bis 200 ml Bakterienkultur wurden 15 Minuten bei 5.500 Umdrehungen pro Minuten (Upm) und 4 °C in der Centrikon H-401 (Rotor A6.14) zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in einer entsprechenden Menge Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurde das gleiche Volumen Puffer P2 zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde ein weiteres Volumen Puffer P3 zugegeben und vorsichtig geschüttelt. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis, wurde der Ansatz 30 Minuten bei 6.000 Upm und 4 °C in der Centrikon H-401 (Rotor A6.14) zentrifugiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,6 Volumen (36 ml) Isopropanol (RT) gefällt. Der Ansatz wurde gut gemischt und sofort bei 22.000 Upm 30 Minuten bei 4 °C in der Megafuge 1.0R zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 5 ml -20 °C kaltem 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, 15 Minuten bei 22.000 Upm und 4 °C zentrifugiert, sowie anschließend ungefähr 2 Minuten an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in 9,5 ml Puffer EX aufgenommen, bis sie wieder vollständig gelöst vorlag. Es wurden 200 µl ATP-abhängiger Exonuklease sowie 300 µl ATP (100 mM) zur gelösten DNA gegeben. Nach kurzem Mischen wurde der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden dem Ansatz 10 ml Puffer QS zugegeben. Die gesamte Probe wurde auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 2 x 30 ml des Puffers QC, wurde die DNA mit dem auf 65 °C vorgewärmten Puffer QF (15ml) eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Volumen (=10,5 ml) Isopropanol (RT) gefällt und 30 Minuten bei 6.000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Nach einem einmaligen Waschschrift mit 5 ml 70 %igem Ethanol (RT) und erneutem 15 minütigen Zentrifugieren bei 6.000 Upm, wurde das Pellet ungefähr 5 bis 10 Minuten luftgetrocknet und in einem entsprechenden Volumen TE (10/1) gelöst. Die Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm im Spektralphotometer bestimmt.

Puffer P1:	Tris/ HCl, pH 8,0 EDTA RNase A	50 mM 10 mM 100 µg/ml, gelagert bei 4 °C
RNase- Stammlösung:	10 mg/ml in H ₂ O bidest., zur Inaktivierung von DNAsen für 15 Minuten auf 100 °C erwärmen; Lagerung bei -20 °C	
Puffer P2:	NaOH SDS	200 mM 1 %
Puffer P3:	KOAc	3 M, pH 5,5

Puffer QBT:	NaCl	750 mM
	Na-MOPS, pH 7,0	50 mM
	Isopropanol	15 %
	Triton X-100	0,15 %
Puffer QC:	NaCl	1 M
	Na-MOPS, pH 7,0	50 mM
	Isopropanol	15 %
Puffer QF:	NaCl	1,25 M
	Na-MOPS, pH 8,5	50 mM
	Isopropanol	15 %
Puffer EX:	Tris/HCl	50 mM
	MgCl ₂ , pH 8,5	10 mM
TE (10/1):	Tris/HCl	10 mM
	EDTA, pH 8,0	1 mM

4.1.2.3 ISOLIERUNG VON BAC/PAC-DNA AUS *E. COLI* (QIAGEN® MIDI KIT PROTOCOL)

Um größere Mengen ziemlich reiner BAC/PAC-DNA, die allerdings noch genomische *E.coli* DNA enthielt, zu isolieren, wurden QIAGEN Plasmid Kits verwendet. Da in diesem Fall nur eine Kopie des Plasmids pro Zelle vorhanden ist (single copy plasmid), wurde ein modifiziertes Protokoll von 4.1.2.1 angewendet:

100 ml Bakterienkultur wurden 20 Minuten bei 4500 x g und 4 °C in der Centrikon H-401 (Rotor A6.14) zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in einer entsprechenden Menge Puffer P1 (15 ml) resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurde das gleiche Volumen Puffer P2 (15 ml) zugegeben, vorsichtig gemischt und maximal 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde ein weiteres Volumen Puffer P3 (15 ml) zugegeben und vorsichtig geschüttelt. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 30 Minuten bei 6.000 x g und 4 °C in der Megafuge 1.0R (Rotor BS 4402/A) zentrifugiert. Ein zweiter 15 minütiger Zentrifugationsschritt bei 6.000 x g und 4 °C in der Megafuge 1.0R (Rotor BS 4402/A) schloß sich an. Die gesamte Probe wurde auf eine mit 4 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 2 x 10 ml des Puffers QC, wurde die DNA mit dem auf 65 °C vorgewärmten Puffer QF (5 x 1 ml) eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol (RT) gefällt und 60 Minuten bei 6.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach einem einmaligen Waschschrift mit zwei ml 70 %igem Ethanol (RT) und erneutem 10 minütigen Zentrifugieren bei 6.000 x g, wurde das Pellet ungefähr 5 bis 10 Minuten luftgetrocknet und in einem entsprechenden Volumen (50 µl) TE (10/1, pH 8,0) gelöst. Die Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm im Spektralphotometer bestimmt.

4.1.2.4 SCHNELLAUFSCHLUß DURCH ALKALISCHE LYSE (PLASMID-DNA ISOLATION)

Mit einer einzelnen Plattenkolonie wurden 5 ml LB/amp/tet angeimpft und bei 37 °C zwischen 8 bis 20 Stunden geschüttelt. Die Kultur wurde bei 4.500 Upm 10 Minuten bei 4 °C in der Megafuge 1.0R zentrifugiert. Das Pellet wurde nach der Resuspension in 150 µl Puffer P1 in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 150 µl Puffer P2 zugegeben und der Ansatz inkubiert ungefähr 5 Minuten bis zur vollständigen Lyse der Bakterien. Nach der Zugabe von 150 µl Puffer P3 wurde der Ansatz gemischt, 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 14.000 Upm 20 Minuten bei 4 °C in der Megafuge 1.0R (Rotor BS 4402/A) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 100 %igem Ethanol versetzt. Nach kurzem kräftigen Mischen wurde der Ansatz 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 14.000 Upm 30 Minuten bei 4 °C in der Megafuge 1.0R (Rotor BS 4402/A) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml -20 °C kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und in der SpeedVac 7 bis 10 Minuten getrocknet. Das Pellet wurde dann in 50 µl TE aufgenommen.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die DNA auf einem 0,8 %igen Agarosegel mit Ethidiumbromid angefärbt (4 µl Ethidiumbromid in 100 ml gelöster Agarose). Die Konzentration wurde anhand der Bandenintensität geschätzt. Dafür wurden 1 µl gelöste DNA mit 9 µl H₂O und 1 µl 10x Auftragspuffer versehen, auf das Gel geladen und die Intensität der Banden mit bekannten Standards verglichen.

4.1.2.5 ISOLIERUNG VON REIHEN- UND SPALTENPOOLS DER PAC-GENBANK

Entsprechende Reihen und Spalten von Mikrotiterplatten mit Glycerinkulturen der PAC-Klone wurden auf LB-Agarplatten (25 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden mit 5 ml LB Medium_{kan} von den Platten abgeschwemmt und in 12 ml Greiner-Röhrchen überführt. Ein Milliliter dieser Bakteriensuspension wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Bakterien wurden 2 Minuten bei 13.000 Upm und RT abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 300 µl P1 resuspendiert, 300 µl P2 werden zugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, anschließend wurden 300 µl P3 dazupipettiert und es wurde erneut vorsichtig gemischt. Nach der 15 minütigen Zentrifugation bei 4 °C wurden 650 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß mit 650 µl Isopropanol pipettiert und gemischt. Der restliche Überstand wird verworfen. Die DNA wurde anschließend bei 20.000 Upm bei 4 °C 15 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 1 ml 70 %igem Ethanol (-20 °C) gewaschen, der Überstand wiederum sorgfältig abpipettiert. Die DNA wurde 3 bis 4 Minuten in der SpeedVac getrocknet und in 100 µl TE (10/1) aufgenommen. Die DNA

sollte mindestens 1 Stunde bei 37 °C lösen. Sie ist dann kurz gevortext und abzentrifugiert worden.

Puffer P1 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase
 Puffer P2 200 mM NaOH, 1 % SDS
 Puffer P3 3.0 M K-Acetat, pH 5.5

Die DNA ist bei -20 °C für mehrere Jahre lagerungsfähig.

4.1.3 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* XL1-blue (Hanahan, 1983)

20 ml TYM-Medium, welches 12,5 µg/ml Tetracyclin enthielt, wurde in einem 250 ml Kolben mit 50 µl *E. coli* XL1-blue aus einer Vorkultur angeimpft. Im Schüttelinkubator wurde der Ansatz bei 37 °C inkubiert, bis die Bakterien eine optische Dichte von 0,5-0,8 bei 600 nm (OD₆₀₀) erreicht hatten. Die Kultur wurde mit weiterem TYM/tet-Medium auf 100 ml verdünnt und in einem 2.000 ml Kolben erneut bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 vermehrt. Es wurde auf 500 ml verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 unter Schütteln inkubiert. Durch vorsichtiges Schütteln wurde die Bakterienkultur in einem NaCl-Eiswasserbad rasch auf 0 °C abgekühlt und bei 4.000 Upm und 2 °C in der Centrifuge H-401 (Rotor A6.14) 10 Minuten zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde vorsichtig in 100 ml 0 °C kaltem TfBI resuspendiert und erneut wie oben abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml 0 °C kaltem TfBII resuspendiert. 200 µl Aliquots wurden in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bei -80 °C aufbewahrt.

TYM-Medium:	Trypton	20,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	NaCl	5,0 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 g
	H ₂ O bidest.	ad 1000 ml; autoklavieren
TfBI:	KOAc	30 mM, pH 6,5
	MnCl ₂	50 mM
	KCl	100 mM
	CaCl ₂	10 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
TfBII:	Na-MOPS	10 mM, pH 7,0
	NaCl ₂	75 mM
	KCl	10 mM
	Glycerin	15 % (v/v)

4.1.4 Transformation kompetenter *E. coli*

4.1.4.1 TRANSFORMATION CHEMISCH KOMPETENTER *E. COLI* XL1-BLUE

200 µl kompetente *E. coli* XL1-blue wurden auf Eis aufgetaut und jeweils 50 µl zu 30 µl DNA-Lösung pipettiert, welche circa 50 bis 200 ng ligierte Plasmid-DNA oder 1 bis 50 ng supercoiled Plasmid-DNA enthielt. Der Ansatz wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert, dann 2 Minuten bei 42 °C gehalten und wieder auf Eis abgekühlt. Der Transformationsansatz wurde mit 250 µl 37 °C warmem NZCYM-Medium versetzt und bei 37 °C 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 150 bis 250 µl dieses Ansatzes auf LB/amp/tet/X-Gal-Platten ausplattiert.

NZCYM-Medium:	NZ Amine A	10,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	Casaminoacids	1,0 g
	NaCl	5,0 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	22,0 g
	H ₂ O bidest.	ad 1000 ml; autoklavieren

4.1.4.2 TRANSFORMATION CHEMISCH KOMPETENTER TOP10 ONE SHOT ZELLEN

50 µl chemisch kompetente TOP10 One Shot Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 2 µl DNA-Lösung dazu pipettiert. Der Ansatz wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert, dann 45 Sekunden bei 42 °C gehalten und wieder auf Eis abgekühlt. Der Transformationsansatz wurde anschließend mit 500 µl SOC-Medium versetzt und bei 37 °C 60 Minuten mit 225 Upm inkubiert. 150 µl dieses Ansatzes wurden auf LB/amp/X-Gal-Platten ausplattiert.

SOC-Medium:	Trypton	20,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	NaCl	0,5 g
	KCL	2,5 mM
	Glukose	20 mM
	MgCl ₂	10 mM
	H ₂ O bidest.	ad 1000 ml

4.1.4.3. TRANSFORMATION ELEKTROKOMPETENTER TOP10 ONE SHOT ZELLEN

Zu den 6 µl des Ligationsansatzes aus der TOPO Klonierungsreaktion wurden 100 µl H₂O bidest. gegeben. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Fällung der DNA wurden 2 µl (20 mg/ml) Glykogen Lösung, 10 µl 3 M Natriumacetat Lösung pH 5,2 und 300 µl 100 %iges Ethanol hinzugegeben und durch Vortexen gemischt. Nach 15 Minuten Inkubation bei -80 °C wurde die DNA bei 22.000 Upm 15 Minuten bei 4 °C in der Megafuge 1.0R (Rotor BS 4402/A) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 80 %igem Ethanol gewaschen, in der SpeedVac getrocknet und in 10 µl H₂O bidest. aufgenommen. 3,3 µl der gefällten DNA wurden zu 50 µl elektrokompenten TOP10 One Shot gegeben und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Der

Transformationsansatz wurde anschließend mit 1 ml SOC-Medium versetzt und 60 Minuten bei 37 °C mit 225 Upm inkubiert. 25-100 µl dieses Ansatzes wurden auf LB/amp/X-Gal-Platten ausplattiert.

4.1.5 Erstellen einer Shotgun Plasmid Genbank

Es wurde mit dem TOPO Shotgun Subkloning Kit gemäß den Angaben des Herstellers (Invitrogen) gearbeitet.

4.2 Enzymatische Manipulation und Analyse von DNA

4.2.1 Auftrennung von kleinen DNA-Fragmenten

Zur Analyse der DNA wurden horizontale Agarosegele von ca. 5 bis 10 mm Dicke und 10 bis 25 cm Länge verwendet. Je nach Größe der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden Agarose-Konzentrationen von 0,6 bis 2,0 % gewählt. Die jeweilige Menge Agarose wurde in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und in einem entsprechendem Volumen 1 x TBE-Laufpuffer aufgeschlämmt. Die Suspension wurde im Mikrowellenherd aufgekocht und solange gerührt, bis eine homogene Lösung entstand. Die Lösung wurde auf eine Temperatur von maximal 55 °C abgekühlt und mit einer Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml in H₂O bidest.) auf eine Ethidiumbromidkonzentration von 0,4 µg/ml eingestellt. Die Lösung wurde in eine entsprechende Gelform mit einem Kamm der erforderlichen Taschengröße gegossen und bis zum Erstarren der Agarose stehengelassen. Der Kamm wurde vorsichtig gezogen und das Gel in einer Elektrophoresekammer mit 1 x TBE-Laufpuffer bedeckt. Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Volumen 10 x Auftragspuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei Feldstärken von 5 bis 10 V/cm. Die DNA-Fragmente wurden durch Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht bei 366 nm oder 312 nm sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Geldokumentationssystems BioDoc-Analyse (Biometra, Göttingen).

10 x TBE-Laufpuffer:

Tris	121 g
Borsäure	51,4 g
EDTA	3,72 g
H ₂ O bidest.	ad 1000 ml

10 x Auftragspuffer:

Glycerin	50 % (v/v)
EDTA pH 8,0	0,1 M
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)

4.2.2 Pulsfeldgelelektrophorese (Schwartz und Cantor, 1984)

Es wurde ein 1 %iges Agarosegel mit 150 ml 0,5 x TBE und einer Ethidiumbromidkonzentration von 0,4 µg/ml gegossen. Die Elektrophoresekammer wurde mit 2,8 Litern 0,5 x TBE gefüllt und circa 45 Minuten auf 16 °C temperiert. Die Geltaschen wurden nach Erstarren des Gels mit 0,5 x TBE befüllt und mit der zu untersuchenden DNA beladen. Anschließend wurden die Taschen mit 1 %iger Agarose (in 0,5 x TBE) abgedichtet. Das Gel wurde mit einer Feldstärke von 6 V/cm, einem Pulswinkel von 120° und einer Pulszeit von 1 s bis 30 s für 20 h laufen gelassen.

4.2.3 Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die zu isolierende DNA auf einem UV-Schirm (366 nm) ausgeschnitten, abgewogen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden 3 Volumina Puffer QX1 zugegeben, die QIAEXII-Lösung durch kräftiges Schütteln resuspendiert und 10 µl zum Reaktionsansatz hinzupipettiert. Anschließend wurde das Agarose-Stück 10 Minuten bei 50 °C inkubiert und dabei alle 2 Minuten durch kräftiges Schütteln gemischt. Der Ansatz wurde anschließend 30 Sekunden lang bei 14.000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand sorgfältig entfernt. Das Pellet wurde in 500 µl Puffer QX1 resuspendiert, wiederum 30 Sekunden lang bei 14.000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde zwei Mal auf diese Weise mit je 500 µl Puffer PE gewaschen und anschließend 20 Minuten luftgetrocknet. Das in 20 µl 1x TE-Puffer aufgenommene Pellet wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die DNA zu eluieren und erneut 30 Sekunden bei 14.000 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Elutionsschritt wurde gegebenenfalls wiederholt und die beiden Eluate wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt.

Der gleiche QIAGEN-Kit (QIAEXII-Kit) wurde auch für die Reinigung von DNA in Lösung verwendet.

4.2.4 Enzymatische Manipulation von DNA

4.2.4.1 SPALTUNG VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Die gereinigte DNA wurde mit kommerziell erhältlichen Restriktionsenzymen gespalten. Den Herstellerangaben entsprechend wurden die Reaktionsbedingungen eingestellt. Die DNA wurde je nach Reinheitsgrad mit 1-5 Units Enzym pro µg DNA bei 37 °C mindestens 1 Stunde inkubiert.

4.2.4.2 DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Nach Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen oder mechanischem Scheren trägt das 5'-Ende der gespaltenen DNA-Fragmente eine Phosphatgruppe. Dieser Phosphatrest wurde mit alkalischer Phosphatase abgespalten, um eine Religation von linearisierten Plasmiden zu verhindern.

Reaktionsansatz:	linearisierte DNA	10 µg
	10 x Reaktionspuffer des Herstellers	8 µl
	alkalische Phosphatase	5 µl (1U/µl)
	H ₂ O bidest.	ad 80 µl

Der Reaktionsansatz wurde zur Inaktivierung der alkalischen Phosphatase 20 Minuten auf 68 °C erhitzt.

4.2.4.3 DIE 5'-KINASIERUNG VON DNA

DNA-Moleküle müssen an ihrem 5'-Ende eine Phosphatgruppe tragen, um linearisierte DNA-Fragmente ligieren zu können. Daher müssen PCR-Produkte, die an ihren Enden synthetische Oligonucleotide ohne 5'-Phosphatgruppe tragen, vor einer Ligation mit einer dephosphorylierten Plasmid-DNA kinasiert werden, um eine Phosphatgruppe anzuhängen.

Reaktionsansatz:	DNA	ungefähr 1 µg
	10 x Reaktionspuffer des Herstellers	3 µl
	T4-Polynucleotidkinase	1 µl (10 U/µl)
	ATP	0,5 µl 10mM
	H ₂ O bidest.	ad 30 µl

Die T4-Polynucleotidkinase wurde vor einer Ligation durch 20 minütiges Erhitzen auf 68 °C inaktiviert.

4.2.4.4 LIGATION VON PLASMIDEN

Um zwei DNA-Enden kovalent miteinander zu verbinden, müssen mit Hilfe der Ligase enzymatisch Phosphodiesterbindungen geknüpft werden. Dazu ist es erforderlich, daß mindestens ein DNA-Ende eine 5'-Phosphatgruppe trägt.

Reaktionsansatz:	entsprechende Vektor-DNA	50 ng
	Insert-DNA	x ng
	(molares Verhältnis Insert : Vektor ~ 1 : 1)	
	10 x Reaktionspuffer des Herstellers	3 µl
	T4-DNA-Ligase	0,5 µl (400 U/ µl)
	H ₂ O bidest.	ad 30 µl

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 16 °C oder alternativ 2-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

4.2.4.5 HERSTELLUNG GLATTER ENDEN MIT T4-DNA-POLYMERASE

Im Reaktionspuffer des Herstellers wurde 1 µl DNA mit 1 Unit T4-DNA-Polymerase und 100 µM Desoxynucleosidtriphosphaten 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Polymerase durch 20 minütiges Erhitzen auf 68 °C inaktiviert.

4.2.4.6 LIGATION VON PLASMIDEN MIT HILFE DES TOPO CLONING SYSTEMS

Das TOPO Cloning System basiert auf dem linearisierten pCR4 Blunt-TOPO Vektor, an dessen 3'-Enden die *Vaccinia Virus* Topoisomerase I kovalent gebunden ist. Dies ermöglicht eine effiziente Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden.

Reaktionsansatz:	pCR4Blunt-TOPO Vektor-DNA	10 ng
	Insert-DNA mit glatten Enden	100 ng
	Salz-Puffer des Herstellers	1 µl
	H ₂ O bidest.	ad 30 µl

Der Reaktionsansatz wurde durch Schwenken vorsichtig gemischt und 25 Minuten bei 37 °C inkubiert.

4.2.5 Alkalischer Transfer von DNA auf Trägermembranen (Reed und Mann, 1985)

Die DNA wurde im Agarosegel elektrophoretisch getrennt und anschließend zweimal 15 Minuten in 0,4 M NaOH geschwenkt. Das Gel wurde im folgenden mit der Unterseite nach oben auf eine Frischhaltefolie (Saran[®]) gelegt. Eine passend zurechtgeschnittene positiv geladene Nylonmembran wurde luftblasenfrei auf das Gel gebracht. Zwei Lagen passend zurechtgeschnittenes Whatmanpapier wurden angefeuchtet und ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt. Ein circa 10 cm hoher Stapel Kleenex-Papier wurde aufgelegt und anschließend mit einem Gewicht von etwa 2 kg beschwert. Die Nylonmembran wurde nach 4-24 Stunden kurz in 2 x SSC geschwenkt und zwischen zwei Blättern Whatmanpapier getrocknet.

20 x SSC Stocklösung:	NaCl	175 g
	Na ₃ -Citrat	88 g
	H ₂ O bidest.	ad 1000 ml

4.2.6 Radioaktive Hybridisierung von Filtern mit BAC-DNA (Ausubel *et al.*, 1990)

Die porcine genomische BAC-Bank RPCI-44 (Fahrenkrug *et al.*, 2001) wurde durch radioaktive Hybridisierung laut RPCI-Protokollen (<http://www.chori.org/bacpac>) durchmustert. PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden mit ^{32}P markiert und als Sonden verwendet. Positive Klone wurden vom Children's Hospital Oakland Research Institute, BAC/PAC-Resources (<http://www.bacpac.chori.org>) bereitgestellt.

Die getrockneten high density Filter der RPCI-44 BAC-Bank wurden bei 65 °C zwischen 30 Minuten und 4 Stunden in 30-50 ml „CHURCH“-Puffer prähybridisiert. Während der Prähybridisierung wurde die Sonde mit dem RadPrime DNA Labeling System (Gibco RadPrime DNA Labeling System, Cat. No. 18428-011, Life Technologies™) markiert. Zu diesem Zweck wurden 25 ng der Sonden-DNA in 20 µl H₂O gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel überführt. Die DNA-Lösung wurde 3 min im kochenden Wasserbad denaturiert und gleich darauf 3 min auf Eis bzw. Eiswasser gestellt und kurz zentrifugiert. Es wurden 1 µl dATP-Lösung (500 µM), 1 µl dGTP-Lösung (500 µM), 1 µl dTTP-Lösung (500 µM) und 20 µl 2.5 x RadPrime Puffer pipettiert sowie nach vorsichtigem Mischen 1 µl Klenow-Polymerase dazugegeben. Zur Markierung der Sonde wurden 2,5 µl α -[^{32}P]-dCTP dazugegeben und durch Pipettieren gemischt (Aktivität: 50 µCi, Spezifikation: 3000 Ci/mmol, Hartmann Analytic SCP-205). Der Ansatz wurde für die Markierung bei 37 °C mindestens 10 min bis 60 min inkubiert. Die Sonde wurde zur Denaturierung 3 min in kochendes Wasser gegeben und anschließend 3 min auf Eis gestellt. Zur Hybridisierung wurde die Sonde in die Hybridisierungslösung gegeben und über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Nach Abgießen der Hybridisierungslösung wurden die Filter in der Hybridisierungsröhre einmal kurz mit „Low Stringency“-Waschpuffer gewaschen. Die Filter wurden in geeignete Plastikschaalen überführt und erneut eine Minute mit „Low Stringency“-Waschpuffer bei RT gewaschen. Es folgte ein Waschschrift mit auf 50 °C vorgewärmtem „High Stringency“-Waschpuffer 1 Minute lang bei RT und ein weiterer Waschschrift mit diesem Puffer 5 Minuten bei 45 °C. Die Strahlung der Filter wurde zwischendurch gemessen. Im Endergebnis sollte die Strahlung zwischen 100-200 IPS betragen. Bei Bedarf wurde der Waschvorgang mit höheren Temperaturen wiederholt. Die feuchten Filter wurden auf beschichtetem Papier, mit der DNA nach oben, luftblasenfrei in Frischhaltefolie eingewickelt. In einer Röntgenkassette mit Verstärkerfolie wurden sie auf einen Röntgenfilm (Kodak Biomax MS) über Nacht bei -80 °C exponiert. Nach einer 30 minütigen Auftauphase wurden sie gemäß den Herstellerangaben entwickelt. Die positiven Klone wurden auf einem Leuchttisch anhand der CHORI-Auswertebögen identifiziert.

Hybridisierungslösung: „CHURCH“-Puffer	kristallines BSA (Fraction V) Na ₂ EDTA NaHPO ₄ SDS H ₂ O bidest.	1 % 1 mM 0,5 M; pH 7,2 7 % ad 1000 ml
„Low Stringency“-Waschpuffer:	kristallines BSA (Fraction V) Na ₂ EDTA NaHPO ₄ SDS H ₂ O bidest.	0,5 % 1 mM 40 mM; pH 7,2 5 % ad 1000 ml
„High Stringency“-Waschpuffer:	Na ₂ EDTA NaHPO ₄ SDS H ₂ O bidest.	1 mM 40 mM; pH 7,2 1 % ad 1000 ml
1 M NaHPO ₄ ; pH 7,2	Na ₂ HPO ₄ 7 H ₂ O 85 % H ₃ PO ₄	134 g 4 ml

4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988)

4.3.1 Durchmustern der Genbanken mittels PCR

Bei der Auswahl der Oligonucleotidsequenzen für die PCR wurden die Programme Primer3! und GeneFisher genutzt. Dabei wurden Primer ausgewählt, bei denen selbstkomplementäre 3'-Regionen der Oligonucleotide und Homologien am 3'-Ende zwischen zwei gleichzeitig einzusetzenden Primern möglichst vermieden wurden.

Die PCR wurde in dem Thermocycler PTC-100™ der Firma BIOzym durchgeführt. Die Durchmusterung der PAC-Genbank TAIGP714 wurde wie folgt beschrieben in drei Durchgängen vorgenommen:

1. Durchgang: PCR auf den 28 Superpools (SP) sowie Kontroll-Reaktion auf genomischer Schweine-DNA

Ein Standardansatz des ersten Durchgangs enthielt in 25 µl Gesamtvolumen ungefähr 100 ng Matrizen-DNA (1,5 µl DNA); 2,5 µl 10 x *Taq*-Puffer des Herstellers; 0,25 µl Primer mit je 10-25 pmol/µl; 1,00 µl 5 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate und 0,2 µl *Taq*-Polymerase (1 U/µl). Die Komponenten des Ansatzes wurden auf Eis pipettiert, kräftig geschüttelt, kurz zentrifugiert und die Reaktionsgefäße in einen auf 95 °C vorgeheizten Thermocycler überführt. Nach einer 5 minütigen Denaturierung bei 94 °C wurden 40 Zyklen mit 45 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 45 Sekunden Annealing bei der jeweiligen Annealing-Temperatur des Primerpaares und 45 Sekunden Polymerisation bei 72 °C durchgeführt. Es folgten die Endpolymerisation 5 Minuten bei 72 °C sowie die Kühlung 5 Minuten bei 4 °C. Nach dem Ende der Reaktion wurden die

PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel analysiert.

2. Durchgang: PCR auf den Plattenpools (PP) positiver Superpools (SP) sowie Kontroll-Reaktion

Ein Standardansatz des zweiten Durchgangs enthielt in 16 µl Gesamtvolumen ungefähr 100 ng Matrizen-DNA (1,0 µl DNA); 1,6 µl 10x *Taq*-Puffer des Herstellers; 0,15 µl Primer mit je 5-15 pmol/µl; 0,64 µl 5 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate und 0,07 µl *Taq*-Polymerase (0,35 U/µl). Die Komponenten des Ansatzes wurden auf Eis pipettiert, kräftig geschüttelt, kurz zentrifugiert und die Reaktionsgefäße in einen auf 95 °C vorgeheizten Thermocycler überführt.

Nach einer 5 minütigen Denaturierung bei 94 °C wurden 35 Zyklen mit 45 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 45 Sekunden Annealing bei der jeweiligen Annealing-Temperatur des Primerpaares und 45 Sekunden Polymerisation bei 72 °C durchgeführt. Es folgten die Endpolymerisation 5 Minuten bei 72 °C sowie die abschließende Kühlung 5 Minuten bei 4 °C. Nach dem Ende der Reaktion wurden die PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese auf einem 1,2 %igen Agarose-Gel analysiert.

3. Durchgang: PCR auf Reihen-und Spaltenpools positiver Plattenpools sowie Kontroll-Reaktion auf genomischer Schweine-DNA

Ein Standardansatz des dritten Durchganges enthielt in 16 µl Gesamtvolumen ungefähr 100 ng Matrizen-DNA (1,0 µl DNA); 1,6 µl 10 x *Taq*-Puffer des Herstellers; 0,15 µl Primer mit je 5-15 pmol/µl; 0,64 µl 5 mM Desoxyribonukleosidtriphosphate und 0,07 µl *Taq*-Polymerase (0,35 U/µl). Die Komponenten des Ansatzes wurden auf Eis pipettiert, kräftig geschüttelt, kurz zentrifugiert und die Reaktionsgefäße in einen auf 95 °C vorgeheizten Thermocycler überführt.

Nach einer 5 minütigen Denaturierung bei 94 °C wurden 32 Zyklen mit 45 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 45 Sekunden Annealing bei der jeweiligen Annealing-Temperatur des Primerpaares und 45 Sekunden Polymerisation bei 72 °C durchgeführt. Dann erfolgte die Endpolymerisation 5 Minuten bei 72 °C sowie die Kühlung 5 Minuten bei 4 °C. Nach dem Ende der Reaktion wurden die PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese auf einem 1,0 %igen Agarose-Gel analysiert.

4.3.2 Radiation Hybrid-Kartierung (RH-Kartierung)

Für die PCR-Reaktionen an der DNA des Radiation Hybrid-Panels wurde ein modifizierter Ansatz gewählt:

H ₂ O	9,0 µl
10xPuffer	1,5 µl (1,5 mM MgCl ₂)
Vorwärts-Primer	0,8 µl [10 µM]
Rückwärts-Primer	0,8 µl [10 µM]
dNTPs	0,2 µl [100 µM]
Taq-Polymerase	0,2 µl (1 U/µl)
+ DNA	2,5 µl [25 ng/µl]

Nach einer 5 minütigen initialen Denaturierung bei 94 °C wurden 38 Zyklen mit 45 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 45 Sekunden Annealing bei der jeweiligen Annealing-Temperatur des Primerpaares und 45 Sekunden Polymerisation bei 72 °C durchgeführt. Es folgten die Endpolymerisation 5 Minuten bei 72 °C sowie die Kühlung 5 Minuten bei 4 °C. Nach dem Ende der Reaktion wurden die PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese auf einem 1-2 %igen Agarose-Gel analysiert.

Die STS Marker sind auf dem somatischen Zellhybrid-Panel (Yerle *et al.*, 1996) oder auf dem IMpRH- (Yerle *et al.*, 1998) und IMNpRH2-Panel (Yerle *et al.*, 2003) entsprechend den INRA-Protokollen (<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/lgc.htm>) kartiert worden. Nach dem Genotypisieren der RH-Panel wurde mit der auf dem INRA-Internet-Server zur Verfügung stehenden Software die chromosomale Zuordnung vorgenommen und diese bei der IMpRH-Datenbank (<http://imprh.toulouse.inra.fr>; Milan *et al.*, 2000) hinterlegt.

4.4 DNA-Sequenzierung

4.4.1 Nichtradioaktive Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die Sequenzreaktionen wurden mit dem Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt.

Die BAC-Endsequenzen wurden mit T7 und SP6 bzw. BpSP6 Primern und die PAC-Endsequenzen wurden die M13 Universal und M13 Reverse Primer sequenziert.

Es wurden 200 fmol Plasmid-DNA (ca. 200 ng pro kb) mit 2 pmol IRD800 bzw. IRD700 markiertem Primer und 1 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt und mit H₂O bidest. auf 25 µl aufgefüllt. Je 6 µl von diesem Ansatz wurden zu 2 µl des Terminationsmixes pipettiert, mit Mineralöl überschichtet und der Inkubation zugeführt. Die PCR wurde auf einem Thermocycler für Mikrotiterplatten PTC-100TM Programmable Thermal Controller mit 45 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 45 Sekunden Annealing bei 58 °C und 45 Sekunden Extension bei 68 °C durchgeführt.

4.4.2 Hochauflösende Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Sequenzprodukten wurde das LICOR Modell 4200L und die Steuersoftware BaselmageIR V.4.10 verwendet. Als Gelmatrix für die Auftrennung von bis zu maximal 1.000 bp wurde Sequagel XR unter Zusatz von 1 % DMSO und Verwendung von 41 cm langen Glasplatten verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 1500 V, 35 mA und 31 W für circa 14 Stunden. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit 5 µl Ladepuffer versetzt.

Ladepuffer:	deionisiertes Formamid	97,5 %
	EDTA	10 mM; pH 8,0
	Bromphenolblau	0,1 %
10xTBE long run:	Tris	1,34 M
	Borsäure	450 mM
	EDTA	25 mM

4.4.3 Auswertung der Sequenzgele

Für die Auftrennung von nichtradioaktiven Sequenzreaktionen, die Sequenzreaktionen auf BAC- und PAC-DNA sowie auf Plasmid-DNA nach Klonierung von PCR-Produkten wurden auf dem automatischen Sequenzierer LICOR Gene ReadIR 4200 (MWG-Biotech) aufgetrennt. Die markierten DNA-Banden wurden während des Gellaufs am unteren Rand des Gels durch einen Laserscanner detektiert.

Nach dem Lauf wurden die Sequenzen mit dem Programm Image Analysis 4.10 automatisch gelesen, korrigiert und in das SCF-Dateienformat umgewandelt. Danach wurden die Sequenzen mit dem Sequencher 4.0.5 (GeneCodes, Ann Arbor, MI) bearbeitet und ausgewertet. Das Bild eines Mikrosatelliten-Gels wurde entweder visuell oder mit Hilfe des Programmes Geneprofiler 3.55 ausgewertet.

4.5 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die cytogenetische Lokalisation von positiven BAC- und PAC- Klonen erfolgte über die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) durch Frau Dr. Heidi Kuiper im Labor für Cytogenetik des Instituts für Tierzucht und Vererbungs-forschung der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

4.6 Bioinformatik

4.6.1 Lokale Programme

Die LICOR Sequenzdaten wurden mit der Data Collection V4.10 Software gesammelt und mit dem Programm Image Analysis V4.10 ausgewertet. Anschließend wurden die Daten mit dem Program SCF File Creation V4.10 in Standard Chromatogram Format-Dateien (SCF) umgewandelt.

Die ermittelten Randsequenzen der BAC- und PAC-Klone sowie der Shotgun-Plasmidklone wurden mit dem Programm Sequencher 4.0.5 automatisch zu Contigs zusammengesetzt, manuell kontrolliert und nach Einfügen der walking-Primer Sequenzen zur Gesamtsequenz des Klon-Contigs zusammengesetzt.

4.6.2 Internetseiten

Weitere Analysen wurden mit online-Hilfsmitteln des European Bioinformatics Institute EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>) durchgeführt.

Die Suche von Daten in den wichtigsten Literaturdatenbanken (PubMed, OMIM, OMIA, etc.) sowie in Nucleotid- und Genomdatenbanken wurden mit dem Entrez-Browser des National Center for Biotechnology Information NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Um homologe Sequenzabschnitte in Datenbanken zu ermitteln oder Datenbank-Abgleiche gegen die Genome von Mensch, Schwein und andere Säugetier- oder Vertebratenspezies durchzuführen, wurde das Programm BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) verwendet (Altschul *et al.*, 1990 und 1997).

Informationen zu zahlreichen Genom-Sequenzen lieferte TIGR (The Institute for Genome Research, <http://www.tigr.org/>). Die Visualisierung von Genomsequenzen ist über den NCBI Map-Viewer (<http://ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>), das EBI Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) oder den UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) möglich gewesen. Das RZPD (<http://www.rzpd.de>) sowie die BACPAC-Resources (<http://bacpac.chori.org/>) waren Ressourcen-Zentren für Klone.

Die in genomischen Sequenzen auftretenden repetitiven Sequenzabschnitte erschwerten eine zuverlässige Datenbanksuche, so daß diese Abschnitte mit Hilfe des Programmes „Repeatmasker“ (Smit *et al.*, 1999; <http://repeatmasker.genome.washington.edu>) identifiziert und maskiert werden konnten.

Single Copy Sequenzen sind für die Ermittlung geeigneter Primerpaare herangezogen worden. Entwickelt wurden die Primer mit den Programmen „Primer3“ (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) sowie „GeneFisher“ (http://www.bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin/gi_submit?mode=START).

Das Programm PipMaker (<http://bio.cse.psu.edu/pipmaker>) ermöglichte die Darstellung von kodierenden Bereichen, repetitiven Elementen und CpG-Inseln in großen

Alignments. Die Programme CpG Plot und CpG Report (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.html>) wurden verwendet, um den GC-Gehalt von Sequenzen graphisch darzustellen und die Position von CpG-Inseln zu lokalisieren.

5 Ergebnisse

Der hier beschriebene Contig wurde im Rahmen dieser vorliegenden Dissertation und der kumulativen Dissertation von Flávia Martins-Wess erstellt. Der Schwerpunkt dieser Arbeit war die chromosomale Region des porcinen Genoms von *GPI* bis *COX7A1*. Im folgenden werden jedoch die Ergebnisse des Gesamt-Contigs von *GPI* bis *LIPE* dargestellt.

5.1 Experimentelle Strategie

Um wirtschaftlich und züchterisch interessante Gene einer chromosomalen Region identifizieren zu können, muß diese zunächst detailliert charakterisiert werden. Die Konstruktion eines Klon-Contigs ist für eine solche Charakterisierung geeignet.

Eine Reihe von DNA-Klonen, die einen definierten Abschnitt eines Chromosoms darstellen, nennt man Contig. Das Prinzip der Herstellung dieses Contigs ist einfach zu erläutern: Ein mehr oder weniger zufällig ausgesuchter DNA-Klon wie z.B. RP44-19H1, diene z.B. in der Region des *USF2* Gens als Startpunkt. Die klonierte DNA wurde als Sonde benutzt, um überlappende DNA-Klone, günstigenfalls in beide Richtungen weisende, wie z.B. RP44-13L20 in Richtung *GPI* und RP44-352K9 in Richtung *COX7A1*, aus der Bibliothek zu isolieren (Abb. 5). Die Nachbarklone dienten dann ihrerseits als Sonde zur Identifizierung der nächst anschließenden DNA-Klone et cetera. Die experimentelle Praxis war wegen der großen Zahl der zu analysierenden DNA-Klone schwierig. Besonders die korrekte Orientierung der Klone in der Karte war zu Beginn der Kartenerstellung und in Inselbereichen schwierig.

Durch die Orientierung an den Informationen des Humangenoms konnten unter der Annahme vollständiger Homologien vorübergehende Unstimmigkeiten in der humanen Karte (z.B. build 31) entdeckt werden. Ein Klon-Contig beschreibt immer eine Gruppe von überlappenden Klonen, z.B. in der Region um die Gene *UBA2* und *FLJ30633* waren es drei Gruppen mit insgesamt circa 22 Klonen, die den Bereich abdeckten. Die zusammengesetzten DNA-Fragmente des Contigs repräsentieren die zu charakterisierende chromosomale Region.

Zur Zeit werden Contigs gebildet, indem entweder bakterielle artifizielle Chromosomen (BACs, bacterial artificial chromosome; Shizuya *et al.*, 1992) oder von dem Phagen P1 abgeleitete artifizielle Chromosomen (PACs, P1 derived artificial chromosome; Ioannou *et al.*, 1994) benutzt werden. Die Hauptvorteile von BACs und PACs sind, daß die DNA sehr stabil und damit im Umgang relativ unempfindlich ist. Deletionen und Chimärismus treten selten auf. Die BAC- und PAC-Vektoren enthalten in ihrem Klonierungssegment mehrere Schnittstellen für Restriktionsenzyme sowie Bindungsstellen für T7- und SP6-Primer. Diese können für die Sequenzierung von Inserts genutzt werden. BAC- und

PAC-Klonierungssysteme haben eine Kapazität von bis zu 300 kb, eine hohe Klonierungseffizienz und eine große Insert-Stabilität. Je nach Bibliothek kann eine Durchmusterung mit PCR und/oder radioaktiver Hybridisierung vorgenommen werden.

5.2 Erstellen des Contigs

5.2.1 Entwicklung und Entstehung der Contig-Karte

5.2.1.1 AUSGANGSPUNKT UND URSPRUNG

Die Erstellung des BAC/PAC-Contigs wurde ursprünglich mit der Durchmusterung der vorhandenen porcinen PAC-Bank mit zunächst 16 vorhandenen Primerpaaren aus der Region des *RYR1* Gens begonnen. Es wurden jeweils alle positiven PAC-Klone für ein gegebenes Primerpaar isoliert, um eine möglichst hohe Contig-Dichte zu erreichen. Da die vorhandene PAC-Genbank etwa 3.2 haploide Genomäquivalente enthält, hätte man bei rein statistischer Verteilung der Klone auch durchschnittlich 3.2 positive Klone für jedes Primerpaar erwartet, allerdings lag die tatsächliche Anzahl für den Gesamtbereich *GPI* bis *LIPE* bei 2.4 positiven Klonen pro Primerpaar.

Im Endzustand ist jede Position des Contigs auf mindestens drei unabhängigen Klonen (BAC oder PAC) vorhanden (Abb. 5), so daß eventuelle Artefakte wie Deletionen oder Chimärismus sicher ausgeschlossen werden können. Dieses Ziel ist dadurch erreicht worden, daß zusätzlich die RPCI-44 BAC-Genbank des Roswell Park Cancer Institutes (Buffalo, NY, USA) durchmustert wurde. Diese Genbank enthält 10 haploide Genomäquivalente bei einer angegebenen durchschnittlichen Insertgröße von 165 kb. Die statistische Verteilung der Klone ließ durchschnittlich 10 positive Klone für jedes Primerpaar erwartet, und die tatsächliche Anzahl für den Gesamtbereich *GPI* bis *LIPE* lag bei 10.1 Klonen pro Primerpaar.

Für Genorte und neu hinzukommende Mikrosatelliten der bearbeiteten Regionen wurden zusätzlich ebenfalls Primerpaare entwickelt, um die Genbank zu durchmustern. Mit dem verwendeten PCR-gestützten Durchmusterungsverfahren konnten die 21 Einzelcontigs, z.B. der Bereich *GAPDS/ATP4A* bis *PRODH2* oder der Bereich *PRODH2* bis *COX7A1*, allmählich zu einem Gesamt-Contig zusammengefügt werden.

Sobald die Genbank mit allen Primerpaaren durchmustert war, wurde damit begonnen, eventuell überlappende BACs/PACs nach ihrem STS-Gehalt zu ordnen. Insbesondere für den Bereich der vier Primerpaare aus dem *RYR1*-Gen ist zu erwarten gewesen, daß einzelne Klone bei mehr als einem Primerpaar positiv sind. So lagen z.B. die Primerpaare RYR103/104 und RYR56.1/2 in einem Abstand von 25 kb und damit deutlich unter der durchschnittlichen Insertgröße der PAC-Klone.

Von allen isolierten Klonen wurde hochreine DNA über Qiagen Plasmid Kits isoliert. Die so isolierte PAC-DNA wurde direkt mit den Primern SP6 bzw. BPSP6 und T7 ansequenziert, so daß etwa 600-800 bp Randsequenz von beiden Seiten der Klone gelesen werden konnten. Durchschnittlich konnten 689 bp gelesen werden. Mit diesen Sequenzinformationen ließen sich neue Primerpaare für weitere Durchmusterungen der Genbank entwickeln. Dieser „chromosome walking“ Prozeß wurde ausgehend von den Klonen mit *RYR1* Anteilen sukzessive in Richtung *GPI* sowie *LIPE* fortgesetzt.

Im Verlauf der Erstellung des Contigs diente neben dem *RYR1*-Gen hat auch das *GPI*-Gen als Startpunkt für einen weiteren Teil-Contig, da diese beiden Gene in allen genetischen Karten sehr eng gekoppelt sind.

Für die Bereiche *GPI* bis *UBA2*, *COX6B* bis *COX7A1* sowie für den Bereich circa 180 kb vor *FLJ30633* bis *USF2* konnten durch mehrere radioaktive Hybridisierungen viele positive Klone identifiziert werden. Die Aufklärung der Region *USF2* bis *COX6B* gestaltete sich durch die invertierte Anordnung eines Teil-Contigs zunächst schwierig. Schließlich konnte durch eine letzte radioaktive Hybridisierung der Gesamt-Contig durch den Zusammenschluß der entstandenen 2 Teil-Contigs stellt werden. Dadurch hat sich die Annahme bestätigt, daß die einzelnen Contigs im Laufe des Projekts vereinigt werden können.

Gleichzeitig wurde durch RH-Kartierung die chromosomale Lokalisation für die Amplifikate bestimmt und zur weiteren Charakterisierung wurden die Klone nach *NotI*-Spaltungen der DNA auf Pulsfeldgelen analysiert, um die Insertgrößen der Klone zu bestimmen. Bei überlappenden Klonen wurden Spaltungen mit verschiedenen Restriktionsenzymen verglichen, um anhand gemeinsamer Restriktionsfragmente die Größe des überlappenden Bereichs abschätzen zu können.

Die RPCI-44 BAC-Genbank konnte allerdings nur über Hybridisierung von Kolonie-Filtern durchmustert werden. Bei dieser Art der Durchmusterung wurde zunächst ein radioaktiv markiertes PCR-Amplifikat hergestellt, welches als Hybridisierungssonde verwendet werden konnte. Für den bearbeiteten Bereich *GPI* bis *COX7A1* konnten in vier Hybridisierungsrounds positive Klone identifiziert werden.

Ist ein gegebener STS weder in der verwendeten PAC-Genbank noch in der RPCI-44 BAC-Genbank repräsentiert, so ist davon auszugehen, daß die betreffende Stelle überhaupt nicht in BACs oder PACs klonierbar ist. Aufgrund der Erfahrungen bei der vollständigen Sequenzierung des humanen Chromosoms 22 sind derartige Stellen aber sehr selten und vor allem an den Enden der Chromosomen lokalisiert (Dunham *et al.*, 1999). Der in diesem Projekt zu klonierende Bereich liegt dagegen auf dem proximalen Bereich des q-Arms, in einer Region, die reich an Genen und arm an einfachen Sequenzwiederholungen ist.

5.2.1.2 FERTIGSTELLUNG DES BAC/PAC-CONTIGS

Die Verfügbarkeit der BAC- und PAC-Endsequenzen ermöglichte die kontinuierliche Zusammensetzung des Contigs durch vergleichende Kartierung. Die BLAST-Suche gegen die humane Referenz-Sequenz brachte 241 Treffer (31 %) auf dem menschlichen Genom, davon waren 20 % signifikante Einzeltreffer (E-Wert < 10^{-5}) auf dem HSA 19q13.1. Diese 157 Klone konnten präzise kartiert werden.

Der lange Arm des menschlichen Chromosoms 19 beherbergt in der Region zwischen den Genen *GPI* und *LIPE* laut aktueller Karte „build 35 version 1“ (Stand: November 2004) 264 Gene auf einer Länge von 8.2 Mb. Der Contig konnte durch die Verwendung von genspezifischen STS-Markern konstruiert werden, wodurch Gene individuellen Klonen zugeordnet werden konnten. Weitere Gene konnten durch die Hybridisierung heterologer cDNA-Proben auf individuellen BAC- und PAC-Klonen sowie die anschließende Analyse der BES identifiziert werden. Insgesamt konnten so mit 361 BAC- und PAC-Klonen 65 Gene auf dem SSC 6q1.2 identifiziert und lokalisiert werden.

5.2.2 Statistische Ergebniszusammenfassung

5.2.2.1 SEQUENZ-INFORMATIONEN

Die Detailinformationen über die erhaltenen Sequenzen wurden tabellarisch zusammengefaßt (Tab. 3).

Tab. 3: Statistische Auswertung der hinterlegten Sequenzen

Endsequenzen insgesamt	777
Sequenzen von BAC-Klonen	564 (73 %)
davon T7-Seite	277
davon SP6-Seite	287
Sequenzen von PAC-Klonen	213 (27 %)
davon T7-Seite	107
davon SP6-Seite	106
BAC/PAC-Klone mit zwei Endsequenzen	733 (94 %)
Gesamtzahl hinterlegter Basen	535689 bp
GC-Gehalt	250025 bp (46.7 %)
Repetitive Sequenzen insgesamt	41.4 %
SINE	23.1 %
LINE	12.1 %
LTR Elemente	3.3 %
DNA Elemente	1.5 %
Treffer auf humanem Genom lokalisiert	241 (31 %)
signifikante Treffer (E-Wert < 10^{-5}) auf HSA 19	157 (20 %)

Die durchschnittliche Größe aller Klone beträgt 134 kb. Die durchschnittliche Größe der BAC-Klone beträgt 156 kb (241 mit Größenangabe, 27 ohne Größenangabe), wobei die BAC-Klone zu 94,9 % mit 2 Enden sequenziert wurden. Die durchschnittliche Größe der PAC-Klone beträgt 112 kb (81 mit Größenangabe, 12 ohne Größenangabe), wobei die PAC-Klone zu 93 % mit 2 Enden sequenziert wurden.

5.2.2.2 ZUSAMMENFASSUNG DER REPETITIVEN ELEMENTE

Die repetitiven Elemente wurden tabellarisch zusammengefaßt (Tab. 4). Es ist zu beachten, daß sowohl PACs als auch BACs gesamthaft betrachtet wurden. Die Angabe der SINEs schließt die für Schweine typischen PRE-Elemente mit ein.

Tab. 4: Zusammenfassung der repetitiven Elemente der Klon-Randsequenzen

SINEs:	709	123.512 bp	23.06 %
MIRs	74	8.622 bp	1.61 %
LINEs:	246	64.682 bp	12.07 %
LINE1	199	57.225 bp	10.68 %
LINE2	45	7.194 bp	1.34 %
L3/CR1	2	263 bp	0.05 %
LTR Elemente:	66	17.579 bp	3.28 %
MaLRs	38	9.515 bp	1.78 %
ERV1	15	4.026 bp	0.75 %
ERV_class1	13	4.038 bp	0.75 %
DNA Elemente:	52	8.221 bp	1.53 %
MER1_type	39	5.541 bp	1.03 %
MER2_type	8	2.060 bp	0.38 %
ges. eingestreute Wiederholungen		213.994 bp	39.95 %
kleine RNA:	9	598 bp	0.11 %
Satelliten:	1	345 bp	0.06 %
einfache Wiederholungen:	92	3.678 bp	0.69 %
Wiederholungen geringer Komplexizität:	72	2.916 bp	0.54 %

Ein 345 bp langer Satellit ist identifiziert (PAC-Klon TAIGP714E19167, SP6-Seite) und bei der EMBL-Datenbank hinterlegt (Acc. No. AJ514503) worden.

5.3 Verifizierung des Contig-Assembly

Es wurde ein BAC/PAC-Contig der chromosomalen Region SSC 6q1.2 erstellt, um eine detaillierte physikalische Karte dieser Region zwischen den Genen *GPI* und *LIPE* zu konstruieren.

Hierfür wurden die porcine PAC-Genbank TAIGP714 und die porcine BAC-Genbank RPCI-44 zunächst initial mit von humanen Genen auf HSA 19q13.1 abgeleiteten Proben durchmustert. Später wurde mit den Endsequenzen der isolierten Klone weitergearbeitet.

Für die Durchmusterung der BAC- und der PAC-Genbank wurden insgesamt 61 STS Marker aus den orthologen Genen der syntänischen Region auf HSA 19q13 und 157 STS Marker aus den nicht-repetitiven Randsequenzen isolierter Contig-Klone verwendet.

5.3.1 Verifizierung durch RH-Kartierung

Die klonbasierte physikalische Kartierung wurde durch Radiation Hybrid (RH) Kartierung von ausgewählten STS-Markern auf zwei verschiedenen RH-Panels überprüft und bestätigt:

Das 7.000 rad-Panel diente zur Überprüfung der korrekten chromosomalen Lokalisation auf SSC 6, während das 12.000 rad IMpRH2-Panel genutzt wurde, um die Reihenfolge und Orientierung der einzelnen Subcontigs zu überprüfen. Die Genreihenfolge beim Schwein in der Region auf SSC 6q1.2 stimmte vollkommen mit der Genreihenfolge beim Menschen auf HSA 19q13 überein.

Der entscheidende Vorteil für den Benutzer des IMpRH Panels ist die Internet-gestützte Kartierungssoftware, die die chromosomale Lokalisation des Markers und seine Position in Bezug auf bekannte Marker angibt. Mit dem IMpRH-Panel erreicht man allerdings nur eine sehr grobe Kartierung. Mit dem IMpRH2-Panel dagegen erhält man eine sehr feine Kartierung, jedoch wird eine hohe Markerdichte benötigt.

Die klonbasierte physikalische Karte konnte in der RH-Karte des Schweinegenoms verankert werden, da eine Analyse der STS-Marker aus der Contig-Karte auf dem IMpRH-Panel vorgenommen wurde. Im Ganzen konnten 20 RH-Ergebnisse an die porcine IMpRH RH-Kartierungsdatenbank übermittelt werden (<http://imprh.toulouse.inra.fr>; Martins-Wess *et al.*, 2003).

5.3.2 Verifizierung durch BLAST-Analysen

Insgesamt wurden 777 Endsequenzen von BAC- und PAC-Klonen generiert und bei der EMBL-Datenbank unter den Accession Nummern AJ514457-AJ514832, AJ560805-AJ561041, AJ561044-AJ561089 und AJ745929-AJ746046 hinterlegt.

Von den 777 Sequenzen waren 564 BAC-Sequenzen und 213 PAC-Sequenzen. Es wurden 393 SP6-Enden und 384 T7-Enden sequenziert.

Insgesamt wurden fast 536 kbp genomische Sequenz mit einer durchschnittlichen Sequenzlänge von 689 bp generiert. Die BAC- und PAC-Sequenzen betragen ungefähr 15 % der betrachteten Genomregion. Der durchschnittliche G/C-Gehalt beträgt 46,7 %.

Die BAC- und PAC-Endsequenzen wurden mittels BLAST-Suche mit der Referenz-Sequenz des humanen Genoms verglichen. Bewertet wurden nur signifikante Treffer auf dem humanen Chromosom 19 mit einem E-Wert von $< 10^{-5}$.

Das Beispiel eines BLAST-Hits einer BES zum Humangenom wird in der folgenden Abbildung (Abb. 3) exemplarisch dargestellt:

RID: 1045763132-029924-18675 ← Ergebnisidentitätsnummer

Query= RP44-521D11, T7
Sus scrofa GSS, BAC clone ← ANGABE DER IDENTITÄT DER ZU VERGLEICHENDEN SEQUENZ

SIGNIFIKANTER ERWARTUNGSWERT, DA KLEINER 10^{-5}
BEWERTUNG DES VERGLEICHS

Sequences	producing	significant	alignments:
Score (bits)	E Value
gj 30577965 emb AJ560936.1 SSC560936	Homo sapiens chr 19	699	0.0

DIE IDENTITÄT DER ÜBEREINSTIMMENDEN SEQUENZ WIRD IM FORMAT DATENBANK/ZUGRIFFSNUMMER/IDENTITÄTSNUMMER ANGEGEBEN

>ref|NC_000019.8|NC_000019 Homo sapiens chromosome 19, complete sequence
Length = 63811651

IDENTITÄT DES ERSTEN BEREITS O.G. TREFFERS, JETZT MIT SCORE, ORIENTIERUNG SOWIE VERGLEICH DER FRAGLICHEN SEQUENZ MIT DEM DATENBANKEINTRAG

```

Query: 1      agtatgaagtctttgatgtcgcagtaagggtgtgtacactgcctaaaggtct 50
              |||||
Subject:41523647 agtatgaagtctctgatggcgtgtaagggtgtgtacactgtctaaaggtct 4152360
  
```

Abb. 3: Beispiel eines BLAST-Hits einer BES zum Humangenom

Wichtige Informationen sind in der Abbildung in blauer Schrift erläutert. Die fragliche Sequenz „Query“ (Position 1-50) wird mit dem Datenbankeintrag „Subject“ (S) (Position 41523647-4152360 auf HSA 19) verglichen. Die mittlere Reihe zeigt übereinstimmende Basenpaare „|“ und Positionen fehlender Übereinstimmung „ “.

5.4 Analyse des Gengehalts

Der Contig besteht aus insgesamt 361 Klonen, davon sind 268 BAC-Klone und 93 PAC-Klone. Die Gesamtlänge des Contigs umfaßt 6.2 Mb und kann mit einem minimalen Satz von 49 überlappenden Klonen abgedeckt werden. Die Größe der Klone wurde mittels Pulsfeldgelelektrophorese nach Spaltung mit *NotI* bestimmt.

Von den 777 Sequenzen hatten 241 (31 %) Sequenzen Treffer auf dem menschlichen Genom, davon waren 157 (20 %) signifikante Einzeltreffer (E-Wert < 10^{-5}) auf dem HSA 19q13.1. Diese Treffer korrespondieren gut mit der Klon-Reihenfolge des porcinen

BAC/PAC-Contigs und bestätigen die korrekte Zusammensetzung. Die physikalische Kartierung konnte sowohl durch die aus der Contig-Zusammensetzung resultierenden Informationen als auch mit dem Wissen um die BAC/PAC-Insertgrößen und den Klon-Überlapp stark verfeinert werden.

Bei der Konstruktion des Contigs wurden drei Techniken angewendet, um porcine Gene auf dem Contig zu identifizieren und zu lokalisieren:

- (1) Es wurden heterologe Primer von cDNA-Sequenzen humaner Gene entwickelt, um die porcinen Orthologe durch die Kartierung der sequence tagged sites (STS) zu lokalisieren. In den Fällen, wo orthologe porcine ESTs von humanen Genen vom HSA 19q13.1 verfügbar waren, wurde die genomische Struktur des porcinen Gens vom humanen Ortholog rückgeschlossen und Primer für die genomische PCR von der porcinen EST-Sequenz entwickelt.
- (2) Einige Gene konnten durch die Hybridisierung von humanen cDNA-Proben auf Membranen mit porciner BAC/PAC-DNA lokalisiert werden.
- (3) In einigen Fällen deckte die BLAST-Suche mit den Endsequenzen der BAC- und PAC-Klone die Anwesenheit von Exons in der Endsequenz auf. Die korrespondierenden Gene konnten auf dem Contig *in silico* lokalisiert werden.

Mit diesen drei Techniken konnten 65 Gene auf dem Contig zugeordnet werden.

5.5 Erstellung einer integrierten Karte des Contigs

5.5.1 Kartierte Mikrosatelliten-Marker

Eine STS-Gehalt Analyse aller Klone auf dem BAC/PAC-Contig ergab, daß zwei kürzlich beschriebene porcine Mikrosatelliten (HAL, SW193) auf dem Contig lokalisiert sind. Die präzise Zuordnung dieser Mikrosatelliten ist wichtig für zukünftige QTL-Studien mit diesen Markern, da nun ihre Position im Hinblick auf kodierende Gene bekannt ist.

Zusätzlich sind mehrere neue Mikrosatelliten während dieser Studie in den BAC- und PAC-Endsequenzen gefunden worden. Für vier dieser Mikrosatelliten (L105_MS, NEUD4_MS, PAK4_MS, CD79A_MS) konnten flankierende Primer entwickelt und auf 7 Würfeln der MARC Schweine-Referenz-Population genotypisiert werden. Die Marker sind in die Kopplungskarte des SSC 6 eingebaut worden, wobei die genetische Kartierung mit der physikalischen Kartierung übereinstimmt (Abb. 5).

Die Rekombinationsfrequenz in der untersuchten Region kann nicht zuverlässig geschätzt werden, da bei den beiden Markergruppen mit einem Mittel von 86 Meiosen für sechs physikalisch kartierte Mikrosatelliten nur zwei Rekombinationen beobachtet wurden. Eine zuverlässigere Rekombinationsfrequenz erhielte man, wenn man das

Intervall zwischen SW1067 und SW193 nimmt, die 4.6 cM auf der genetischen und 255 cR₇₀₀₀ auf der aktuellen RH Rahmenkarte voneinander entfernt sind. Legt man eine Rate von 20 kb/cR₇₀₀₀ (Martins-Wess *et al.*, 2003) zugrunde, würde dies bedeuten, daß SW1067 und SW193 ungefähr 5.1 Mb voneinander entfernt sind und daß die Rekombinationsfrequenz 0,9 cM/Mb betragen würde.

5.5.2 Nicht kartierte Mikrosatelliten-Marker

Die folgenden Klone (Tab. 5) weisen nicht genotypisierte Mikrosatelliten-Marker auf, die nicht weiter untersucht und bearbeitet wurden.

Tab. 5: Nicht genotypisierte Mikrosatelliten

Nr.	Klon	Acc No	T7	Sp6
1	RP44-64D14	AJ561029	(CA) ₁₅	
2	RP44-116F14	AJ560960	(TA) ₁₅ CA (TA) ₆	
3	RP44-133A22	AJ560966	(GA) ₁₀	
4	RP44-133I22	AJ560968	(GA) ₈	
5	RP44-168L7	AJ560980	(TA) ₂₀ CA (TA) ₅	
6	RP44-176E23	AJ745961		(ATC) ₆
7	RP44-192K2	AJ560985		(TC) ₇
8	RP44-229J2	AJ745976	(TA) ₂₀ CA (TA) ₅	
9	RP44-245K13	AJ745943	(GA) ₅	
10	RP44-265H15	AJ745978	(CA) ₁₀	
11	RP44-268I17	AJ745944	(TG) ₁₈	
12	RP44-268I17	AJ745945		(CA) ₁₈
13	RP44-284C19	AJ745983	(GT) ₂₁	
14	RP44-284C19	AJ745984		(ATAG) ₄
15	RP44-302B9	AJ745985		(CA) ₅
16	RP44-312M5	AJ745991	(TA) ₅	
17	RP44-321F3	AJ745995	[(A) ₆ C] ₄	
18	RP44-433B4	AJ746025	[(T) ₃ GA] ₄	
19	RP44-472A8	AJ746030		(AT) ₁₅
20	RP44-484F10	AJ561081		(CA) ₅
21	RP44-493I4	AJ514671		(GA) ₁₃
22	RP44-80L6	AJ561036		(GA) ₇ GG (GA) ₁₃

5.6 Vergleichende Genkartierung

Die Reihenfolge der 65 auf SSC 6q1.2 lokalisierten Gene stimmt mit der Genreihenfolge auf der NCBI-Karte des humanen Chromosoms 19 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/build/35/version/1>) überein (Abb. 4).

Diese derzeit aktuellste Karte (Stand November 2004) zeigt 264 Genloci in dem Intervall zwischen *GPI* und *LIPE*. Die physikalische Größe der untersuchten Region auf dem porcinen SSC 6q1.2 ist um circa 2 Mb kleiner als die syntänische Region auf HSA 19q13.1 (6.2 Mb vs. 8.2 Mb).

Im humanen Genom ist der Abstand in der gen-armen Region zwischen *COX7A1* und *NYD-SP11* ungefähr 300 kb größer als beim Schwein. Ein weiterer signifikanter Unterschied ist in der Region zwischen den Genen *BCKDHA* und *ARHGEF1* zu beobachten. In dieser Region sind im menschlichen Genom die gruppierten Familienmitglieder der sechs karzino-embryonischen antigen-verwandten Zelladhäsionsmolekül-Gene (*CEACAMP3*, *CEACAM4*, *CEACAM7*, *CEACAM5*, *CEACAM6*, *CEACAM3*) beherbergt. Die beim Schwein um circa 400 kb kleinere Region kann ein Indiz dafür sein, daß diese Genfamilie beim Menschen größer ist als beim Schwein.

Eine hochkonservierte Genreihenfolge wurde auch bei Maus und Ratte festgestellt. Die zum Zeitpunkt der Untersuchung aktuelle NCBI-Karte des murinen Chromosoms 7 (build 32) zeigt eine identisch invertierte Reihenfolge der Gene *GPI-BCKDHA* im Hinblick auf Mensch und Schwein (Martins-Wess *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu ist bei der Maus das Segment zwischen den Genen *ARHGEF1* und *LIPE* so angeordnet wie bei Mensch und Schwein. Dies kommt einem internen Rearrangement innerhalb eines konservierten syntänischen Blockes gleich. Das gleiche Phänomen kann beim Rattenchromosom 1 beobachtet werden, welches eine komplette Konservierung zu MMU 7 in dieser Region zeigt. Aktuelle RH-Daten vom Rind zeigen, daß Teile des BTA 18 homolog zur untersuchten Region dieser Studie sind (Goldammer *et al.*, 2002). Allerdings weist die vorausgesagte Gen-Reihenfolge beim Rind (*UBA2-GPI-COX6B-CAPN4-POL2R1-GMFG-BLVRP-MIA-PAFAH1B3-LIPE-BCKDHA-AXL*) keine gute Übereinstimmung mit anderen Säuger-Spezies auf, was auf mehrere chromosomale Rearrangements beim Rind und/ oder Ungereimtheiten bei der bovinen RH-Karte schließen läßt.

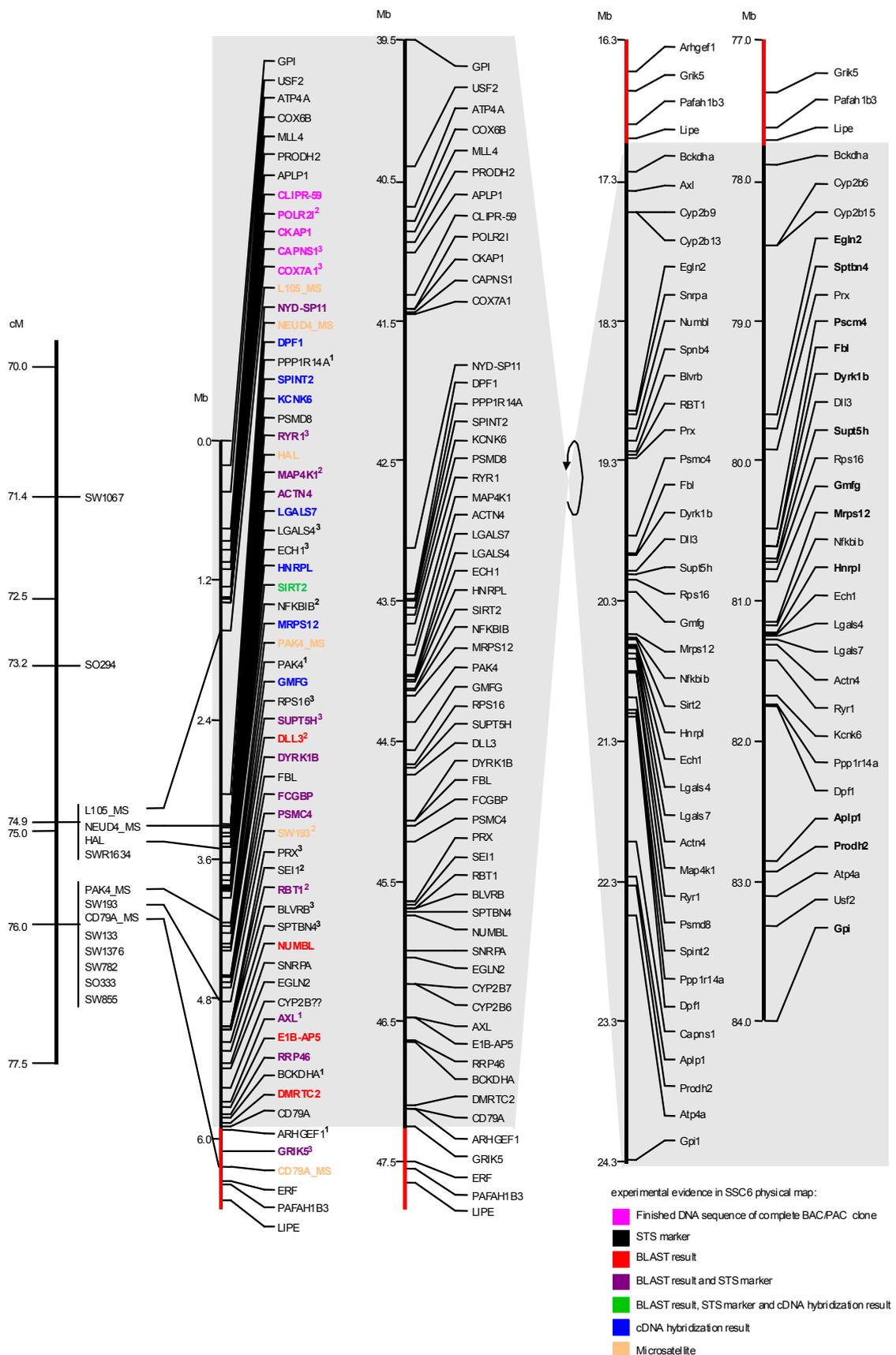


Abb. 4: Vergleichende Kartierung von 65 Gen-assoziierten Markern, die beim Schwein (*Sus scrofa*) -Ergebnisse dieser Arbeit-, beim Menschen (*Homo sapiens*, NCBI build 35 version 1), bei der Maus (*Mus musculus*, NCBI build 32) und bei der Ratte (*Rattus norvegicus*, NCBI RNO 1) verwendet wurden. Die Größe des aufgeklärten Gesamt-Contigs beträgt 6.2 Mb. Die fett gedruckten Namen in der Karte der Ratte kennzeichnen computer-vorausgesagte Gene, die entweder einem murinen oder einem humanen Gen ähneln.

Der experimentelle Beweis für die Zuordnung der porcinen Gene wird durch die unterschiedliche Farbgebung in der Legende angezeigt. Für einen der porcinen STS Marker in der Region des CYP2B Gen-Clusters konnte der exakte Name des porcinen orthologen Gens nicht bestimmt werden, daher wurde der Marker "CYP2B??" genannt.

Die beiden Nager-Spezies Maus und Ratte zeigen eine Inversion der Gene *Arhgef1* – *Lipe* hinsichtlich des Segmentes *Gpi* – *Bckdha*.

Es ist bemerkenswert, daß eine komplette Konservierung der Gen-Reihenfolge innerhalb des gesamten 6.2 Mb großen Intervalls zwischen Schwein und Mensch besteht.

Die Daten der porcinen physikalischen Kartierung hinsichtlich der Gen-Reihenfolge auf SSC 6q1.2 sind zusätzlich in die genetische Karte dieser Region integriert worden.

Die physikalisch zugeordneten Mikrosatelliten sind neben der Gen-Karte dargestellt. Detaillierte Informationen über die Mikrosatelliten-Marker können unter <http://www.marc.usda.gov/> eingesehen werden.

5.7 Identifizierung und Isolierung eines genhaltigen PAC-Klons

Der PAC-Klon TAIGP714M17141 (ursprünglicher Name IVMP714G09A181) wurde im Rahmen der Contig-Erstellung identifiziert und erhält die vollständigen Gene *COX7A1*, *CKAP1*, *POL2RI* sowie *CAPNS1*. Zusätzlich enthielt der Klon ein vom Computer vorhergesagtes „*Orphan Gen*“, ein partielles Zinkfinger-Gen und die ersten beiden Exons des *CLIPR-59* Gens. Die chromosomale Lokalisation wurde durch FISH auf SSC 6q1.1→q1.2 vorgenommen.

Da die beiden Gene *COX7A1* und *CAPNS1* muskelspezifisch exprimiert werden und *COX7A1* darüberhinaus am Energiestoffwechsel beteiligt ist, wurden diese beiden Gene als potentielle Kandidaten für Muskelmerkmale angesehen und vollständig sequenziert. Die Ergebnisse hinsichtlich des *COX7A1* Gens und des *CAPNS1* Gens werden im folgenden dargestellt.

5.7.1 Das COX7A1 Gen

Das *COX7A1* Gen kodiert eine herz- und muskel-spezifische Isoform der VIIA-Untereinheit der Cytochrom C Oxidase.

Um herauszufinden, ob verschiedene Allele des porcinen *COX7A1* Gens existieren und ob diese für muskelspezifische Effekte verantwortlich sein könnten, wurden die Exons mit den flankierenden Regionen von 16 DNAs unterschiedlicher Schweine sequenziert.

Die Tiere wurden aus genetisch diversen Zuchten genommen. In dieser Untersuchung ist DNA von Piétrain-Zuchtschweinen mit allen drei unterschiedlichen *RYR1* Genotypen eingesetzt worden.

Die Charakterisierung des porcinen *COX7A1* Gens enthüllte im Hinblick auf die anderen Säugerorthologe von *COX7A1* eine hoch konservierte Organisation. Das *COX7A1* Gen zeigte bei 16 Schweinen 7 unterschiedlicher Rassen (Piétrain, Duroc, Deutsche Landrasse, Meishan, Bentheimer, Large White, Black Pied) keine Variation.

Die DNA-Sequenz eines 11.085 bp großen genomischen Fragmentes, welches das komplette *COX7A1* Gen enthielt, wurde bestimmt und in der EMBL Nucleotid Sequenzdatenbank unter der Accession Nummer AJ410870 hinterlegt. Die genomische Struktur des porcinen *COX7A1* Gens wurde durch den Vergleich mit der orthologen humanen und bovinen Sequenz des *COX7A1* Gens bestimmt. Das porcine *COX7A1* Gen ist ungefähr 1.5 kb lang, kodiert ein aus 80 Aminosäuren bestehendes Peptid und besteht aus vier eng benachbarten Exons mit Exon/Intron Grenzen, die dem GT/AG-Gesetz perfekt folgen (Tab. 6). Der Transkriptionsstartpunkt konnte durch einen Vergleich mit der homologen bovinen Sequenz zugewiesen werden. Basierend auf diesem Transkriptionsstartpunkt, besteht die porcine *COX7A1* cDNA aus einer 46 bp 5'-UTR, einem 243 bp langen ORF und einer ungefähr 50 bis 60 bp 3'-UTR, abhängig von der exakten Lokalisierung der Polyadenylierungsstelle. Ein kanonisches Polyadenylierungssignal AATAAA ist 39 bp stromabwärts des Stop-Codons vorhanden.

Die genomische Region um das *COX7A1* Gen zeigte einen hohen GC-Gehalt und enthält viele eingefügte Wiederholungen. In den untersuchten 11.085 bp betrug der durchschnittliche GC-Gehalt 52.3 % und ungefähr 50 % der DNA enthielt repetitive Sequenzen. Der hohe Gehalt repetitiver Sequenzen erlaubte eine provisorische Zuteilung des Promoterelementes des porcinen *COX7A1* Gens für die dem Transkriptionsstart direkt folgenden 750 bp. Diese Region wurde nicht von repetitiven Elementen unterbrochen und enthielt 9 E-Box-Motive (CANNTG), welche als Bindungsstellen für MyoD-Transkriptionsfaktoren benutzt werden könnten. Außerdem war eine vermeintliche MEF2 Bindungsstelle 230 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes lokalisiert. Vielen anderen muskel-spezifischen Promotoren von Säugern ähnlich, enthielt diese Region weder eine TATA Box noch eine CAAT Box. Die 750 bp große Region ist mäßig GC-reich (54.3 %) und weist ein CpG_{obs}/CpG_{exp} Verhältnis von 0.76 auf. Dies ließ auf die Präsenz einer CpG-Insel schließen. Die nächsten 5 kb weiter stromaufwärts der vermeintlichen Promotor-Region waren fast vollständig aus repetitiven Elementen zusammengesetzt, was es unwahrscheinlich werden läßt, daß der cis-agierende Promotor des porcinen *COX7A1* Gens sich weiter als in der oben erwähnten 750 bp großen Region stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes erstreckt.

Das von dem porcinen *COX7A1* Gen kodierte Protein besteht aus 80 Aminosäuren und war den orthologen bovinen, murinen und humanen Proteinen zu 93 %, 85 % und 83 % identisch. Es ist zu bemerken, daß die Homologie des humanen *COX7A1* Peptides, bestehend aus nur 79 Aminosäuren, kleiner ist als das murine *COX7A1* Peptid, welches aus 80 Aminosäuren ebenso wie das porcine und das bovine Peptid aufgebaut ist.

Tab. 6: Exon/Intron-Grenzen des porcinen *COX7A1* Gens

3'-Spleißakzeptor	Exon	5'-Spleißdonor	Intron Phase	Intron Größe
-46 gggcaccgtgtgtcc	15 TTGGGC (Exon 1, 61 bp)	CTGCGG	0	681 bp
16 accccgccccacag	102 GTCTCC (Exon 2, 87 bp)	TTCCAG	0	137 bp
103 tcccccaacatccag	187 GCGGAC (Exon 3, 85 bp)	TGGGGG	1	352 bp
188 acactccctccctag	282 GCACTG (Exon 4, >95 bp)	CAAGCATCAATAAA		

Die Exon-Sequenzen sind in Großbuchstaben wiedergegeben, die Intron-Sequenzen in Kleinbuchstaben. Untranslatierte Regionen sind kursiv gedruckt. Die konservierten GT/AG Exon/Intron-Übergänge sind fettgedruckt. Bei dem ersten Exon ist der auf der Homologie zum bovinen *COX7A1* Gen basierende vermutete Transkriptionsstart anstelle des 3'-Spleißakzeptors gezeigt. Bei dem letzten Exon ist statt der Exon/Intron-Grenze das Polyadenylierungssignal unterstrichen dargestellt.

Der Vergleich der individuellen DNA-Sequenzen zeigte auf, daß die *COX7A1* Gene zwischen den verschiedenen Tieren identisch waren und kein Polymorphismus entdeckt werden konnte.

5.7.2 Das *CAPNS1* Gen

Das *CAPNS1* Gen kodiert die kleine Untereinheit der Calpain-Proteasen.

Um herauszufinden, ob es unterschiedliche Allele des porcinen *CAPNS1* Gens in der Schweinepopulation gibt, wurden alle *CAPNS1* Exons samt flankierender Regionen von 16 verschiedenen Schweinen sequenziert. Es wurde DNA von den gleichen Tieren wie bei der *COX7A1* Mutationsanalyse eingesetzt.

Die Klonierung und Charakterisierung des porcinen *CAPNS1* Gens deckte eine hochkonservierte Organisation zu anderen *CAPNS1* Orthologen von Säugern auf. Durch den Vergleich dieser porcinen genomischen DNA-Sequenz mit der porcinen *CAPNS1* cDNA konnte die genomische Organisation des porcinen *CAPNS1* Gens bestimmt werden. Das porcine Gen besteht aus 11 eng benachbarten Exons mit Exon/Intron-Grenzen, die der hochkonservierten GT/AG-Regel streng folgen (Tab. 7). Das *CAPNS1* Gen überspannt ungefähr 7.3 kb und kodiert für ein Peptid aus 266 Aminosäuren. Der *CAPNS1* offene Leserahmen (ORF) ist in den Exons 2-11 enthalten und enthält selbst

801 Nucleotide, die für ein Protein aus 226 Aminosäuren kodieren, welches 97 % Ähnlichkeit mit dem menschlichen CAPNS1 Protein aufweist.

Das *CAPNS1* Gen hat einen GC-Gehalt von 55,8 % und liegt damit über dem durchschnittlichen Säugergehalt von 42 %. Folgerichtig bei dem hohen GC-Gehalt waren tatsächlich drei CpG-Inseln (Gardiner-Garden und Frommer, 1987) zu finden, die mit dem *CAPNS1* Gen assoziiert sind. Die ausgedehnteste CpG-Insel ist in der Region des Promotors und des ersten Exons des *CAPNS1* Gens zu finden. Innerhalb der GC-reichen Promotorregion (64 % GC über 500 bp) ist ein TATA-Box ähnliches Sequenzmotiv TTTTAATA ungefähr 60 Nucleotide stromaufwärts des 5`-Endes bei der derzeit längsten *CAPNS1* cDNA vorhanden. Dieses Sequenzelement ist im Hinblick auf Mensch und Maus nicht sehr gut konserviert. Es ist unklar, ob es eine funktionelle TATA-Box repräsentiert. Am 3`-Ende des *CAPNS1* Gens ist 462 Nucleotide stromabwärts des Stop Codons das kanonische Polyadenylierungssignal AATAAA lokalisiert.

Tab. 7: Exon/Intron-Grenzen des porcinen *CAPNS1* Gens

3`-Spleißakzeptor	Exon	5`-Spleißdonor	IP	IG
		-19		
... (exon 1,	>97 bp)	... GAGGCGgtgagcgcccagtc		846 bp
		203		
ttttctccccctcagGAATCT ... (exon 2,	221 bp)	... CATCAGgtaaggcggggcctg	2	907 bp
		237		
cccgtttcccttcagTGC GGC ... (exon 3,	34 bp)	... CCCCCGgtaagccgccttcg	0	303 bp
		327		
ctcctccttctgcagCCCCCT ... (exon 4,	90 bp)	... GGAGATgtaagtaacctgggg	0	154 bp
		385		
aacttttccccctcagGACATG ... (exon 5,	58 bp)	... CCCGACgtgagtgctccggcgt	1	97 bp
		450		
acctgttccccacagACCCTG ... (exon 6,	65 bp)	... ATGGATgtatccttgagggca	0	813 bp
		519		
acaccctcctgccagAGTGAC ... (exon 7,	69 bp)	... TGGCAGgtgtgtgcggcctct	0	98 bp
		598		
ctcttggtccccacagGCCATA ... (exon 8,	79 bp)	... CCGCAGgtgtggaatgtggtg	1	114 bp
		715		
atcaattgtttctcagGATTCC ... (exon 9,	117 bp)	... TGTTCcgtgagtgacaccca	1	1833bp
		774		
ccttcttttctccagGTGCCT ... (exon 10,	59 bp)	... CAGGAGgtaagaaccctgtc	0	678 bp
		1268		
ccctcctctccccagTGGCTG ... (exon 11,	>494 bp)	... CCAGGAGGAAATAATGCACC		

Exon-Sequenzen sind in Großbuchstaben dargestellt, und Intron-Sequenzen sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Untranslatierte Bereiche sind kursiv dargestellt. Die konservierten GT/AG Exon/Intron-Grenzen sind fettgedruckt. Im letzten Exon ist statt der Exon/Intron-Grenze die Polyadenylierungsstelle unterstrichen dargestellt. +1 korrespondiert mit dem Adenin der Translationsinitiationscodons ATG; IP Intron Phase, IG Intron Größe.

Der Vergleich der individuellen DNA-Sequenzen deckte 10 polymorphe Stellen auf (Tab. 8). Die Analyse der natürlicherweise auftretenden Variation des *CAPNS1* Gen in unterschiedlichen Schweinezüchtungen brachte sechs SNPs und vier kleine Insertions-/Deletions-Polymorphismen zum Vorschein.

Interessant ist die Beobachtung, daß in einem Piétrain-Schwein 12 bp von Exon 2 auf beiden Allelen deletiert waren. Bei allen anderen Tieren waren zwei identische Kopien dieser 12 bp langen Sequenz vorhanden, während in besagtem Piétrain-Schwein nur eine Kopie des 12 bp Elementes vorhanden war. Diese DNA Variation führt zu einer Deletion von vier Glycin-Resten eines Poly-Glycin-Stranges, der normalerweise 18 aufeinanderfolgende Glycin-Reste enthält. Es ist noch unklar, ob dieser Polymorphismus eine funktionelle Konsequenz hat. Erwähnenswert ist allerdings die Tatsache, daß die Länge dieses Poly-Glycin-Stranges bei verschiedenen Spezies zwischen 16 Wiederholungen beim Rind bis hin zu 20 Wiederholungen beim Menschen variiert. Bei Nagern und Kaninchen ist dieser Poly-Glycin-Strang von einem oder zwei anderen Resten unterbrochen. Die Variabilität dieses Poly-Glycin-Stranges bei unterschiedlichen Säugetieren kann ein Indiz dafür sein, daß der beim Schwein beobachtete Polymorphismus eine neutrale Mutation ist.

Tab. 8: Nucleotid-Polymorphismen im porcinen *CAPNS1* Gen

Lokalisation der polymorphen Stelle	Position ^{a)}	cDNA Position	Nucleotid Polymorphismus	AS Substitution
Exon 1 (5'-UTR)	b)	-148	insC	
Intron 1	14		C→G	
Intron 1	27		delC	
Exon 2	137 - 148	+124 bis +135	delGGCGGCGGTGGC	del⁴²⁻⁴⁵GGGG
Intron 4	39		C→T	
Intron 4	67 - 72		delGTGTAC	
Exon 6	44	+429	A→C	still
Intron 7	9		G→A	
Exon 11 (3'-UTR)	142	+916	C→T	
Exon 11 (3'-UTR)	290	+1064	A→T	

^a Numerierung bezieht sich auf die Position des polymorphen Nucleotids innerhalb des angegebenen Exons oder Introns.

^b Transkriptionsstartpunkt ist noch nicht definiert, daher kann die Position der polymorphen Stelle im Hinblick auf das beginnende Exon 1 nicht angegeben werden. Es ist 130 Nucleotide stromaufwärts vom Ende des Exons lokalisiert.

Der SNP in Exon 6 weist die gleichmäßigste Allel-Verteilung des beobachteten Polymorphismusses auf (53 % C, 47 % A). Dieser SNP könnte daher als nützlicher Marker in zukünftigen Kopplungsanalysen dienen.

6 Diskussion

6.1 Erstellung des Contigs

Es wurde eine dichte physikalische Karte mit überlappenden BAC- und PAC-Klonen durch die Durchmusterung der porcinen TAIGP714 PAC-Bank (Al-Bayati *et al.*, 1999) und RPCI-44 BAC-Bank (Fahrenkrug *et al.*, 2001) generiert. Dabei wurden heterologe Proben und Primer-Paare aus der gut charakterisierten humanen syntänischen Region auf HSA 19q13 als Startpunkte gewählt. Lücken zwischen den Klonen der Contig-Karte sind durch die „chromosome walking“ Strategie geschlossen worden und die einzelnen kleinen Contigs sind zu einer Gesamt Contig-Karte zusammengefaßt worden. Dazu wurden neue, von nicht-repetitiven Endsequenzen der BAC- und PAC-Klone abgeleitete STS-Marker benutzt.

Die BAC- und PAC-Endsequenzen konnten durch direkte Sequenzierung gewonnen werden. Die Größen der BAC- und PAC-Inserts sind durch Pulsfeldgelelektrophorese bestimmt worden und in die skalierte Contig-Karte eingetragen worden.

Der gesamte zusammengefaßte Contig überspannt die Region zwischen den Genen *GPI* und *LIFE* und besteht aus 361 Klonen, von denen 268 BAC-Klone und 93 PAC-Klone sind. In dem 6.22 Mb großen Contig konnten 65 Gene entweder durch heterologe STSs oder basierend auf BLAST-Ergebnissen von Klon-Endsequenzen identifiziert und lokalisiert werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Zusätzlich konnten 6 computer-vorausgesagte Gene (*LOC*, *KIAA* und *FLJ*) sowie 4 Mikrosatelliten identifiziert und lokalisiert werden.

Die durchschnittliche Größe der PAC-Klone beträgt 112 kb; die der BAC-Klone beträgt 156 kb. Beide Durchschnittsgrößen sind kleiner als die für die TAIGP714 PAC-Klone (120 kb, Al-Bayati *et al.*, 1999) und für die RPCI-44 BAC-Klone (165 kb, Fahrenkrug *et al.*, 2001) erwarteten und angegebenen Größen.

6.2 Sequenz-Vergleich mit den Datenbank-Einträgen

Eine Sequenz in einer Datenbank zu vergleichen, um Ähnlichkeiten zu anderen Sequenzen herauszufinden, ist eines der gängigsten und aussagekräftigsten Verfahren in der Bioinformatik. Allerdings ist man gezwungen, mit Annäherungen zu arbeiten, um den Zeitaufwand bei der Suche in vernünftigen Grenzen zu halten. Es gibt viele Programme, die benutzt werden, um eine unbekannte Sequenz mit einer Datenbanksequenz abzugleichen, eines davon ist das BLAST-Programm (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

BLAST sucht mit einem Ansatz, der auf der Übereinstimmung kurzer Sequenzfragmente sowie auf einem leistungsfähigen Statistikmodell beruht, nach den besten lokalen

Übereinstimmungen zwischen der unbekanntenen Sequenz und der Datenbank. Dabei kann BLAST nur kontinuierliche Sequenzen einander zuordnen. Eine Zuordnung, an der Insertionen und Deletionen beteiligt sind, wird als eine Folge von Übereinstimmungen einzelner Fragmente gewertet.

Mittlerweile ist das Programm-Version BLAST 2.2.6 in Gebrauch, die über die Berechnung von „High-Scoring Pairs“ (HSP) zu einem lokalen Abgleich von HSPs nach dem Smith-Waterman-Algorithmus kommt.

6.2.1 Wann ist ein Treffer signifikant ?

Es ist wichtig zu wissen, ob eine Übereinstimmung, die bei der Suche in einer Datenbank gefunden wurde, biologisch signifikant ist oder nicht. Für Vergleiche von Proteinen gilt, daß Sequenzen, die über eine Strecke von mindestens 80 Aminosäuren zu 25 % oder mehr identisch sind, dieselbe Grundfaltung aufweisen sollten. Liegt die Ähnlichkeit darunter, kommt man in eine Grauzone.

Die Statistik gibt als Charakteristikum den „Expectation-value“, den sogenannten E-Wert an. Treffer gelten als signifikant, wenn der E-Wert $< 10^{-5}$ ist. Er beschreibt, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, daß ein Vergleich der angegebenen Qualität zufällig in einer Datenbank dieser Größe zu finden ist. Allerdings ist die Statistik für lokale Vergleiche zuverlässiger als für globale.

6.3 Basenzusammensetzung

Der durchschnittliche GC-Gehalt im humanen Genom beträgt 41 % (Lander *et al.*, 2001), während der durchschnittliche GC-Gehalt des HSA 19 bei 46 % liegt. Die erhaltenen gesamten Sequenzen der BAC- und PAC-Klone des Contigs auf dem orthologen porcinen Chromosom SSC 6q1.2 weisen mit 46,7 % einen diesem Durchschnitt entsprechenden GC-Gehalt auf.

Die Gehalte von LINEs (12 %), SINEs (23 %), LTRs (3 %) und anderen DNA-Elementen (1,5 %) weichen von denen des humanen Genoms (LINE 21 %, SINE 13 %, LTR Elemente 8 % und DNA-Elemente 3%) ab. LINEs sind vornehmlich in BACs, SINEs dagegen sind vornehmlich in PACs zu finden. Das Vorherrschen der SINE-Elemente ist ein typisches Kennzeichen GC-reicher Regionen wie auf dem porcinen Chromosom 6q1.2.

6.4 Diskussion der Methodik

Das PCR-gestützte Durchmusterungsverfahren der PAC-Bank war technisch aufwendig und nur relativ zeitintensiv durchzuführen. Zudem zeigte die PAC-Bank eine insuffiziente

Abdeckung des Genoms. Daher konnten in einigen Regionen keine Klone in der Bank gefunden werden. Dieses Problem sprechen Palazzolo und Mitarbeiter (1991) an. Auf die vorliegende Arbeit bezogen bedeutet dieses, daß einige genomische Regionen nicht in der PAC-Bank vertreten sind. Das mag daran liegen, daß diese Regionen schwierig zu klonieren waren oder daß diese Regionen zufällig nicht kloniert wurden. Zudem ist die TAIGP714 PAC-Bank (Al-Bayati *et al.*, 1999) mit 3.24 haploiden Genom-Äquivalenten deutlich kleiner als die RPCI-44 BAC-Bank (Fahrenkrug *et al.*, 2001) mit 10.2 haploiden Genom-Äquivalenten. Bei dem Zusammenbau des Contigs sind BAC-Klone mit Größen von minimal 40 kb und PAC-Klone mit Größen von minimal 60 kb identifiziert worden. Diese Klone waren beim „chromosome walking“ lediglich von geringem Nutzen.

Ein nicht korrekter Zusammenbau des Contigs hinsichtlich chimärer Klone sollte vermieden werden. Daher sind die neuen, aus den Klon-Endsequenzen entstandenen *sequence tagged sites* (STS), auf ihre korrekte chromosomale Lokalisation mittels eines somatischen Zellhybrid-Panels getestet worden. Im gesamten Contig sind an zwei Stellen chimäre Klone vorhanden.

Die gewählten Methoden zur Konstruktion des Contigs und vergleichenden Analysen sind im Verhältnis zu Arbeitsaufwand, Kosten, Zeit und Erkenntnisgewinn angemessen gewesen, da die ausgewählte Region nicht zu groß war. Allerdings mußte zwischenzeitlich Vorlieb mit einer fehlerbehafteten Karte des humanen Genoms genommen werden.

Für die Herstellung eines ganzen Chromosomen-Contigs wären die hier gewählten Durchmusterungsverfahren (PCR-gestützte Durchmusterung bei der PAC-Bank und radioaktive Hybridisierung bei der BAC-Bank) nicht geeignet gewesen, da bei der Konstruktion von Genom-Contigs zur Zeit fingerprinting-Methoden bevorzugt (Marra *et al.*, 1997) werden. Über die Konstruktion zielgerichteter BAC-Contigs bei Haussäugetieren ist nicht oft berichtet worden. Jeon und Mitarbeiter (2001) berichten über einen 2.4 Mb großen BAC-Contig der porcinen RN Region auf dem porcinen Chromosom 15q. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten wurden mit den Datenbankeinträgen des humanen Genoms verglichen und es besteht eine vollständige Syntänie zwischen HSA 2q35 und dem murinen Chromosom 1.

6.5 RH-Karten

Während der Konstruktion des Contigs wurden viele STS-Marker auf dem somatischen Zellhybrid-Panel (Yerle *et al.*, 1996) getestet, um Probleme mit chimären Klonen zu vermeiden. Die Klon-basierte physikalische Karte wurde in die RH-Karte des Schweinegenoms eingebaut, indem STS-Marker des Contigs auf dem IMpRH-Panel (Yerle *et al.*, 1998) analysiert wurden. Analysen der hochauflösenden IMNpRH2-Karte (Yerle *et al.*, 2002) ermöglichten die Identifikation der Genreihenfolge und der Marker.

Von großem Vorteil war die online-Auswertung der Daten auf dem 7000 rad IMpRH-Panel (Milan *et al.*, 2000). Die Ergebnisse des 12000 rad IMNpRH2-Panels mußten mit zusätzlichen Programmen wie „Carthagene“ analysiert werden (Schiex und Gaspin, 1997). Die Auflösung des IMNpRH2-Panels ist bemerkenswert größer als die des IMpRH-Panels (Demeure *et al.*, 2003).

In der Mehrzahl der bereits erwähnten Untersuchungen wurde die RH-Kartierung zur Konstruktion vergleichender Karten benutzt. Diese Methode ist effizient, sofern ganze oder große Teile von Chromosomen kartiert werden sollen. Bei dem Vergleich relativ kleiner chromosomaler Teile kommt es zu einer ungenügenden Auflösung. Cox und Mitarbeiter (1990) betonen die Tatsache, daß die RH-Kartierung ein statistischer Prozeß ist. Sogar wenn die RH-Karte sorgfältig hergestellt wurde, muß die Anordnung der Marker nicht zwingend richtig sein. Diese Schlußfolgerung wird durch eine Untersuchung von Goldammer und Mitarbeitern (2002) über das bovine Chromosom 18 bestätigt. In Bezug auf ihre Daten weicht die Reihenfolge der Gene auf dem bovinen Chromosom 18 deutlich von der des homologen humanen Chromosoms 19 ab. Da die RH-Kartierung eine statistische Methode ist, seien die Ergebnisse nicht so genau wie die von einem BAC-Contig erhaltenen. Die RH-Karte könne lediglich eine ungefähre Positionsangabe der Gene liefern. Rearrangements zwischen Genen in kleinen Regionen eines Chromosoms können nur durch eine präzise Klonierung dieser Region aufgedeckt werden.

6.6 Muskelspezifische Merkmale des *COX7A1* Gens

Es ist bekannt, daß ein QTL für unterschiedliches Wachstum und Merkmale der Fleischbeschaffenheit auf SSC 6q1.1→1.2 (Paszek *et al.*, 1995) lokalisiert ist. Ein signifikanter Effekt auf diese Merkmale konnte bereits für das *RYS1* Gen, welches in dieser Region lokalisiert ist, festgestellt werden. Es wird vermutet, daß andere eng gekoppelte Genorte ebenfalls ihren Teil zu den beobachteten Effekten auf Wachstum und Fleischbeschaffenheit beitragen. *COX7A1* stellt insofern einen potentiellen Kandidaten dar, als daß es ein muskelspezifisches Peptid kodiert, welches in den zentralen Energiemetabolismus der Muskelzellen eingeschaltet ist.

Ausgehend von diesen Ergebnissen scheint es unwahrscheinlich, daß die innerhalb des porcinen *COX7A1* Gens auftretenden Polymorphismen nicht für den QTL Effekt auf SSC 6q1.1→1.2 verantwortlich sind. Es ist jedoch möglich, daß noch unentdeckte Mutationen in wichtigen regulatorischen Regionen des porcinen *COX7A1* Gens existieren.

6.7 Vergleichende Analyse

Im Humangenom sind insgesamt 264 Gene zwischen dem *GPI* und *LIPE* Gen vorhanden. Von diesen 264 Genen sind 76 vom Computer vorhergesagte Gene (1 *DKFZ*, 3 *KIAA*, 8 *MGC*, 15 *FLJ*, 49 *LOC*) enthalten.

65 von diesen 264 Genen konnten auf dem isolierten Contig beim Schwein experimentell bestätigt werden. Aufgrund der festgestellten konservierten Syntanie zwischen Mensch und Schwein kann davon ausgegangen werden, dass alle oder zumindest ein Großteil der 264 humanen Gene in dem klonierten Contig enthalten sind. Auch andere Studien berichten über die große Homologie zwischen Schweinegenom und Humangenom (Jeon *et al.*, 2001).

In vielen Studien wird über Rearrangements bei einigen Spezies berichtet (Goldammer *et al.*, 2002). Diese Rearrangements können sowohl das Resultat inkompletter Daten des humanen Genomprojektes als auch das Ergebnis großer Markerabstände auf der RH-Karte sein. Schließlich könnten auch Speziesunterschiede eine gewisse Rolle spielen, so scheint die Syntanie zwischen Mensch und Schwein etwas besser als zwischen Mensch und Rind konserviert zu sein.

7 Literaturverzeichnis

Abo A, Qu J, Cammarano MS, Dan C, Fritsch A, Baud V, Belisle B, Minden A (1998) PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J* **17**, 6527-6540.

Al-Bayati HK, Duscher S, Kollers S, Rettenberger G, Fries R, Brenig B (1999) Construction and characterization of a porcine P1-derived artificial chromosome (PAC) library covering 3.2 genome equivalents and cytogenetical assignment of six type I and type II loci. *Mamm Genome* **10**, 569-572.

Alexander LJ, Rohrer GA, Beattie CW (1996) Cloning and characterization of 414 polymorphic porcine microsatellites. *Anim Genet* **27**, 137-148.

Alexander LJ, Smith TPL, Beattie CW, Broom MF (1997) Construction and characterization of a large insert porcine YAC library. *Mamm Genome* **8**, 50-51.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-3402.

Anderson SI, Lopez-Corrales NL, Gorick B, Archibald AL (2000) A large-fragment porcine genomic library resource in a BAC vector. *Mamm Genome* **11**, 811-814.

Archibald AF (1994) Mapping of the pig genome. *Curr Opin Genet Develop* **4**, 395-400.

Archibald AL, Haley CS, Brown JF, Couperwhite S, McQueen HA, Nicholson D, Coppieters W, Van de Weghe A, Stratil A, Wintero AK, *et al.* (1995) The PigMap consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mamm Genome* **6**, 157-175.

Arnaudo E, Hirano M, Seelan RS, Milatovich A, Hsieh C, Fabrizi GM, Grossman LI, Francke U, Schon EA (1992) Tissue-specific expression and chromosome assignment of genes specifying two isoforms of subunit VIIa of human cytochrome c oxidase. *Gene* **119**, 299-305.

Arnold N, Seibl R, Kessel C, Wienberg J (1992) Nonradioactive in situ hybridization with digoxigenin labelled DNA probes. *Biotechnic Histochem* **67**, 59-67.

Arthur JS, Elce JS, Hegadorn C, Williams K, Greer PA (2000) Disruption of the murine calpain small subunit gene, *Capn4*: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division. *Mol Cell Biol* **20**, 4474-4481.

Arthur JS, Greer PA, Elce JS (1998) Structure of the mouse calpain small subunit gene. *Biochem Biophys Acta* **1388**, 247-252.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K (1995) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons Inc., New York, NY.

Bain M, Mendelson M, Sinclair J (2003) Ets-2 Repressor Factor (ERF) mediates repression of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter in undifferentiated non-permissive cells. *J Gen Virol* **84**, 41-49.

Batra SK, Metzgar RS, Hollingsworth MA (1991) Molecular cloning and sequence analysis of the human ribosomal protein S16. *J Biol Chem* **266**, 6830-6833.

Becker W, Weber Y, Wetzel K, Eirmbter K, Tejedor FJ, Joost HG (1998) Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J Biol Chem* **273**, 25893-25902.

Bidanel JP, Milan D, Iannuccelli N, Amigues Y, Boscher MY, Bourgeois F, Caritez JC, Gruand J, Le Roy P, Lagant H, Quintanilla R, Renard C, Gellin J, Ollivier L, Chevalet C (2001) Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Genet Sel Evol* **33**, 289-309.

- Bosak N, Faraut T, Mikawa S, Uenishi H, Kiuchi S, Hiraiwa H, Hayashi T, Yasue H (2003) Construction of a high-resolution comparative gene map between swine chromosome region 6q11->q21 and human chromosome 19 q-arm by RH mapping of 51 genes. *Cytogenet Genome Res* **102**, 109-115.
- Breen M, Bullerdiek J, Langford CF (1999) The DAPI banded karyotype of the domestic dog (*canis familiaris*) generated using chromosome-specific paint probes. *Chromosome Research* **7**, 401-406.
- Breen M, Thomas R, Binns MM, Carter NP, Langford CF (1999) Reciprocal chromosome painting reveals detailed regions of conserved synteny between the karyotypes of the domestic dog (*canis familiaris*) and human. *Genomics* **61**, 145-155.
- Brem G und Brenig B (1992) Molekulare Genotyp-Diagnostik des malignen Hyperthermie-Syndroms zur effizienten Zucht streßresistenter Schweine. *Wien Tierärztl Mschr* **79**, 301-305.
- Brenig B (1999) Conserved nucleotide differences and subfamily structure of porcine short interspersed elements. *Anim Genet* **30**, 120-125.
- Brenig B, Brem G (1992) Genomic organisation and analysis of the 5' end of the porcine ryanodine receptor gene (*ryr1*). *FEBS Lett* **298**, 277-279.
- Byrem TM, Booren AM, Hill GM, Chu FS, Strasburg GM (1999) The effect of cyclopiazonic acid on the development of pale, soft, and exsudative pork from pigs of defined malignant hyperthermia genotype. *J Anim Sci* **77**, 166-172.
- Campbell EM, Fahrenkrug SC, Vallet JL, Smith TP, Rohrer GA (2001) An updated linkage and comparative map of porcine chromosome 18. *Anim Genet* **32**, 375-379.
- Chang KC, Beuzen ND, Hall AD (2003) Identification of microsatellites in expressed muscle genes: assessment of a desmin (CT) dinucleotide repeat as a marker for meat quality. *Vet J* **165**, 157-163.
- Chaudhary R, Raudsepp T, Guan XY, Zhang H, Chowdhary BP (1998) Zoo-FISH with microdissected arm specific paints for HSA2, 5, 6, 16, and 19 refines known homology with pig and horse chromosomes. *Mamm Genome* **9**, 44-49.
- Cho JM, Song DJ, Bergeron J, Benlimame N, Wold MS, Aloui-Jamali MA (2000) RBT1, a novel transcriptional co-activator, binds the second subunit of replication protein A. *Nucleic Acids Res* **28**, 3478-3485.
- Chowdhary BP, de la Sena C, Harbitz I, Eriksson L und Gustavsson I (1994) Precise localization of the genes for glucose phosphate isomerase (GPI), calcium release channel (CRC), hormone-sensitive lipase (LIPE), and growth hormone (GH) in pigs, using nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **67**, 211-214.
- Chowdhary BP, Harbitz I, Davies W, Gustavsson (1989) Localization of the glucose phosphate isomerase gene to the p12-q21 segment of chromosome 6 in pig by in situ hybridization. *Hereditas* **111**, 73-78.
- Chowdhary BP, Raudsepp T (2001) Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. *Methods Cell Sci* **23**, 37-55.
- Chowdhary BP, Raudsepp T, Fronicke L, Scherthan H (1998) Emerging patterns of comparative genome organization in some mammalian species as revealed by Zoo-FISH. *Genome Res* **8**, 577-589.
- Chuang JL, Cox RP, Chuang DT (1993) Characterization of the promoter-regulatory region and structural organization of E1 alpha gene (BCKDHA) of human branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex. *J Biol Chem* **268**, 8309-8316.
- Cox DR, Burmeister M, Price ER, Kim S, Myers RM (1990) Radiation Hybrid mapping: a somatic cell genetic method for constructing high-resolution maps of mammalian chromosomes. *Science* **250**, 245-250.
- Danielsen EM, van Deurs B (1997) Galectin-4 and small intestinal brush border enzymes form clusters. *Mol Biol Cell* **8**, 2241-2251.

- Davoli R, Fontanesi L, Zambonelli P, Bigi D, Gellin J, Yerle M, Milc J, Braglia S, Cenci V, Cagnazzo M, Russo V (2002) Isolation of porcine expressed sequence tags for the construction of a first genomic transcript map of the skeletal muscle in pig. *Anim Genet* **33**, 3-18.
- de Koning DJ, Janss LL, Rattink AP, van Oers PA, de Vries BJ, Groenen MA, van der Poel JJ, de Groot PN, Brascamp EW, van Arendonk JA (1999) Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). *Genetics* **152**, 1679-1690.
- de Smet SM, Pauwels H, de Bie S, Demeyer DI, Callewier J, Eeckhout W (1996) Effect of halothane genotype, breed, feed withdrawal, and lairage on pork quality of belgian slaughter pigs. *J Anim Sci* **74**, 1854-1863.
- Deininger PL (1989) SINEs: short interspersed repeated DNA elements in higher eukaryotes. In *Mobile DNA* DE Berg, MM Howe, eds. (Washington, DC: *Am Soc Microbiol*), 619-636.
- Deininger PL, Jolly DJ, Rubin CM, Friedmann T, Schmid CW (1981) Base sequence studies of 300 nucleotide renatured repeated human DNA clones. *J Mol Biol* **151**, 17-33.
- Demeure O, Renard C, Yerle M, Faraut T, Riquet J, Robic A, Schiex T, Rink A, Milan D (2003) Rearranged gene order between pig and human in a QTL region on SSC 7. *Mamm Genome* **14**, 71-80.
- Drögemüller C, Kuiper H, Voß-Nemitz R, Brenig B, Distl O, Leeb T (2001) Molecular characterization and chromosome assignment of the porcine gene COX7A1 coding for the muscle specific cytochrome c oxidase subunit VIIa-M. *Cytogenet Cell Genet* **94**, 190-193.
- Drögemüller C, Leeb T (2002) Molecular characterization of the porcine gene CAPNS1 encoding the small subunit 1 of calpain on SSC 6q1.1→q1.2. *Cytogenet Genome Res* **98**, 206-209.
- Dunham I, Shimizu N, Roe BA, Chissole S, Hunt AR, Collins JE, Bruskievich R, Beare DM, Clamp M, Smink LJ, Ainscough R, Almeida JP, Babbage A, Bagguley C, Bailey J, Barlow K, Bates KN, Beasley O, Bird CP, Blakey S, Bridgeman AM, Buck D, Burgess J, Burrill WD, O'Brien KP (1999) The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* **402**, 489-495.
- Ellsworth RE, Jamison DC, Touchman JW, Chissole SL, Braden Maduro VV, Bouffard GG, Dietrich NL, Beckstrom-Sternberg SM, Iyer LM, Weintraub LA, Cotton M, Courtney L, Edwards J, Maupin R, Ozersky P, Rohlfing T, Wohldmann P, Miner T, Kemp K, Kramer J, Korf I, Pepin K, Antonacci-Fulton L, Fulton RS, Minx P, Hillier LW, Wilson RK, Waterston RH, Miller W, Green ED (2000) Comparative genomic sequence analysis of the human and mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 1172-1177.
- Emori Y, Kawasaki H, Imajoh S, Kawashima S, Suzuki K (1986) Isolation and sequence analysis of cDNA clones for the small subunit of rabbit calcium-dependent protease. *J Biol Chem* **261**, 9472-9476.
- Eppig JT (1996) Comparative maps: adding pieces to the mammalian jigsaw puzzle. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 723-730.
- Eto M, Senba S, Morita F, Yazawa M (1997) Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI17) in smooth muscle: its specific localization in smooth muscle. *FEBS Lett* **410**, 356-60.
- Fahrenkrug SC, Rohrer GA, Freking BA, Smith TP, Oseogawa K, Shu CL, Catanese JJ, de Jong PJ (2001) A porcine BAC library with tenfold genome coverage: a resource for physical and genetic map integration. *Mamm Genome* **12**, 472-474.
- Fischer K, Benz M, Döhner H (1997) Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung. Methodik und Anwendung. *Med Klinik* **92**, 179-283.
- Flaherty L, Herron B (1998) The new kid on the block - a whole genome mouse radiation hybrid panel. *Mamm Genome* **9**, 417-418.
- Fronicke L, Chowdhary BP, Scherthan H, Gustavsson I (1996) A comparative map of the porcine and human genomes demonstrates ZOO-FISH and gene mapping-based chromosomal homologies. *Mamm Genome* **7**, 285-290.

- Fronicke L, Wienberg J (2001) Comparative chromosome painting defines the high rate of karyotype changes between pigs and bovids. *Mamm Genome* **12**, 442-449.
- Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE, O'Brien PJ und MacLennan DH (1991) Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* **253**, 448-451.
- Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) CpG-islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**, 261-282.
- Geldermann H, Müller E, Beeckmann P, Knorr C, Yue G und Moser G (1996) Mapping of quantitative-trait loci by means of marker genes in F2 generations of Wildboar, Pietrain and Meishan pigs. *J Anim Breed Genet* **113**, 381-387.
- Gellin J, Brown S, Marshall Graves JA, Rothschild M, Schook L, Womack J, Yerle M (2000) Comparative gene mapping workshop: progress in agriculturally important animals. *Mamm Genome* **11**, 140-144.
- Genet C, Renard C, Cabau C, Rogel-Gaillard C, Gellin J, Milan D (2001) In the QTL region surrounding porcine MHC, gene order is conserved with human genome. *Mamm Genom* **12**, 246-249.
- Goldammer T, Kata SR, Brunner RM, Dorroch U, Sanftleben H, Schwerin M, Womack JE (2002) A comparative radiation hybrid map of bovine chromosome 18 and homologous chromosomes in human and mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 2106-2111.
- Goureau A, Yerle M, Schmitz A, Riquet J, Milan D, Pinton P, Frelat G, Gellin J (1996) Human and porcine correspondence of chromosome segments using bidirectional chromosome painting. *Genomics* **36**, 252-262.
- Grimm DR, Goldman T, Holley-Shanks R, Buoen L, Mendiola J, Schook LB, Louis C, Rohrer GA und Lunney JK (1997) Mapping of microsatellite markers developed from a flow-sorted swine chromosome 6 library. *Mamm Genome* **8**, 193-199.
- Grindflek E, Szyda J, Liu Z, Lien S (2001) Detection of quantitative trait loci for meat quality in a commercial slaughter pig cross. *Mamm Genome* **12**, 299-302.
- Grossman LI, Seelan RS, Jaradat SA (1998) Transcriptional regulation of mammalian cytochrome c oxidase genes. *Electrophoresis* **19**, 1254-1259.
- Hamasima N, Suzuki H, Morozumi T, Plastow G, Mitsuhashi T (2003) Construction of a new porcine whole-genome framework map using a radiation hybrid panel. *Anim Genet* **34**, 216-220.
- Hamilton DN, Ellis M, Miller KD, McKeith FK, Parrett DF (2000) The effect of the Halothane and Rendement Napole genes on carcass and meat quality characteristics of pigs. *J Anim Sci* **78**, 2862-2867.
- Han CS, Sutherland RD, Jewett PB, Campbell ML, Meincke LJ, Tesmer JG, Mundt MO, Fawcett JJ, Kim UJ, Deaven LL, Doggett NA (2000) Construction of a BAC contig map of chromosome 16q by two-dimensional overgo hybridization. *Genome Res* **10**, 714-721.
- Harbitz I, Langset M, Ege AG, Hoyheim B und Davies W (1999) The porcine hormone-sensitive lipase gene: sequence, structure, polymorphisms and linkage mapping. *Anim Genet* **30**, 10-15.
- Hashimoto M, Yamashita Y, Mori N (2002) Immunohistochemical detection of CD79a expression in precursor T cell lymphoblastic lymphoma/leukaemias. *J Pathol* **197**, 341-347.
- Hawken RJ, Murtaugh J, Flickinger GH, Yerle M, Robic A, Milan D, Gellin J Beattie CW, Schook LB und Alexander LJ (1999) A first-generation porcine whole-genome radiation hybrid map. *Mamm Genome* **10**, 824-830.
- Hawkins JD (1988) A survey on intron and exon lengths. *Nucleic Acids Res* **16**, 9893-9908.
- Heng HH, Squire J, Tsui LC (1992) High-resolution mapping of mammalian genes by in situ hybridization to free chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 9509-9513.

Ioannou PA, Amemiya CT, Ganes J, Kroisel PM, Shizuya H, Chen C, Batzer MA, de Jong PJ (1994) A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet* **6**, 84-89.

Jaradat SA, Ko MSH, Grossman LI (1998) Tissue-specific expression and mapping of the Cox7a1 gene in mouse. *Genomics* **49**, 363-370.

Jeon JT, Amarger V, Rogel-Gaillard C, Robic A, Bongcam-Rudloff E, Paul S, Looft C, Milan D, Chardon P, Andersson L (2001) Comparative analysis of a BAC contig of the porcine RN region and the human transcript map: implications for the cloning of trait loci. *Genomics* **72**, 297-303.

Johansson M, Ellegren H, and Andersson L (1995) Comparative mapping reveals extensive linkage conservation - but with gene order rearrangements - between the pig and the human genomes. *Genomics* **10**, 682-690.

John HA, Birnstiel ML, Jones KW (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* **223**, 582-587.

Jones HB (1997) Estimating physical distances from radiation hybrid mapping data. *Genomics* **43**, 258-266.

Jorgensen CB, Wintero AK, Yerle M, Fredholm M (1997) Mapping of 22 expressed sequence tags isolated from a porcine small intestine cDNA library. *Mamm Genome* **8**, 423-427.

Karhu R, Ahlstedt-Sioni M, Bittner M, Meltzer P, Trent JM, Isola JJ (2001) Chromosome arm-specific Multicolor FISH. *Genes Chromosomes Cancer* **30**, 105-109.

Karnuah AB, Uenishi H, Kiuchi S, Kojima M, Onishi A, Yasue H, Mitsunashi T (2001) Assignment of 64 genes expressed in 28-day-old pig embryo to radiation hybrid map. *Mamm Genome* **12**, 518-523.

Karsenty E, Barillot E, Tosser-Klopp G, Lahbib-Mansais Y, Milan D, Hatey F, Cirera S, Sawera M, Jørgensen CB, Chowdhary B, Fredholm M, Wimmers K, Ponsuksili S, Davoli R, Fontanesi L, Braglia S, Zambonelli P, Bigi D, Neuenschwander S, Gellin J (2003) The GENETPIG database: a tool for comparative mapping in pig (*Sus scrofa*) *Nucleic Acids Res* **31**, 138-141.

Kirkness EF, Bafna V, Halpern AL, Levy S, Remington K, Rusch DB, Delcher AL, Pop M, Wang W, Fraser CM, Venter JC. (2003) The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. *Science* **301**, 1898-903.

Kiuchi S, Inage Y, Hiraiwa H, Uenishi H, Yasue H (2002) Assignment of 280 swine genomic inserts including 31 microsatellites from BAC clones to the swine RH map (ImpRH map). *Mamm Genome* **13**, 80-88.

Knippers R (1997) Lehrbuch "Molekulare Genetik", 7. Auflage, *Thieme Verlag*.

Kozak M (1996) Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm Genome* **7**, 563-574.

Lahbib-Mansais Y, Dalias G, Milan D, Yerle M, Robic A, Gyapay G, Gellin J (1999) A successful strategy for comparative mapping with human ESTs: 65 new regional assignments in the pig. *Mamm Genome* **10**, 145-153.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Showkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A,

Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler GA, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, Szustakowski J, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ; International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.

Leach LM, Ellis M, Sutton DS, McKeith FK und Wilson ER (1996) The growth performance, carcass characteristics, and meat quality of halothane carrier and negative pigs. *J Anim Sci* **74**, 934-943.

Leeb T, Brenig B (1998) Ryanodine receptors and their role in genetic diseases (Review). *Int J Mol Med* **2**, 293-300.

Leeb T, Giese A, Pfeiffer I, Brenig B (1999) Two highly polymorphic microsatellites within the porcine ryanodine receptor 3 gene (*RYR3*). *Anim Genet* **30**, 321-322.

Leeb T, Rettenberger G, Hameister H, Brem G, Brenig B (1995) Construction of a porcine YAC library and mapping of the cardiac muscle ryanodine receptor gene to chromosome 14q22-q23. *Mamm Genome* **6**, 37-41.

Lemieux N, Dutrillaux B, Viegas-Pequignot E (1992) A simple method for simultaneous R- or G-banding and fluorescence in situ hybridization of small single-copy genes. *Cytogenet Cell Genet* **59**, 311-312.

Lenka N, Vijayasathy C, Mullick J, Avadhani NG (1998) Structural organization and transcriptional regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex. *Prog Nucl Acid Res* **61**, 309-344.

Lennon G, Auffray C, Polymeropoulos M, Soares MB (1996) The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* **33**, 151-152.

Li H, Brochu M, Wang SP, Rochdi L, Cote M, Mitchell G, Pallo-Payet N (2002) Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes lipid storage in the adrenal cortex and impaired corticosterone response to corticotropin stimulation. *Endocrinology* **143**, 3333-3340.

Lichter P, Cremer T (1992) Chromosome analysis by non-isotopic in situ hybridization. In "Human Cytogenetics: A practical Approach" IRL Press, Oxford. DE Rooney und BH Czepulkowski, Eds.), 2nd ed., Vol. 1, 157-192,

Lingaas F, Sorensen A, Juneja RK, Johansson S, Fredholm M, Wintero AK, Sampson J, Mellersh C, Curzon A, Holmes NG, Binns MM, Dickens HF, Ryder EJ, Gerlach J, Baumle E, Dolf G (1997) Towards construction of a genomic linkage map: establishment of 16 linkage groups. *Mamm Genome* **8**, 218-221.

Lu Y, Pan ZZ, Devaux Y, Ray P (2003) p21-activated protein kinase 4 (PAK4) interacts with the keratinocyte growth factor receptor and participates in keratinocyte growth factor-mediated inhibition of oxidant-induced cell death. *J Biol Chem* **278**, 10374-10380.

MacLennan DH und Phillips MS (1992) Malignant hyperthermia. *Science* **256**, 789-794.

Marra MA, Kucaba TA, Dietrich NL, Green ED, Brownstein B, Wilson RK, McDonald KM, Hillier LW, McPherson JD, Waterston RH (1997) High throughput fingerprint analysis of large-insert clones. *Genome Res* **7**, 1072-84.

Martins F, Voß-Nemitz R, Drögemüller C, Brenig B, Leeb T (2002) Construction of a 1.2-Mb BAC/PAC contig of the porcine gene RYR1 region on SSC 6q1.2 and comparative analysis with HSA 19q13.13. *Genomics* **80**, 416-422.

Martins-Wess F, Milan D, Drögemüller C, Voß-Nemitz R, Brenig B, Robic A, Yerle M, Leeb T (2003a) A high resolution physical and RH map of pig chromosome 6q1.2 and comparative analysis with human chromosome 19q13.1. *BMC Genomics* **4**, 20.

Martins-Wess F, Rohrer G, Voß-Nemitz R, Drögemüller C, Brenig B, Robic A, Yerle M, Milan D, Leeb T (2003b) Generation of a 5.5 Mb BAC/PAC contig of a pig chromosome 6q1.2 and its integration with existing RH, genetic and comparative maps. *Cytogenet Genome Res.* **102**, 116-120.

McCarthy TV, Healy JMS, Heffron JJA, Lehane M, Deufel T, Lehmann-Horn F, Farrall M, Johnson K (1990) Localisation of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2. *Nature* **343**, 562-564.

McCarthy TV, Quane KA, Lynch PJ (2000) Ryanodine receptor mutations in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum Mutat* **15**, 410-417.

McClelland P, Lash JA, Hathaway DR (1989) Identification of major autolytic cleavage sites in the regulatory subunit of vascular calpain II. A comparison of partial amino-terminal sequences to deduced sequence from complementary DNA. *J Biol Chem* **264**, 17428-17431.

McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, Sekhon M, Wylie K, Mardis ER, Wilson RK, Fulton R, Kucaba TA, Wagner-McPherson C, Barbazuk WB, Gregory SG, Humphray SJ, French L, Evans RS, Bethel G, Whittaker A, Holden JL, McCann OT, Dunham A, Soderlund C, Scott CE, Bentley DR, Schuler G, Chen HC, Jang W, Green ED, Idol JR, Maduro VV; Montgomery KT, Lee E, Miller A, Emerling S, Kucherlapati RS, Gibbs R, Scherer S, Gorrell JH, Sodergren E, Clerc-Blankenburg K, Tabor P, Naylor S, Garcia D, de Jong PJ, Catanese JJ, Nowak N, Oseogawa K, Qin S, Rowen L, Madan A, Dors M, Hood L, Trask B, Friedman C, Massa H, Cheung VG, Kirsch IR, Reid T, Yonescu R, Weissenbach, Bruls T, Heilig R, Branscomb E, Olsen A, Doggett N, Cheng JF, Hawkins T; Myers RM, Shang J, Ramirez L, Schmutz J, Velasquez O, Dixon K, Stone NE, Cox DR, Haussler D, Kent WJ, Furey T, Rogic S, Kennedy S, Jones S, Rosenthal A, Wen G, Schilhaber M, Gloeckner G, Nyakatura G, Siebert R, Schlegelberger B, Korenberg J, Chen XN, Fuyiyama A, Hattori M, Toyoda A, Yada T, Park HS, Sakaki Y, Shimizu N, Asakawa S, Kawasaki K, Sasaki T, Shintani A, Shimizu A, Shibuya K, Kudoh J, Minoshima S, Ramser J, Seranski P, Hoff C, Poustka A, Reinhardt R, Lehrach H; International Human Genome Mapping Consortium (2001) A physical map of the human genome. *Nature* **409**, 934-941.

Meijerink E, Fries R, Vogeli P, Masabanda J, Wigger G, Stricker C, Neuenschwander S, Bertschinger HU und Stranzinger G (1997) Two alpha(1,2) fucosyltransferase genes on porcine chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and Escherichia coli F18 receptor (ECF18R) loci. *Mamm Genome* **8**, 736-741.

Melzer W, Dietze B (2001) Malignant hyperthermia and excitation-contraction coupling. *Acta Physiol Scand* **171**, 367-378.

Mickelson JR, Louis CF (1996) Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling, Ca²⁺ release channel, and cell Ca²⁺ regulation defects. *Physiol Rev* **76**, 537-592.

Miyake S, Emori Y, Suzuki K (1986) Gene organization of the small subunit of human calcium-activated neutral protease. *Nucleic Acids Res* **14**, 8805-8817.

Milan D, Hawken R, Cabau C, Leroux S, Genet C, Lahbib Y, Tosser G, Robic A, Hately F, Alexander L, Beattie C, Schook L, Yerle M, Gellin J (2000) ImpRH server: an RH mapping server available on the web. *Bioinformatics* **16**, 558-559.

Milan D, Schiex T, Yerle M, Rink A, Beattie C, Alexander L, Hawken R, Schook L, Yasue H, Pomp D, Fredholm M, Rohrer G (2000) Integration of Genetic and Radiation Hybrid maps of the pig: The second generation ImpRH maps. XXVII International Conference on Animal Genetics Abstract D167.

Moyzis RK, Torney EC, Meyne J, Buckingham JM, Wu JR, Burks C, Sirotkin KM, Goad WB (1989) The distribution of interspersed repetitive DNA sequences in the human genome. *Genomics* **4**, 273-289.

- Needleman SB, Wunsch CD (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* **48**, 443-453.
- Nelson DL, Ledbetter SA, Corbo L, Victoria MF, Ramirez-Solis R, Webster TD, Ledbetter DH, Caskey CT (1989) *Alu* polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 6686-6690.
- Ninkina NN, Mertsalov IB, Kulikova DA, Alimova-Kost MV, Simonova OB, Korochkin LI, Kiselev SL, Buchman VL (2001) *Cerd4*, third member of the *d4* gene family: expression and organization of genomic locus. *Mamm Genome* **12**, 862-866.
- Nonneman DJ, Rohrer GA (2003) Comparative mapping of a region on chromosome10 containing QTL for reproduction in swine. *Anim Genet* **34**, 42-46.
- O'Brien SJ (1991) Mammalian genome mapping: lessons and prospects. *Curr Opin Genet Dev* **1**, 105-111.
- Ohno S, Emori Y, Suzuki K (1986) Nucleotide sequence of a cDNA coding for the small subunit of human calcium-dependent protease. *Nucleic Acids Res* **14**, 5559.
- Ohno S, Minoshima S, Kudoh J, Fukuyama R, Shimizu Y, Ohmi-Imajoh S, Shimizu N, Suzuki K. (1990) Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* **53**, 225-229.
- Ovilo C, Oliver A, Noguera JL, Clop A, Barragan C, Varona L, Rodriguez C, Toro M, Sanchez A, Perez-Enciso M, Sillio L (2002) Test for positional candidate genes for body composition on pig chromosome 6. *Genet Sel Evol* **34**, 465-479.
- Palazzolo MJ, Sawyer SA, Martin CH, Smoller DA, Hartl DL (1991) Optimized strategies for sequence-tagged-site selection in genome mapping. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 8034-8038.
- Paszek AA, Schook LB, Louis CF, Mickelson JR, Flickinger GH, Murtaugh J, Mendiola JR, Janzen MA, Beattie CW, Rohrer GA, Alexander LJ, Andersson L, Ellegren H, Johansson M, Mariani P, Marklund L, Hoyheim B, Davies W, Fredholm M, Archiblad AL, Haley CS (1995) First international workshop on porcine chromosome 6. *Anim Genet* **26**, 377-401.
- Perez F, Pernet-Gallay K, Nizak C, Goodson HV, Kreis TE, Goud B (2002) CLIPR-59, a new trans-Golgi/TGN cytoplasmatic linker protein belonging to the CLIP-170 family. *J Cell Biol* **156**, 631-642.
- Pinton P, Schibler L, Cribru E, Gellin J, Yerle M (2000) Localization of 113 anchor loci in pigs: improvement of the comparative map for humans, pigs, and goats. *Mamm Genome* **11**, 306-315.
- Puttagunta R, Gordon LA, Meyer GE, Kapfhamer D, Lamerdin JE, Kantheti P, Portman KM, Chung WK, Jenne DE, Olsen AS, Burmeister M (2000) Comparative maps of human 19p13.3 and mouse chromosome 10 allow identification of sequences at evolutionary breakpoints. *Genome Res* **10**, 1369-1380.
- Rattink AP, Faivre M, Jungerius BJ, Groenen MA, Harlizius B (2001) A high-resolution comparative RH map of porcine chromosome (SSC) 2. *Mamm Genome* **12**, 366-370.
- Reddy PS, Housman DE (1997) The complex pathology of trinucleotide repeats. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 364-372.
- Rettenberger G, Klett C, Zechner U, Kunz J, Vogel W, Hameister H (1995) Visualization of the conservation of synteny between humans and pigs by heterologous chromosomal painting. *Genomics* **26**, 372-378.
- Ried T, Arnold N, Ward DC, Wienberg J (1993) Comparative high-resolution mapping of human and primate chromosomes by fluorescence in situ hybridisation. *Genomics* **18**, 381-386.
- Ried T, Baldini A, Rand TC, Ward DC (1992) Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 1388-1392.

- Rink A, Santschi EM, Eyer KM, Roelofs B, Hess M, Godfrey M, Karajusuf EK, Yerle M, Milan D, Beattie CW (2002) A first-generation EST RH comparative map of the porcine and human genome. *Mamm Genome* **13**, 578-587.
- Robic A, Jeon JT, Rey V, Amarger V, Chardon P, Looft C, Andersson L, Gellin J, Milan D (2001) Construction of a high-resolution RH map of the human 2q35 region on TNG panel and comparison with a physical map of the porcine homologous region 15q25. *Mamm Genome* **12**, 380-386.
- Robic A, Seroude V, Jeon J-T, Yerle M, Wasungu L, Andersson L, Gellin J, Milan D (1999) A radiation hybrid map of the RN region in pigs demonstrates conserved gene order compared with the human and mouse genomes. *Mamm Genome* **10**, 565-568.
- Rogel-Gaillard C, Bourgeaux N, Billault A, Vaiman M, Chardon P (1999) Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. *Cytogenet Cell Genet* **85**, 205-211.
- Rogel-Gaillard C, Bourgeaux N, Save JC, Renard C, Coullin P, Pinton P, Yerle M, Vaiman M, Chardon P (1997) Construction of a swine YAC library allowing an efficient recovery of unique and centromeric repeated sequences. *Mamm Genome* **8**, 186-192.
- Rohrer GA, Alexander LJ, Hu Z, Smith TP, Keele JW und Beattie CW (1996) A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Res.* **6**, 371-391.
- Rohrer GA, Alexander LJ, Keele JW, Smith TP, Beattie CW (1994) A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics.* **136**, 231-245.
- Rohrer GA, Beever JE, Rothschild MF, Schook L, Gibbs R, Weinstock G (2002) Porcine genomic sequencing initiative. (Porcine Sequencing White Paper) <http://www.genome.gov/10002154>.
- Rohrer GA, Keele JW (1998) Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: II. Muscling and wholesale product yield traits. *J Anim Sci* **76**, 2255-2262.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sakihama T, Kakidani H, Zenita K, Yumoto N, Kikuchi T, Sasaki T, Kannagi R, Nakanishi S, Ohmori M, Takio K, Titani K, Murachi T (1985) A putative Ca²⁺-binding protein: structure of the light subunit of porcine calpain elucidated by molecular cloning and protein sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 6075-6079.
- Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger F, Micklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467.
- Sathiyagana Seelan R, Gopalakrishnan L, Scarpulla RC und Grossman LI (1996) Cytochrome c oxidase subunit VIIa liver isoform. *J Biol Chem* **271**(4), 2112-2120
- Schibler L, Vaiman D, Oustry A, Giraud-Delville C, and Cribiu EP (1998) Comparative gene mapping: a finale scale survey of chromosome rearrangements between ruminants and humans. *Genome Res* **8**, 901-915.
- Schiex T, Gaspin C. CARTHAGENE (1997) constructing and joining maximum likelihood genetic maps. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Bio* **5**, 258-267.
- Schmidt TR, Goodman M und Grossman LI (1999) Molecular Evolution of the COX7A gene family in primates. *Mol Biol Evol* **16**(5), 619-626.
- Schriml LM, Padilla - Nash HM, Coleman A, Moen P, Nash WG, Menninger J, Jones G, Ried T, Dean M (1999) Thyramide signal amplification (TSA) - FISH applied to Mapping PCR - labeled probes less than 1 kb in size. *Biotechniques* **27**, 608-613.

- Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome - sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**, 67-75.
- Seelan RS, Grossman LI (1992) Structure and organization of the heart isoform for bovine cytochrome c oxidase subunit VIIa. *Biochemistry* **3**, 4696-4704.
- Segers K, Vaiman D, Berghmans S, Shay T, Meyers S, Beever J, Cockett N, Georges M, Charlier C (2000) Construction and characterization of an ovine BAC contig spanning the callipyge locus. *Anim Genet* **31**, 352-359.
- Shi XW, Fitzsimmons CJ, Genet C, Prather R, Whitworth K, Green JA, Tuggle CK (2001) Radiation hybrid comparative mapping between human chromosome 17 and porcine chromosome 12 demonstrates conservation of gene order. *Anim Genet* **32**, 205-209.
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Melvin S (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 8794-8797.
- Smith J, Paton IR, Murray F, Crooijmans RPMA, Groenen MAM, Burt DW (2002) Comparative mapping of human Chromosome 19 with the chicken shows conserved synteny and gives an insight into chromosomal evolution. *Mamm Genome* **13**, 310-315.
- Smith TF, Waterman MS (1981) Comparison of Bio-Sequences. *Adv Appl Math* **2**, 482- 489.
- Smit AFA (1999) Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 657-663.
- Sorimachi H, Amano S, Ishiura S, Suzuki K. (1996) Primary sequences of rat mu-calpain large and small subunits are, respectively, moderately and highly similar to those of human. *Biochim Biophys Acta* **1309**, 37-41.
- Spötter A, Drögemüller C, Kuiper H, Brenig B, Leeb T, Distl O (2002) Mapping and microsatellite marker development for the porcine leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) and epidermal growth factor receptor (EGFR) genes. *Cytogenet Genome Res* **98**, 216-220.
- Stachora AA, Schafer RE, Pohlmeier M, Maier G, Ponstingl H (1997) Human Supt5h protein, a putative modulator of chromatin structure, is reversibly phosphorylated in mitosis. *FEBS Lett* **409**, 74-78.
- Strachan T, Read AP (1999) Human Molecular Genetics 2. *Bios Scientific Publishers Ltd*.
- Stringham HM, Boehnke M, Lange K (1999) Point and interval estimates of marker location in radiation hybrid. *Am J Hum Genet* **65**, 545-553.
- Summers TJ, Thomas JW, Lee-Lin SQ, Maduro VV, Idol JR, Green ED (2001) Comparative physical mapping of targeted regions of the rat genome. *Mamm Genome* **12**, 508-512.
- Sun HS, Yerle M, Pinton P, Chardon P, Rogel-Gaillard C, Lyons LA, Laughlin TF, Tuggle CK (1999) Physical assignment of human chromosome 13 genes and pig chromosome 11 demonstrate extensive synteny and gene order conservation between human and pig. *Anim Genet* **30**, 304-308.
- Suzuki K, Asakawa S, Iida M, Shimanuki S, Fujishima N, Hiraiwa H, Murakami Y, Shimizu N, Yasue H (2000) Construction and evaluation of a porcine bacterial artificial chromosome library. *Anim Genet* **31**, 8-12.
- Szpirer C, Molne M, Antonacci R, Jenkins NA, Finelli P, Szpirer J, Riviere M, Rocchi M, Gilbert DJ, Copeland NG, et al. (1994) The genes encoding the glutamate receptor subunits KA1 and KA2 (GRIK4 and GRIK5) are located on separate chromosomes in human, mouse, and rat. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 11849-11853.
- Taanman JW (1997) Human cytochrome c oxidase: structure, function, and deficiency. *J Bioenerg Biomembr* **29**(2), 151-163.
- Tao Q, Chang YL, Wang J, Chen H, Islam-Faridi MN, Scheuring C, Wang B, Stelly DM, Zhang HB (2001) Bacterial Artificial Chromosome-based physical map of the rice genome constructed by restriction fingerprint analysis. *Genetics* **158**, 1711-1724.

- Thiesen H-J, Bach C (1990) Target detection assay (TDA): a versatile procedure to determine DNA binding sites as demonstrated on SP1 protein. *Nucl Acids Res* **18**, 3202-3209.
- Thomas JW, Lee-Lin SQ, Green ED (1999) Human-mouse comparative mapping of the genomic region containing CDK6: localization of an evolutionary breakpoint. *Mamm Genome* **10**, 764-767.
- Thomas JW, Prasad AB, Summers TJ, Lee-Lin SQ, Maduro VV, Idol JR, Ryan JF, Thomas PJ, McDowell JC, Green ED (2002) Parallel construction of orthologous sequence-ready clone contig maps in multiple species. *Genome Res* **12**, 1277-1285.
- Tong J, Oyamada H, Demaurex N, Grinstein S, McCarthy TV und MacLennan DH (1997) Caffeine and halothane sensitivity of intracellular Ca²⁺ release is altered by 15 calcium release channel (ryanodine receptor) mutations associated with malignant hyperthermia and/or central core disease. *J Biol Chem* **272**, 26332-26339.
- Van der Vlugt HHK, Lenstra JA (1995) SINE elements of carnivores. *Mamm Genome* **6**, 49-51.
- Van Poucke M, Yerle M, Tuggle C, Piumi F, Genet C, Van Zeveren A, Peelman LJ (2001) Integration of porcine chromosome 13 maps. *Cytogenet Cell Genet* **93**, 297-303.
- Viggiano L, Iacobazzi V, Marzella R, Cassano C, Rocchi M, Palmieri F (1997) Assignment of the carnitine/ acylcarnitine translocase gene CACT to human chromosome band 3p21.31 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **79**, 62-63.
- Walter MA, Spillet DJ, Thomas P, Weissenbach J, Goodfellow PN (1994) A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes. *Nature Genetics* **7**, 22-28.
- Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, Muramatsu M (1998) Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol Cell Biol* **18**, 442-449.
- Wen G, Leeb T, Reinhart B, Schmoelzl S, Brenig B (1996) The porcine skeletal muscle ryanodine receptor gene structure coding region 1 to 10614 harbouring 71 exons. *Anim Genet* **27**, 297-304.
- Wienberg J, Stanyon R, Nash WG, O'Brien PCM, Yang F, O'Brien SJ, Ferguson-Smith MA (1997) Conservation of human vs. feline genome organization revealed by reciprocal chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* **77**, 211-217.
- Williams SH, Mouchel N, Harris A (2003) A comparative genomic analysis of the cow, pig, and human CFTR genes identifies potential intronic regulatory elements. *Genomics* **81**, 628-639.
- Wolz W, Kress W, Mueller CR (1997) Genomic sequence and organization of the human gene for cytochrome c oxidase subunit (COX7A1) VIIa-M. *Genomics* **45**, 438-442.
- Yerle M, Echard G, Robic A, Mairal A, Dubut-Fontana C, Riquet J, Pinton P, Milan D, Lahbib-Mansais Y, Gellin J (1996) A somatic cell hybrid panel for pig regional gene mapping characterized by molecular cytogenetics. *Cytogenet Cell Genet* **73**, 194-202.
- Yerle M, Pinton P, Delcros C, Arnal N, Milan D, Robic A (2003) generation and characterization of a 12,000-rad radiation hybrid-panel for fine mapping in pig. *Cytogenet Genome Res* **97**, 219-228.
- Yerle M, Pinton P, Robic A, Alfonso A, Palvadeau Y, Delcros C, Hawken R, Alexander L, Beattie LB, Milan D, Gellin J (1998) Construction of a whole genome radiation hybrid panel for high-resolution gene mapping in pigs. *Cytogenet Cell Genet* **82**, 182-188.
- Zehetner G, Lehrach H (1994) The Reference Library System-sharing biological material and experimental data. *Nature* **367**, 489-491.
- Zhao F, Ambady S, Ponce de Leon FA, Miller LM, Lunney JK, Grimm DR, Schook LB und Louis CF (1999) Microsatellite markers from a microdissected swine chromosome 6 genomic library. *Anim Genetics* **30**, 251-255.

8 Anhang

8.1 Acc. No., BLAST-Ergebnisse, Sequenzinformationen

Tab. 9: BAC/PAC-Klone

Acc No	Klon	P	L bp	Subject	SStart	O	E-Wert
AJ514457	TAIGP714A01152	SP6	681	NC_000003.8 NC_000003	169272008	Minus	7,00E-80
AJ514458	TAIGP714A0716	T7	930				
AJ514459	TAIGP714B13215	SP6	809	NC_000019.8 NC_000019	44537900	Plus	9,00E-12
AJ514460	TAIGP714B13215	T7	294				
AJ514461	TAIGP714B16155	SP6	680				
AJ514462	TAIGP714B16155	T7	402				
AJ514463	TAIGP714B16195	SP6	652				
AJ514464	TAIGP714B16195	T7	448				
AJ514465	TAIGP714A0994	SP6	800				
AJ514466	TAIGP714A0994	T7	800	NC_000019.8 NC_000019	36567526	Minus	9,00E-15
AJ514467	TAIGP714A17126	SP6	851				
AJ514468	TAIGP714A17126	T7	885				
AJ514469	TAIGP714A20137	SP6	480				
AJ514470	TAIGP714A20137	T7	207	NC_000007.10 NC_000007	136755553	Plus	9,00E-15
AJ514471	TAIGP714A1893	T7	920	NC_000009.8 NC_000009	99743041	Minus	2,00E-10
AJ514472	TAIGP714C1132	T7	879				
AJ514473	TAIGP714C02171	SP6	870				
AJ514474	TAIGP714C02171	T7	762				
AJ514475	TAIGP714C05183	SP6	751				
AJ514476	TAIGP714C05183	T7	818				
AJ514477	TAIGP714B0630	SP6	706	NC_000019.8 NC_000019	43542562	Plus	3,00E-08
AJ514478	TAIGP714B0630	T7	684				
AJ514479	TAIGP714D15214	SP6	798	NC_000019.8 NC_000019	43679321	Plus	1,00E-38
AJ514480	TAIGP714D15214	T7	996	NC_000019.8 NC_000019	43837367	Minus	7,00E-37
AJ514481	TAIGP714C18130	SP6	631				
AJ514482	TAIGP714C18130	T7	729				
AJ514483	TAIGP714D21131	SP6	640				
AJ514484	TAIGP714D21131	T7	770				
AJ514485	TAIGP714D22199	SP6	746				
AJ514486	TAIGP714D22199	T7	820	NC_000019.8 NC_000019	44065354	Plus	2,00E-12
AJ514487	TAIGP714F04202	SP6	789				
AJ514488	TAIGP714F04202	T7	912	NC_000019.8 NC_000019	43904181	Minus	1,00E-54
AJ514489	TAIGP714E05215	SP6	663				
AJ514490	TAIGP714E05215	T7	823	NC_000018.7 NC_000018	37731634	Minus	9,00E-09
AJ514491	TAIGP714F14138	SP6	822				
AJ514492	TAIGP714F14138	T7	764				
AJ514493	TAIGP714F14101	SP6	690				
AJ514494	TAIGP714F14101	T7	727	NC_000019.8 NC_000019	44663301	Plus	2,00E-06
AJ514495	TAIGP714F14234	SP6	867				
AJ514496	TAIGP714F14234	T7	875	NC_000005.7 NC_000005	99461508	Minus	1,00E-11
AJ514497	TAIGP714C0870	SP6	901	NC_000019.8 NC_000019	45815720	Minus	2,00E-15
AJ514498	TAIGP714C0870	T7	974				
AJ514499	TAIGP714E17178	SP6	882	NC_000019.8 NC_000019	44098126	Plus	9,00E-43
AJ514500	TAIGP714E17178	T7	918				
AJ514501	TAIGP714E17112	SP6	641				
AJ514502	TAIGP714E17112	T7	947	NC_000019.8 NC_000019	43547605	Minus	2,00E-16
AJ514503	TAIGP714E19167	SP6	349				
AJ514504	TAIGP714E23137	SP6	829				
AJ514505	TAIGP714E23137	T7	794				
AJ514506	TAIGP714H02184	SP6	444				
AJ514507	TAIGP714H02184	T7	743				
AJ514508	TAIGP714H06151	SP6	559	NC_000019.8 NC_000019	45097915	Minus	1,00E-34
AJ514509	TAIGP714H06151	T7	828				
AJ514510	TAIGP714G05113	SP6	730				
AJ514511	TAIGP714G05113	T7	599				
AJ514512	TAIGP714H16159	SP6	611				
AJ514513	TAIGP714H16159	T7	662				
AJ514514	TAIGP714J03209	T7	456				

AJ514515	TAIGP714J03209	SP6	869	NC_000019.8 NC_000019	43542118	Minus	8,00E-31
AJ514516	TAIGP714J05207	SP6	824	NC_000019.8 NC_000019	43908385	Minus	1,00E-69
AJ514517	TAIGP714J05207	T7	811				
AJ514518	TAIGP714I05215	SP6	878	NC_000019.8 NC_000019	43854260	Plus	9,00E-46
AJ514519	TAIGP714I05215	T7	849				
AJ514520	TAIGP714I16225	SP6	925				
AJ514521	TAIGP714I16225	T7	871	NC_000019.8 NC_000019	43079672	Minus	3,00E-18
AJ514522	TAIGP714I17138	T7	571				
AJ514523	TAIGP714E1119	SP6	940				
AJ514524	TAIGP714E1119	T7	949				
AJ514525	TAIGP714E1685	SP6	854				
AJ514526	TAIGP714E1685	T7	866				
AJ514527	TAIGP714K02212	SP6	676				
AJ514528	TAIGP714K02212	T7	695				
AJ514529	TAIGP714L0597	SP6	885				
AJ514530	TAIGP714L0597	T7	880	NC_000009.8 NC_000009	26786283	Minus	2,00E-06
AJ514531	TAIGP714L08152	SP6	892	NC_000019.8 NC_000019	45097915	Minus	1,00E-38
AJ514532	TAIGP714L08152	T7	905				
AJ514533	TAIGP714K08206	SP6	890	NC_000019.8 NC_000019	44535251	Plus	1,00E-35
AJ514534	TAIGP714K08206	T7	1006	NC_000019.8 NC_000019	44683175	Minus	5,00E-17
AJ514535	TAIGP714L19193	SP6	609				
AJ514536	TAIGP714L19193	T7	769	NC_000019.8 NC_000019	43798742	Minus	2,00E-25
AJ514537	TAIGP714L20221	SP6	720	NC_000019.8 NC_000019	43388580	Plus	2,00E-46
AJ514538	TAIGP714L20221	T7	469				
AJ514539	TAIGP714K24231	SP6	485				
AJ514540	TAIGP714K24231	T7	678				
AJ514541	TAIGP714M07158	T7	634				
AJ514542	TAIGP714N13118	SP6	414				
AJ514543	TAIGP714N13118	T7	478				
AJ514544	TAIGP714N21131	SP6	801				
AJ514545	TAIGP714N21131	T7	686				
AJ514546	TAIGP714M24116	SP6	676				
AJ514547	TAIGP714G1389	SP6	636				
AJ514548	TAIGP714G1389	T7	644	NC_000019.8 NC_000019	43537234	Plus	2,00E-21
AJ514549	TAIGP714G1489	SP6	359				
AJ514550	TAIGP714G1489	T7	800				
AJ514551	TAIGP714G1795	SP6	680	NC_000019.8 NC_000019	45526209	Plus	3,00E-29
AJ514552	TAIGP714G1795	T7	711	NC_000019.8 NC_000019	45657960	Minus	5,00E-10
AJ514553	TAIGP714G2250	SP6	886	NC_000018.7 NC_000018	49312872	Plus	4,00E-11
AJ514554	TAIGP714G2250	T7	805				
AJ514555	TAIGP714G2281	SP6	476				
AJ514556	TAIGP714G2281	T7	449				
AJ514557	TAIGP714O02137	SP6	501				
AJ514558	TAIGP714O02137	T7	548				
AJ514559	TAIGP714P08172	SP6	752				
AJ514560	TAIGP714P08172	T7	602	NC_000019.8 NC_000019	44289573	Minus	2,00E-42
AJ514561	TAIGP714O08211	SP6	645				
AJ514562	TAIGP714O08211	T7	933				
AJ514563	TAIGP714H065	SP6	747				
AJ514564	TAIGP714H065	T7	811				
AJ514565	TAIGP714O13125	SP6	760				
AJ514566	TAIGP714O13125	T7	837				
AJ514567	TAIGP714H085	SP6	839	NC_000019.8 NC_000019	45739210	Minus	4,00E-08
AJ514568	TAIGP714H085	T7	816	NC_000019.8 NC_000019	45631896	Plus	4,00E-11
AJ514569	TAIGP714P22214	SP6	992				
AJ514570	TAIGP714P22214	T7	877	NC_000019.8 NC_000019	44649100	Plus	8,00E-31
AJ514571	TAIGP714P22115	SP6	759				
AJ514572	TAIGP714H1341	SP6	509				
AJ514573	TAIGP714H1341	T7	733	NC_000019.8 NC_000019	44076285	Plus	8,00E-06
AJ514574	TAIGP714I1151	SP6	512				
AJ514575	TAIGP714I1151	T7	485				
AJ514576	TAIGP714I1616	SP6	742	NC_000019.8 NC_000019	43767481	Minus	6,00E-16
AJ514577	TAIGP714I1616	T7	773	NC_000019.8 NC_000019	43678884	Plus	1,00E-69
AJ514578	TAIGP714I1737	SP6	462				
AJ514579	TAIGP714I1737	T7	697	NC_000019.8 NC_000019	43567027	Minus	3,00E-42
AJ514580	TAIGP714J0631	SP6	731				
AJ514581	TAIGP714J0631	T7	770	NC_000019.8 NC_000019	45122341	Minus	5,00E-44
AJ514582	TAIGP714J0637	SP6	491				
AJ514583	TAIGP714J0840	SP6	800	NC_000019.8 NC_000019	41785937	Minus	2,00E-06

AJ514584	TAIGP714J0840	T7	683				
AJ514585	TAIGP714J0928	T7	471				
AJ514586	TAIGP714J1665	SP6	626				
AJ514587	TAIGP714J1665	T7	481	NC_000019.8 NC_000019	43496502	Minus	1,00E-06
AJ514588	TAIGP714K1349	SP6	652	NC_000019.8 NC_000019	43641621	Plus	1,00E-81
AJ514589	TAIGP714K1361	SP6	621				
AJ514590	TAIGP714K1361	T7	769	NC_000019.8 NC_000019	43754482	Plus	8,00E-77
AJ514591	TAIGP714L0878	SP6	906	NC_000019.8 NC_000019	45533931	Minus	3,00E-24
AJ514592	TAIGP714L0878	T7	799				
AJ514593	TAIGP714L105	SP6	786				
AJ514594	TAIGP714L105	T7	998	NC_000019.8 NC_000019	41788877	Plus	3,00E-12
AJ514595	TAIGP714L1486	SP6	879	NC_000019.8 NC_000019	45076027	Minus	e-132
AJ514596	TAIGP714L1486	T7	649				
AJ514597	TAIGP714L2393	SP6	239				
AJ514598	TAIGP714L2393	T7	277				
AJ514599	TAIGP714M086	SP6	898				
AJ514600	TAIGP714M086	T7	820				
AJ514601	TAIGP714M0841	SP6	809				
AJ514602	TAIGP714M0841	T7	849				
AJ514603	TAIGP714M2441	SP6	372				
AJ514604	TAIGP714M2441	T7	382				
AJ514605	TAIGP714N0150	SP6	729				
AJ514606	TAIGP714N0150	T7	596				
AJ514607	TAIGP714N0193	SP6	252				
AJ514608	TAIGP714N0656	SP6	615	NC_000019.8 NC_000019	45638651	Plus	1,00E-90
AJ514609	TAIGP714N0656	T7	345				
AJ514610	TAIGP714N2335	SP6	787	NC_000019.8 NC_000019	41398200	Plus	9,00E-12
AJ514611	TAIGP714N2335	T7	896				
AJ514612	TAIGP714O0632	SP6	623				
AJ514613	TAIGP714O0632	T7	752	NC_000019.8 NC_000019	44270920	Minus	1,00E-07
AJ514614	TAIGP714O1175	SP6	646				
AJ514615	TAIGP714O1175	T7	449				
AJ514616	TAIGP714O1245	SP6	716	NC_000019.8 NC_000019	41041411	Plus	5,00E-53
AJ514617	TAIGP714O1245	T7	852				
AJ514618	TAIGP714A01152	T7	348	NC_000003.8 NC_000003	169124762	Plus	3,00E-16
AJ514619	TAIGP714A01212	SP6	415				
AJ514620	TAIGP714A01212	T7	418				
AJ514621	TAIGP714A0339	SP6	590				
AJ514622	TAIGP714A0339	T7	709	NC_000019.8 NC_000019	43520139	Minus	1,00E-13
AJ514623	TAIGP714A0531	T7	913				
AJ514624	TAIGP714A0531	SP6	682	NC_000019.8 NC_000019	41590891	Minus	2,00E-06
AJ514625	TAIGP714A0546	SP6	659	NC_000019.8 NC_000019	45015890	Plus	3,00E-14
AJ514626	TAIGP714A0546	T7	919	NC_000019.8 NC_000019	45168996	Minus	8,00E-25
AJ514627	TAIGP714A0961	T7	790				
AJ514628	TAIGP714D01170	SP6	854				
AJ514629	TAIGP714D01170	T7	780	NC_000021.6 NC_000021	33046619	Minus	9,00E-12
AJ514630	TAIGP714B0642	T7	424				
AJ514631	TAIGP714F19137	SP6	588				
AJ514632	TAIGP714F19137	T7	270				
AJ514633	TAIGP714H09214	SP6	900	NC_000009.8 NC_000009	99712373	Plus	e-155
AJ514634	TAIGP714H09214	T7	873	NC_000009.8 NC_000009	99862225	Minus	4,00E-08
AJ514635	TAIGP714H12146	SP6	322	NC_000016.7 NC_000016	52941495	Minus	5,00E-11
AJ514636	TAIGP714H12146	T7	913	NC_000016.7 NC_000016	52856459	Plus	5,00E-29
AJ514637	TAIGP714H21214	SP6	689	NC_000004.8 NC_000004	128521411	Plus	8,00E-12
AJ514638	TAIGP714H21214	T7	923				
AJ514639	TAIGP714I09139	SP6	686	NC_000007.10 NC_000007	136837629	Minus	7,00E-06
AJ514640	TAIGP714I09139	T7	628				
AJ514641	TAIGP714K01132	SP6	725				
AJ514642	TAIGP714K08109	T7	786	NC_000019.8 NC_000019	41048886	Plus	e-176
AJ514643	TAIGP714K08109	SP6	232				
AJ514644	TAIGP714M2040	SP6	889	NC_000008.8 NC_000008	109739506	Minus	3,00E-67
AJ514645	TAIGP714M2040	T7	1016				
AJ514646	TAIGP714H0574	SP6	735				
AJ514647	TAIGP714H0574	T7	766				
AJ514648	TAIGP714L2072	SP6	777				
AJ514649	TAIGP714L2072	T7	759				
AJ514650	TAIGP714N1562	T7	507				
AJ514651	TAIGP714N1562	SP6	669				
AJ514652	TAIGP714N1885	SP6	840				

AJ514653	TAIGP714N1885	T7	780				
AJ514654	RP44-280J23	SP6	153	NC_000019.8 NC_000019	40726423	Plus	7,00E-21
AJ514655	RP44-280J23	T7	663				
AJ514656	RP44-310H24	T7	738				
AJ514657	RP44-313D2	SP6	849	NC_000019.8 NC_000019	40939762	Minus	4,00E-88
AJ514658	RP44-313D2	T7	824				
AJ514659	RP44-322A2	SP6	674				
AJ514660	RP44-322A2	T7	784				
AJ514661	RP44-332K23	SP6	167				
AJ514662	RP44-332K23	T7	196				
AJ514663	RP44-356N5	SP6	580				
AJ514664	RP44-356N5	T7	729				
AJ514665	RP44-424H18	SP6	466				
AJ514666	RP44-424H18	T7	340				
AJ514667	RP44-433H14	SP6	456				
AJ514668	RP44-433H14	T7	291				
AJ514669	RP44-475I15	SP6	851				
AJ514670	RP44-475I15	T7	655				
AJ514671	RP44-493I4	SP6	706				
AJ514672	RP44-493I4	T7	711				
AJ514673	RP44-520K20	SP6	428				
AJ514674	RP44-523C16	SP6	222				
AJ514675	RP44-523C16	T7	308				
AJ514676	RP44-523N3	SP6	373				
AJ514677	RP44-523N3	T7	557				
AJ514678	RP44-75C1	SP6	740				
AJ514679	RP44-75C1	T7	872	NC_000004.8 NC_000004	122362187	Minus	6,00E-07
AJ514680	RP44-120J12	SP6	759				
AJ514681	RP44-120J12	T7	561				
AJ514682	RP44-125H13	SP6	707				
AJ514683	RP44-125H13	T7	764				
AJ514684	RP44-143J1	SP6	597				
AJ514685	RP44-143J1	T7	650				
AJ514686	RP44-151G11	SP6	769	NC_000019.8 NC_000019	41365307	Minus	2,00E-34
AJ514687	RP44-151G11	T7	685				
AJ514688	RP44-157O2	SP6	849				
AJ514689	RP44-157O2	T7	789	NC_000009.8 NC_000009	125612260	Minus	1,00E-38
AJ514690	RP44-162H7	SP6	499				
AJ514691	RP44-162H7	T7	690				
AJ514692	RP44-166D13	SP6	783				
AJ514693	RP44-166D13	T7	843				
AJ514694	RP44-168H21	SP6	713				
AJ514695	RP44-168H21	T7	608				
AJ514696	RP44-172J1	T7	657				
AJ514697	RP44-187C16	SP6	634	NC_000019.8 NC_000019	43720384	Plus	8,00E-21
AJ514698	RP44-187C16	T7	513				
AJ514699	RP44-187M23	SP6	523				
AJ514700	RP44-190B21	SP6	892				
AJ514701	RP44-190B21	T7	893				
AJ514702	RP44-204H11	SP6	635				
AJ514703	RP44-204H11	T7	845	NC_000019.8 NC_000019	41365791	Minus	0.0
AJ514704	RP44-216K1	SP6	861				
AJ514705	RP44-216K1	T7	749				
AJ514706	RP44-22M8	SP6	574				
AJ514707	RP44-22M8	T7	602				
AJ514708	RP44-235B21	SP6	657	NC_000019.8 NC_000019	43901645	Plus	7,00E-06
AJ514709	RP44-235C16	SP6	682				
AJ514710	RP44-235C16	T7	759	NC_000011.7 NC_000011	99061416	Minus	2,00E-06
AJ514711	RP44-256E18	SP6	893	NC_000019.8 NC_000019	62890872	Plus	1,00E-41
AJ514712	RP44-256E18	T7	898				
AJ514713	RP44-256N2	SP6	833				
AJ514714	RP44-256N2	T7	857	NC_000019.8 NC_000019	42075029	Plus	6,00E-47
AJ514715	RP44-263A8	SP6	641				
AJ514716	RP44-263A8	T7	869				
AJ514717	RP44-266F8	SP6	863				
AJ514718	RP44-266F8	T7	889				
AJ514719	RP44-283N2	SP6	721				
AJ514720	RP44-283N2	T7	870				
AJ514721	RP44-289B2	SP6	580				

AJ514722	RP44-289B2	T7	804				
AJ514723	RP44-299D1	SP6	549				
AJ514724	RP44-299D1	T7	820				
AJ514725	RP44-303C23	SP6	676				
AJ514726	RP44-303C23	T7	641				
AJ514727	RP44-306I8	SP6	657	NC_000019.8 NC_000019	45132264	Plus	2,00E-27
AJ514728	RP44-306I8	T7	832				
AJ514729	RP44-308C15	T7	638	NC_000019.8 NC_000019	45132074	Minus	2,00E-12
AJ514730	RP44-311B11	SP6	749	NC_000019.8 NC_000019	44539622	Minus	e-138
AJ514731	RP44-311B11	T7	677				
AJ514732	RP44-319D5	SP6	919	NC_000019.8 NC_000019	42133376	Plus	0.0
AJ514733	RP44-319D5	T7	844				
AJ514734	RP44-336B4	SP6	808				
AJ514735	RP44-336B4	T7	646				
AJ514736	RP44-338B22	SP6	444				
AJ514737	RP44-338B22	T7	503				
AJ514738	RP44-347N19	SP6	874				
AJ514739	RP44-347N19	T7	972	NC_000019.8 NC_000019	42119818	Plus	8,00E-62
AJ514740	RP44-351N10	SP6	582				
AJ514741	RP44-351N10	T7	619				
AJ514742	RP44-354M10	SP6	787				
AJ514743	RP44-354M10	T7	792				
AJ514744	RP44-361P12	SP6	500	NC_000019.8 NC_000019	39818016	Plus	5,00E-06
AJ514745	RP44-378C18	T7	675	NC_000019.8 NC_000019	45231537	Minus	5,00E-19
AJ514746	RP44-379G23	T7	639				
AJ514747	RP44-382M14	SP6	671	NC_000019.8 NC_000019	42880896	Minus	4,00E-13
AJ514748	RP44-382M14	T7	782				
AJ514749	RP44-384G17	SP6	691				
AJ514750	RP44-384G17	T7	962				
AJ514751	RP44-387P21	SP6	526				
AJ514752	RP44-387P21	T7	841				
AJ514753	RP44-392C20	SP6	658	NC_000019.8 NC_000019	42074665	Plus	0.0
AJ514754	RP44-392C20	T7	673	NC_000019.8 NC_000019	41591862	Minus	8,00E-12
AJ514755	RP44-399L3	SP6	800	NC_000019.8 NC_000019	45172189	Minus	4,00E-57
AJ514756	RP44-399L3	T7	600				
AJ514757	RP44-409F21	SP6	790	NC_000019.8 NC_000019	45213159	Minus	0.0
AJ514758	RP44-409F21	T7	600				
AJ514759	RP44-415 E9	SP6	706				
AJ514760	RP44-415 E9	T7	977	NC_000019.8 NC_000019	43676818	Plus	5,00E-94
AJ514761	RP44-419C3	SP6	782	NC_000019.8 NC_000019	41523733	Minus	0.0
AJ514762	RP44-419C3	T7	816	NC_000019.8 NC_000019	42335409	Minus	0.0
AJ514763	RP44-421J2	SP6	763	NC_000019.8 NC_000019	42074329	Plus	0.0
AJ514764	RP44-421J2	T7	787				
AJ514765	RP44-424C15	SP6	640	NC_000019.8 NC_000019	62602625	Plus	e-100
AJ514766	RP44-424C15	T7	584				
AJ514767	RP44-424G14	SP6	901				
AJ514768	RP44-424G14	T7	894	NC_000019.8 NC_000019	41576237	Minus	0.0
AJ514769	RP44-430D23	SP6	826	NC_000019.8 NC_000019	41753564	Minus	2,00E-12
AJ514770	RP44-430D23	T7	916				
AJ514771	RP44-432I1	SP6	854	NC_000019.8 NC_000019	43587496	Plus	3,00E-21
AJ514772	RP44-432I1	T7	230				
AJ514773	RP44-432M14	SP6	473				
AJ514774	RP44-432M14	T7	901				
AJ514775	RP44-437D8	SP6	553				
AJ514776	RP44-437D8	T7	776				
AJ514777	RP44-437K10	SP6	856				
AJ514778	RP44-437K10	T7	812				
AJ514779	RP44-438C20	SP6	926	NC_000019.8 NC_000019	42075001	Plus	4,00E-54
AJ514780	RP44-438C20	T7	910				
AJ514781	RP44-443E11	SP6	774				
AJ514782	RP44-443E11	T7	555				
AJ514783	RP44-443J11	SP6	341				
AJ514784	RP44-444G5	SP6	691	NC_000019.8 NC_000019	41792169	Minus	3,00E-14
AJ514785	RP44-444G5	T7	647				
AJ514786	RP44-445F24	SP6	604				
AJ514787	RP44-445F24	T7	799				
AJ514788	RP44-446I5	SP6	762				
AJ514789	RP44-446I5	T7	759				
AJ514790	RP44-449E24	SP6	785				

AJ514791	RP44-449E24	T7	600				
AJ514792	RP44-463N1	SP6	908	NC_000019.8 NC_000019	41631900	Minus	5,00E-66
AJ514793	RP44-463N1	T7	858				
AJ514794	RP44-466G17	SP6	590				
AJ514795	RP44-466G17	T7	802				
AJ514796	RP44-467E2	SP6	876				
AJ514797	RP44-467E2	T7	672				
AJ514798	RP44-475K6	SP6	729				
AJ514799	RP44-475K6	T7	643				
AJ514800	RP44-477B7	SP6	688				
AJ514801	RP44-477B7	T7	872	NC_000019.8 NC_000019	44547381	Minus	6,00E-07
AJ514802	RP44-477E6	SP6	913				
AJ514803	RP44-477E6	T7	907	NC_000019.8 NC_000019	44547381	Minus	6,00E-07
AJ514804	RP44-477F22	SP6	663				
AJ514805	RP44-480K14	SP6	529				
AJ514806	RP44-480K14	T7	724				
AJ514807	RP44-482M15	SP6	832				
AJ514808	RP44-482M15	T7	782				
AJ514809	RP44-483M12	SP6	902	NC_000019.8 NC_000019	43854458	Minus	1,00E-45
AJ514810	RP44-483M12	T7	953	NC_000019.8 NC_000019	43616166	Plus	4,00E-39
AJ514811	RP44-496I3	SP6	762				
AJ514812	RP44-496I3	T7	820				
AJ514813	RP44-508D12	SP6	860	NC_000019.8 NC_000019	43655866	Plus	6,00E-10
AJ514814	RP44-508D12	T7	974	NC_000019.8 NC_000019	43875440	Minus	2,00E-59
AJ514815	RP44-509I23	SP6	639	NC_000019.8 NC_000019	42818240	Plus	0.0
AJ514816	RP44-509I23	T7	664				
AJ514817	RP44-515K5	SP6	655				
AJ514818	RP44-515K5	T7	834				
AJ514819	RP44-517B1	SP6	534				
AJ514820	RP44-518E8	SP6	894				
AJ514821	RP44-521D20	SP6	777	NC_000019.8 NC_000019	41729975	Minus	e-128
AJ514822	RP44-521D20	T7	593	NC_000019.8 NC_000019	41523647	Plus	0.0
AJ514823	RP44-528O23	SP6	702	NC_000019.8 NC_000019	44450696	Plus	9,00E-21
AJ514824	RP44-528O23	T7	636	NC_000019.8 NC_000019	44659087	Minus	3,00E-11
AJ514825	RP44-54N21	SP6	749				
AJ514826	RP44-54N21	T7	829				
AJ514827	RP44-7E12	SP6	671	NC_000019.8 NC_000019	41632147	Plus	0.0
AJ514828	RP44-7E12	T7	886				
AJ514829	RP44-90J4	SP6	732				
AJ514830	RP44-90J4	T7	822	NC_000002.8 NC_000002	121289308	Plus	2,00E-06
AJ514831	RP44-99O22	SP6	852	NC_000019.8 NC_000019	41590522	Plus	1,00E-57
AJ514832	RP44-99O22	T7	931	NC_000019.8 NC_000019	41788074	Minus	6,00E-07
AJ560805	RP44-100N10	SP6	255				
AJ560806	RP44-211B19	SP6	698	NC_000019.8 NC_000019	42133813	Minus	4,00E-26
AJ560807	RP44-262P13	SP6	878	NC_000019.8 NC_000019	42369657	Plus	e-102
AJ560808	RP44-262P13	T7	755				
AJ560809	RP44-274H11	T7	633	NC_000019.8 NC_000019	42002092	Plus	e-117
AJ560810	RP44-278D4	SP6	679	NC_000001.7 NC_000001	89442139	Minus	7,00E-06
AJ560811	RP44-278D4	T7	903	NC_000019.8 NC_000019	42572168	Minus	0.0
AJ560812	RP44-287B12	T7	653				
AJ560813	RP44-316A16	SP6	825	NC_000019.8 NC_000019	42572180	Minus	0.0
AJ560814	RP44-316A16	T7	859	NC_000019.8 NC_000019	42369774	Plus	5,00E-72
AJ560815	RP44-339N8	SP6	610	NC_000019.8 NC_000019	47365190	Plus	7,00E-09
AJ560816	RP44-339N8	T7	545	NC_000019.8 NC_000019	47546382	Minus	2,00E-73
AJ560817	RP44-341D13	SP6	690				
AJ560818	RP44-341D13	T7	767	NC_000019.8 NC_000019	42426324	Plus	4,00E-26
AJ560819	RP44-347I1	SP6	709				
AJ560820	RP44-347I1	T7	909				
AJ560821	RP44-349C7	T7	819	NC_000019.8 NC_000019	42369673	Plus	e-106
AJ560822	RP44-352J22	SP6	630	NC_000019.8 NC_000019	45288248	Plus	7,00E-09
AJ560823	RP44-352J22	T7	466				
AJ560824	RP44-429D12	SP6	559	NC_000019.8 NC_000019	45213407	Plus	4,00E-44
AJ560825	RP44-429D12	T7	820				
AJ560826	RP44-113E2	SP6	779				
AJ560827	RP44-113E2	T7	954				
AJ560828	RP44-117B1	SP6	639				
AJ560829	RP44-117B1	T7	467				
AJ560830	RP44-131I16	SP6	730				
AJ560831	RP44-131I16	T7	874				

AJ560832	RP44-132D11	SP6	686	NC_000019.8 NC_000019	46585251	Plus	6,00E-34
AJ560833	RP44-132D11	T7	443	NC_000019.8 NC_000019	47606269	Plus	2,00E-42
AJ560834	RP44-137N4	SP6	396	NC_000019.8 NC_000019	47272095	Plus	8,00E-23
AJ560835	RP44-137N4	T7	394	NC_000019.8 NC_000019	47447186	Minus	2,00E-44
AJ560836	RP44-140N11	SP6	782				
AJ560837	RP44-140N11	T7	866	NC_000019.8 NC_000019	47365857	Plus	3,00E-52
AJ560838	RP44-144P3	SP6	619	NC_000019.8 NC_000019	47047167	Plus	3,00E-08
AJ560839	RP44-144P3	T7	953				
AJ560840	RP44-153A8	SP6	640	NC_000019.8 NC_000019	42895683	Plus	3,00E-08
AJ560841	RP44-153A8	T7	678				
AJ560842	RP44-157L24	SP6	459				
AJ560843	RP44-157L24	T7	789				
AJ560844	RP44-162E17	SP6	773	NC_000019.8 NC_000019	47241884	Plus	3,00E-07
AJ560845	RP44-162E17	T7	879				
AJ560846	RP44-164P17	SP6	815				
AJ560847	RP44-164P17	T7	910				
AJ560848	RP44-172E18	SP6	609				
AJ560849	RP44-172E18	T7	527	NC_000019.8 NC_000019	47241781	Minus	2,00E-21
AJ560850	RP44-175N22	SP6	396				
AJ560851	RP44-175N22	T7	797				
AJ560852	RP44-184B20	SP6	663				
AJ560853	RP44-187C23	SP6	729				
AJ560854	RP44-187C23	T7	814				
AJ560855	RP44-194J7	SP6	491				
AJ560856	RP44-194J7	T7	797				
AJ560857	RP44-196E18	SP6	546				
AJ560858	RP44-197C10	SP6	625				
AJ560859	RP44-197C10	T7	596	NC_000019.8 NC_000019	46122220	Minus	8,00E-24
AJ560860	RP44-211B19	T7	847	NC_000019.8 NC_000019	42425793	Minus	0.0
AJ560861	RP44-21M6	SP6	708	NC_000019.8 NC_000019	47365190	Plus	3,00E-11
AJ560862	RP44-21M6	T7	659				
AJ560863	RP44-231H22	SP6	669	NC_000019.8 NC_000019	46436884	Plus	3,00E-51
AJ560864	RP44-231H22	T7	749				
AJ560865	RP44-231J20	SP6	669	NC_000019.8 NC_000019	46538692	Minus	2,00E-06
AJ560866	RP44-231J20	T7	939	NC_000019.8 NC_000019	46122220	Minus	5,00E-23
AJ560867	RP44-238L11	SP6	816	NC_000019.8 NC_000019	46970074	Plus	5,00E-07
AJ560868	RP44-238P11	SP6	703	NC_000019.8 NC_000019	46866969	Minus	5,00E-07
AJ560869	RP44-238P11	T7	419				
AJ560870	RP44-249G6	SP6	858				
AJ560871	RP44-249G6	T7	863				
AJ560872	RP44-273D10	SP6	767				
AJ560873	RP44-273D10	T7	965				
AJ560874	RP44-273D11	SP6	542				
AJ560875	RP44-273D11	T7	960				
AJ560876	RP44-274H11	SP6	705				
AJ560877	RP44-277N5	SP6	733	NC_000019.8 NC_000019	42060153	Plus	0.0
AJ560878	RP44-277N5	T7	821				
AJ560879	RP44-287B12	SP6	618				
AJ560880	RP44-292D4	SP6	697	NC_000019.8 NC_000019	46259439	Minus	1,00E-47
AJ560881	RP44-292D4	T7	588	NC_000019.8 NC_000019	45865121	Plus	3,00E-63
AJ560882	RP44-295K12	SP6	708				
AJ560883	RP44-295K12	T7	829	NC_000019.8 NC_000019	45941803	Plus	8,00E-31
AJ560884	RP44-298C10	SP6	849	NC_000019.8 NC_000019	45769718	Plus	1,00E-81
AJ560885	RP44-298C10	T7	803				
AJ560886	RP44-316D1	SP6	729				
AJ560887	RP44-316D1	T7	784				
AJ560888	RP44-32N2	SP6	818				
AJ560889	RP44-32N2	T7	901				
AJ560890	RP44-335N15	SP6	668				
AJ560891	RP44-335N15	T7	710				
AJ560892	RP44-339N8	T7	682	NC_000019.8 NC_000019	47546382	Minus	3,00E-82
AJ560893	RP44-349C7	SP6	835	NC_000019.8 NC_000019	42572621	Minus	2,00E-50
AJ560894	RP44-34D24	SP6	369				
AJ560895	RP44-34D24	T7	636	NC_000019.8 NC_000019	47312693	Plus	3,00E-20
AJ560896	RP44-357A10	SP6	544	NC_000019.8 NC_000019	47447336	Plus	5,00E-28
AJ560897	RP44-357A10	T7	519				
AJ560898	RP44-361G19	SP6	728				
AJ560899	RP44-361G19	T7	507				
AJ560900	RP44-362C17	SP6	791	NC_000019.8 NC_000019	47365857	Plus	9,00E-09

AJ560901	RP44-362C17	T7	601				
AJ560902	RP44-365H14	T7	589	NC_000019.8 NC_000019	47242559	Plus	5,00E-31
AJ560903	RP44-369L4	SP6	804				
AJ560904	RP44-369L4	T7	668				
AJ560905	RP44-373B21	SP6	650				
AJ560906	RP44-373B21	T7	705				
AJ560907	RP44-373M11	SP6	649				
AJ560908	RP44-373M11	T7	791				
AJ560909	RP44-419G16	T7	738				
AJ560910	RP44-437P18	SP6	645	NC_000019.8 NC_000019	41822293	Minus	8,00E-18
AJ560911	RP44-437P18	T7	861	NC_000019.8 NC_000019	42596022	Plus	0.0
AJ560912	RP44-443N20	T7	662				
AJ560913	RP44-444M17	SP6	715				
AJ560914	RP44-444M17	T7	699				
AJ560915	RP44-450C17	SP6	660	NC_000019.8 NC_000019	46461654	Plus	5,00E-62
AJ560916	RP44-450C17	T7	818				
AJ560917	RP44-453A4	SP6	910				
AJ560918	RP44-453A4	T7	1042	NC_000019.8 NC_000019	46460399	Minus	1,00E-36
AJ560919	RP44-455H23	SP6	529	NC_000019.8 NC_000019	46538692	Minus	1,00E-06
AJ560920	RP44-465B11	SP6	704				
AJ560921	RP44-465B11	T7	773	NC_000019.8 NC_000019	45947988	Plus	7,00E-28
AJ560922	RP44-470J8	SP6	409				
AJ560923	RP44-470J8	T7	709				
AJ560924	RP44-474I18	SP6	663	NC_000019.8 NC_000019	45780071	Plus	2,00E-46
AJ560925	RP44-474I18	T7	518				
AJ560926	RP44-490D6	SP6	673	NC_000019.8 NC_000019	42002177	Plus	1,00E-87
AJ560927	RP44-490D6	T7	815	NC_000019.8 NC_000019	42311208	Minus	0.0
AJ560928	RP44-499P18	SP6	685				
AJ560929	RP44-508A7	T7	410				
AJ560930	RP44-508A7	SP6	700	NC_000019.8 NC_000019	46122220	Minus	3,00E-23
AJ560931	RP44-50K21	SP6	776	NC_000019.8 NC_000019	46459448	Plus	3,00E-08
AJ560932	RP44-50K21	T7	358				
AJ560933	RP44-513G10	SP6	419	NC_000019.8 NC_000019	46375858	Minus	1,00E-09
AJ560934	RP44-513G10	T7	790				
AJ560935	RP44-521D11	SP6	777	NC_000019.8 NC_000019	41729975	Minus	e-128
AJ560936	RP44-521D11	T7	593	NC_000019.8 NC_000019	41523647	Plus	0.0
AJ560937	RP44-52J23	SP6	564	NC_000019.8 NC_000019	47216374	Minus	4,00E-13
AJ560938	RP44-52J23	T7	464				
AJ560939	RP44-54F11	SP6	666	NC_000011.7 NC_000011	115847406	Minus	2,00E-06
AJ560940	RP44-54F11	T7	941				
AJ560941	RP44-58D7	SP6	279				
AJ560942	RP44-62D12	SP6	708	NC_000019.8 NC_000019	42817824	Minus	1,00E-38
AJ560943	RP44-62D12	T7	800				
AJ560944	RP44-77L18	SP6	671				
AJ560945	RP44-77L18	T7	818				
AJ560946	RP44-84K5	SP6	790				
AJ560947	RP44-84K5	T7	878				
AJ560948	RP44-113E15	SP6	956				
AJ560949	RP44-183J6	SP6	762				
AJ560950	RP44-183J6	T7	804				
AJ560951	RP44-105O13	SP6	765				
AJ560952	RP44-105O13	T7	506				
AJ560953	RP44-109B4	SP6	806				
AJ560954	RP44-109B4	T7	766	NC_000019.8 NC_000019	41033859	Minus	2,00E-37
AJ560955	RP44-110F6	SP6	919				
AJ560956	RP44-110F6	T7	890	NC_000019.8 NC_000019	40947763	Plus	8,00E-28
AJ560957	RP44-113E15	T7	739	NC_000019.8 NC_000019	40968232	Minus	3,00E-27
AJ560958	RP44-114G8	SP6	723	NC_000019.8 NC_000019	40684954	Minus	5,00E-10
AJ560959	RP44-116F14	SP6	907				
AJ560960	RP44-116F14	T7	610				
AJ560961	RP44-119E11	SP6	856				
AJ560962	RP44-119E11	T7	777				
AJ560963	RP44-123D12	SP6	903				
AJ560964	RP44-123D12	T7	845				
AJ560965	RP44-133A22	SP6	730	NC_000019.8 NC_000019	40939762	Minus	1,00E-87
AJ560966	RP44-133A22	T7	753				
AJ560967	RP44-133I22	SP6	790	NC_000019.8 NC_000019	40939762	Minus	2,00E-92
AJ560968	RP44-133I22	T7	610				
AJ560969	RP44-141O12	SP6	777				

AJ560970	RP44-141O12	T7	542				
AJ560971	RP44-142F3	SP6	439				
AJ560972	RP44-142F3	T7	768				
AJ560973	RP44-144L1	SP6	760				
AJ560974	RP44-144L1	T7	905	NC_000019.8 NC_000019	41033859	Minus	2,00E-37
AJ560975	RP44-162E10	SP6	728	NC_000016.7 NC_000016	52855563	Plus	7,00E-31
AJ560976	RP44-162E10	T7	741	NC_000016.7 NC_000016	53048635	Minus	3,00E-08
AJ560977	RP44-163M20	SP6	969				
AJ560978	RP44-163M20	T7	898	NC_000019.8 NC_000019	40947737	Plus	8,00E-34
AJ560979	RP44-168L7	SP6	608				
AJ560980	RP44-168L7	T7	324				
AJ560981	RP44-17L3	SP6	642				
AJ560982	RP44-17L3	T7	702	NC_000019.8 NC_000019	40681509	Minus	9,00E-18
AJ560983	RP44-184B5	SP6	977				
AJ560984	RP44-184B5	T7	861	NC_000019.8 NC_000019	40911723	Plus	5,00E-69
AJ560985	RP44-192K2	SP6	718				
AJ560986	RP44-192K2	T7	709				
AJ560987	RP44-196J7	SP6	830				
AJ560988	RP44-196J7	T7	380				
AJ560989	RP44-19G4	SP6	760	NC_000019.8 NC_000019	40514165	Minus	3,00E-11
AJ560990	RP44-19G4	T7	600				
AJ560991	RP44-19H1	SP6	776	NC_000019.8 NC_000019	40514165	Minus	3,00E-11
AJ560992	RP44-19H1	T7	607				
AJ560993	RP44-201I19	SP6	800				
AJ560994	RP44-201I19	T7	660	NC_000019.8 NC_000019	40431160	Plus	3,00E-60
AJ560995	RP44-201J19	SP6	806	NC_000019.8 NC_000019	40662263	Minus	9,00E-09
AJ560996	RP44-201J19	T7	742	NC_000019.8 NC_000019	40431330	Plus	4,00E-32
AJ560997	RP44-202N7	SP6	763				
AJ560998	RP44-202N7	T7	775				
AJ560999	RP44-203G19	SP6	871				
AJ561000	RP44-203G19	T7	831				
AJ561001	RP44-210A15	SP6	711				
AJ561002	RP44-210A15	T7	889	NC_000019.8 NC_000019	40520468	Plus	5,00E-23
AJ561003	RP44-229J2	SP6	453				
AJ561004	RP44-23B18	SP6	842				
AJ561005	RP44-23B18	T7	880	NC_000019.8 NC_000019	40684712	Minus	3,00E-12
AJ561006	RP44-23F18	SP6	834				
AJ561007	RP44-23F18	T7	870	NC_000019.8 NC_000019	40684684	Minus	1,00E-20
AJ561008	RP44-240L15	SP6	722				
AJ561009	RP44-240L15	T7	849				
AJ561010	RP44-25C13	SP6	844				
AJ561011	RP44-25C13	T7	869				
AJ561012	RP44-345D23	SP6	684	NC_000019.8 NC_000019	39376320	Plus	3,00E-11
AJ561013	RP44-345D23	T7	513				
AJ561014	RP44-347L14	SP6	904				
AJ561015	RP44-347L14	T7	952	NC_000017.8 NC_000017	16453829	Plus	1,00E-14
AJ561016	RP44-353C16	T7	596				
AJ561017	RP44-358F1	SP6	604				
AJ561018	RP44-358F1	T7	647				
AJ561019	RP44-36E21	SP6	785				
AJ561020	RP44-36E21	T7	792				
AJ561021	RP44-404J10	SP6	623				
AJ561022	RP44-404J10	T7	621	NC_000019.8 NC_000019	39519830	Plus	1,00E-07
AJ561023	RP44-473L24	SP6	448				
AJ561024	RP44-489P18	SP6	476				
AJ561025	RP44-489P18	T7	392				
AJ561026	RP44-512O5	SP6	711				
AJ561027	RP44-512O5	T7	414				
AJ561028	RP44-64D14	SP6	725	NC_000019.8 NC_000019	40296537	Minus	5,00E-16
AJ561029	RP44-64D14	T7	515				
AJ561030	RP44-68O16	SP6	590				
AJ561031	RP44-68O16	T7	419				
AJ561032	RP44-70I20	SP6	600	NC_000019.8 NC_000019	40726398	Plus	5,00E-68
AJ561033	RP44-70I20	T7	850	NC_000019.8 NC_000019	40944901	Minus	2,00E-10
AJ561034	RP44-76K8	SP6	406				
AJ561035	RP44-76K8	T7	407				
AJ561036	RP44-80L6	SP6	823				
AJ561037	RP44-80L6	T7	746				
AJ561038	RP44-89H9	SP6	870	NC_000019.8 NC_000019	41030991	Plus	3,00E-15

AJ561039	RP44-89H9	T7	775				
AJ561040	RP44-89P3	SP6	731				
AJ561041	RP44-89P3	T7	753				
AJ561044	TAIGP714M07187	T7	462				
AJ561045	TAIGP714E1798	T7	558				
AJ561046	TAIGP714M07187	SP6	652				
AJ561047	TAIGP714E1798	SP6	592				
AJ561048	TAIGP714J0524	SP6	441				
AJ561049	TAIGP714J0524	T7	798				
AJ561050	TAIGP714C12112	T7	549				
AJ561051	TAIGP714C12112	SP6	558				
AJ561052	TAIGP714C23168	SP6	859	NC_000021.6 NC_000021	19740365	Minus	1,00E-11
AJ561053	TAIGP714C23168	T7	930				
AJ561054	TAIGP714K11168	T7	714	NC_000002.8 NC_000002	84689747	Minus	1,00E-07
AJ561055	TAIGP714K11168	SP6	738				
AJ561056	TAIGP714K23168	SP6	717				
AJ561057	TAIGP714K23168	T7	828	NC_000004.8 NC_000004	182536163	Plus	1,00E-54
AJ561058	TAIGP714M2046	SP6	412				
AJ561059	TAIGP714M2046	T7	348				
AJ561060	RP44-413G7	SP6	369				
AJ561061	RP44-134I11	SP6	673				
AJ561062	RP44-134I11	T7	537				
AJ561063	RP44-151N18	SP6	652				
AJ561064	RP44-218A18	T7	440				
AJ561065	RP44-218A18	SP6	610	NC_000023.7 NC_000023	102186507	Minus	2,00E-09
AJ561066	RP44-156C24	T7	850				
AJ561067	RP44-156C24	SP6	849				
AJ561068	RP44-185P23	SP6	712	NC_000015.7 NC_000015	23262039	Minus	6,00E-22
AJ561069	RP44-286M23	SP6	599				
AJ561070	RP44-318P15	SP6	526				
AJ561071	RP44-344I8	T7	408				
AJ561072	RP44-361P12	SP6	477	NC_000019.8 NC_000019	39818016	Plus	5,00E-06
AJ561073	RP44-367D3	SP6	943				
AJ561074	RP44-367D3	T7	925	NC_000007.10 NC_000007	4543568	Minus	2,00E-62
AJ561075	RP44-37E21	SP6	566	NC_000012.8 NC_000012	76863879	Minus	6,00E-12
AJ561076	RP44-37E21	T7	502				
AJ561077	RP44-440A22	SP6	745				
AJ561078	RP44-474P22	SP6	700				
AJ561079	RP44-474P22	T7	552				
AJ561080	RP44-477F22	SP6	643				
AJ561081	RP44-484F10	SP6	770	NC_000014.6 NC_000014	90116220	Plus	5,00E-38
AJ561082	RP44-485E10	T7	332				
AJ561083	RP44-485E10	SP6	596				
AJ561084	RP44-68K16	SP6	598				
AJ561085	RP44-68K16	T7	750				
AJ561086	RP44-71A1	T7	877				
AJ561087	RP44-71A1	SP6	814				
AJ561088	RP44-94P1	SP6	852				
AJ561089	RP44-94P1	T7	868	NC_000019.8 NC_000019	41196155	Minus	2,00E-13
AJ745929	RP44-101A1	SP6	618				
AJ745930	RP44-101A1	T7	586				
AJ745931	RP44-128D24	SP6	677				
AJ745932	RP44-128D24	T7	924	NC_000019.8 NC_000019	39452792	Plus	8,00E-25
AJ745933	RP44-128M22	SP6	723	NC_000019.8 NC_000019	39516608	Minus	4,00E-35
AJ745934	RP44-128M22	T7	650				
AJ745935	RP44-138F23	SP6	617				
AJ745936	RP44-138F23	T7	355				
AJ745937	RP44-13L20	T7	432				
AJ745938	RP44-158F15	SP6	701	NC_000019.8 NC_000019	39565319	Plus	3,00E-20
AJ745939	RP44-149B22	T7	448				
AJ745940	RP44-151N18	T7	359				
AJ745941	RP44-185P23	T7	52				
AJ745942	RP44-245K13	SP6	625				
AJ745943	RP44-245K13	T7	656				
AJ745944	RP44-268I17	SP6	193	NC_000002.8 NC_000002	224663006	Plus	2,00E-06
AJ745945	RP44-268I17	T7	784				
AJ745946	RP44-286M23	T7	482				
AJ745947	RP44-292J23	SP6	627	NC_000007.10 NC_000007	114214068	Minus	4,00E-35
AJ745948	RP44-292J23	T7	682				

AJ745949	RP44-158F15	T7	564				
AJ745950	RP44-413G7	T7	467				
AJ745951	RP44-440A22	T7	488				
AJ745952	RP44-460P16	SP6	534	NC_000008.8 NC_000008	28092485	Plus	2,00E-24
AJ745953	RP44-460P16	T7	339				
AJ745954	RP44-484F10	T7	613				
AJ745955	RP44-58P16	SP6	682	NC_000009.8 NC_000009	117291717	Plus	4,00E-81
AJ745956	RP44-58P16	T7	642	NC_000009.8 NC_000009	117500937	Minus	7,00E-09
AJ745957	RP44-68E16	SP6	583	NC_000006.8 NC_000006	122725296	Plus	4,00E-47
AJ745958	RP44-68E16	T7	673				
AJ745959	RP44-167L19	SP6	692	NC_000019.8 NC_000019	39941748	Plus	0.0
AJ745960	RP44-167L19	T7	410				
AJ745961	RP44-176E23	SP6	579				
AJ745962	RP44-176E23	T7	441	NC_000019.8 NC_000019	39941852	Plus	1,00E-70
AJ745963	RP44-179E5	SP6	515				
AJ745964	RP44-179E5	T7	639				
AJ745965	RP44-179O16	SP6	855				
AJ745966	RP44-179O16	T7	677				
AJ745967	RP44-187K6	SP6	221				
AJ745968	RP44-187K6	T7	59				
AJ745969	RP44-195P4	SP6	817				
AJ745970	RP44-195P4	T7	696				
AJ745971	RP44-208A9	SP6	635	NC_000019.8 NC_000019	40143116	Minus	3,00E-11
AJ745972	RP44-208A9	T7	765				
AJ745973	RP44-210D22	SP6	830				
AJ745974	RP44-210D22	T7	525				
AJ745975	RP44-222C7	SP6	352				
AJ745976	RP44-229J2	T7	421				
AJ745977	RP44-265H15	SP6	697				
AJ745978	RP44-265H15	T7	634				
AJ745979	RP44-272E4	SP6	786				
AJ745980	RP44-272E4	T7	293	NC_000019.8 NC_000019	39941856	Plus	2,00E-87
AJ745981	RP44-282G21	SP6	747				
AJ745982	RP44-282G21	T7	531	NC_000019.8 NC_000019	39483592	Minus	e-120
AJ745983	RP44-284C19	SP6	660				
AJ745984	RP44-284C19	T7	620	NC_000019.8 NC_000019	39465235	Plus	7,00E-15
AJ745985	RP44-302B9	SP6	806				
AJ745986	RP44-302B9	T7	444				
AJ745987	RP44-306B14	SP6	791				
AJ745988	RP44-306B14	T7	812				
AJ745989	RP44-310H24	SP6	615				
AJ745990	RP44-312M5	SP6	771	NC_000019.8 NC_000019	40296537	Minus	1,00E-13
AJ745991	RP44-312M5	T7	551				
AJ745992	RP44-319P6	SP6	440				
AJ745993	RP44-319P6	T7	375				
AJ745994	RP44-321F3	SP6	671				
AJ745995	RP44-321F3	T7	659				
AJ745996	RP44-322F22	SP6	653				
AJ745997	RP44-322F22	T7	587				
AJ745998	RP44-344I8	SP6	594				
AJ745999	RP44-344I8	T7	513				
AJ746000	RP44-345L3	SP6	577	NC_000019.8 NC_000019	39727045	Plus	2,00E-08
AJ746001	RP44-345L3	T7	715				
AJ746002	RP44-352K9	SP6	442				
AJ746003	RP44-352K9	T7	787	NC_000019.8 NC_000019	40520988	Plus	1,00E-10
AJ746004	RP44-353C16	SP6	766				
AJ746005	RP44-357D19	SP6	765	NC_000019.8 NC_000019	40662192	Minus	2,00E-06
AJ746006	RP44-357D19	T7	758				
AJ746007	RP44-357F19	SP6	761	NC_000019.8 NC_000019	40662192	Minus	2,00E-06
AJ746008	RP44-357F19	T7	747				
AJ746009	RP44-373P12	SP6	768	NC_000019.8 NC_000019	40662263	Minus	8,00E-09
AJ746010	RP44-373P12	T7	847	NC_000019.8 NC_000019	40432083	Plus	9,00E-09
AJ746011	RP44-374L12	SP6	752				
AJ746012	RP44-374L12	T7	821				
AJ746013	RP44-376N2	SP6	687				
AJ746014	RP44-376N2	T7	718	NC_000019.8 NC_000019	40726267	Minus	9,00E-55
AJ746015	RP44-381C14	SP6	753	NC_000016.7 NC_000016	9164728	Plus	3,00E-11
AJ746016	RP44-381C14	T7	703	NC_000019.8 NC_000019	39924274	Minus	0.0
AJ746017	RP44-384E10	SP6	615				

AJ746018	RP44-384E10	T7	853	NC_000019.8 NC_000019	39391980	Plus	9,00E-06
AJ746019	RP44-400C13	SP6	552				
AJ746020	RP44-400C13	T7	800	NC_000019.8 NC_000019	40673517	Minus	7,00E-25
AJ746021	RP44-411G7	SP6	785	NC_000019.8 NC_000019	40432083	Plus	1,00E-17
AJ746022	RP44-411G7	T7	730				
AJ746023	RP44-429I6	SP6	443				
AJ746024	RP44-433B4	SP6	736				
AJ746025	RP44-433B4	T7	785				
AJ746026	RP44-462N18	SP6	500				
AJ746027	RP44-462N18	T7	764				
AJ746028	RP44-464A14	SP6	691				
AJ746029	RP44-464A14	T7	517				
AJ746030	RP44-472A8	SP6	413				
AJ746031	RP44-472A8	T7	391				
AJ746032	RP44-473L24	T7	459				
AJ746033	RP44-499A1	SP6	479				
AJ746034	RP44-499A1	T7	336				
AJ746035	RP44-4C3	SP6	909	NC_000019.8 NC_000019	40106675	Minus	2,00E-13
AJ746036	RP44-4C3	T7	569				
AJ746037	RP44-506L20	T7	363				
AJ746038	RP44-62D3	SP6	568				
AJ746039	RP44-62D3	T7	698	NC_000008.8 NC_000008	28243201	Minus	2,00E-28
AJ746040	RP44-92J4	SP6	573				
AJ746041	RP44-92J4	T7	643	NC_000019.8 NC_000019	39923857	Plus	0.0
AJ746042	RP44-119B10	SP6	770				
AJ746043	RP44-119B10	T7	698				
AJ746044	RP44-143P2	SP6	692				
AJ746045	RP44-143P2	T7	547				
AJ746046	RP44-149B22	SP6	693	NC_000004.8 NC_000004	78390577	Minus	5,00E-07

Accession-Nummer (Acc. No.), Primerangabe (P), chromosomaler Zuordnung bei positivem BLAST-Ergebnis, (Sstart) und Informationen über Länge (L bp)

8.2 Hinterlegte Sequenzen

Tab. 10: Hinterlegte Sequenzen

Acc. No. bei der EMBL-Datenbank	Anzahl der hinterlegten Sequenzen
AJ514457-AJ514832	376
AJ560805-AJ561041	237
AJ561044-AJ561059	16
AJ561060-AJ561089	30
AJ745929-AJ746046	118

8.3 Genreihenfolge

Tabelle 11: Aktuelle Reihenfolge der Gene auf HSA 19q13 (build 35.1) mit den im Contig lokalisierten Genen des BAC/PAC-Contigs auf SSC 6q1.2				
start	stop	Genlocus	Lokalisation	Beschreibung von Name und Funktion
39547909	39583076	GPI	19q13.1	glucose phosphate isomerase
39587143	39608913	MGC13096	19q13.11	hypothetical protein MGC13096
39611153	39652635	UBA2	19q12	SUMO-1 activating enzyme subunit 2
39663335	39683914	WTIP	19q13.11	WT1-interacting protein
39683231	39760416	LOC390919	19q13.11	similar to regulator of sex-limitation candidate 11
39776187	39779339	LOC284402	19q13.11	hypothetical protein LOC284402
39817307	39818566	LOC441847	19q13.11	similar to RIKEN cDNA B230312118
39860439	39869137	ZNF302	19q13.11	zinc finger protein 302
39916933	39925613	ZNF181	19q13.11	zinc finger protein 181 (HHZ181)
39940819	39955960	ZNF599	19q13.11	zinc finger protein 599
39955503	40008594	LOC441848	19q13.11	similar to zinc finger protein 113
39998898	40015861	LOC400685	19q13.11	hypothetical LOC400685
40021705	40038048	FLJ43870	19q13.11	FLJ43870 protein
40033254	40049633	LOC401913	19q13.11	similar to ABO protein
40109724	40127912	ZNF30	19q13.11	zinc finger protein 30 (KOX 28)
40139098	40143044	FLJ38451	19q13.11	FLJ38451 protein
40183086	40209213	KIAA1533	19q13.11	KIAA1533
40213374	40223193	SCN1B	19q13.1	sodium channel, voltage-gated, type I, beta
40223250	40249315	HPN	19q11-q13.2	hepsin (transmembrane protease, serine 1)
40256802	40296203	LOC339320	19q13.11	similar to alpha tectorin
40298639	40307067	FXVD3	19q13.11-q13.12	FXVD domain containing ion transport regulator 3
40307257	40317944	LGI4	19q13.12	leucine-rich repeat LGI family, member 4
40321572	40325794	FXVD1	19q13.1	FXVD domain containing ion transport regulator 1
40325994	40337045	FXVD7	19q13.12	FXVD domain containing ion transport regulator 7
40337467	40352625	FXVD5	19q12-q13.1	FXVD domain containing ion transport regulator 5
40407544	40411468	FLJ25660	19q13.12	hypothetical protein FLJ25660
40431399	40450707	LISCH7	19q13.12	liver-specific bHLH-Zip transcription factor
40451736	40462558	USF2	19q13	upstream transcription factor 2, c-fos interacting
40465283	40467883	HAMP	19q13.1	hepcidin antimicrobial peptide
40474878	40496547	MAG	19q13.1	myelin associated glycoprotein
40511953	40530104	CD22	19q13.1	CD22 antigen
40534295	40535197	GPR40	19q13.1	G protein-coupled receptor 40
40541342	40543231	GPR41	19q13.1	G protein-coupled receptor 41
40554102	40555142	GPR42	19q13.1	G protein-coupled receptor 42
40564914	40566797	LOC390924	19q13.12	similar to Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)
40632457	40633449	GPR43	19q13.1	G protein-coupled receptor 43
40670068	40673196	UNQ467	19q13.12	KIPV467
40679963	40696394	ZD52F10	19q13.12	dermokine
40706109	40711093	UNQ698	19q13.12	HLAR698
40716204	40728058	GAPDS	19q13.1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, spe
40728385	40730268	NIFIE14	19q13.1	seven transmembrane domain protein
40732939	40746401	ATP4A	19q13.1	ATPase, H+/K+ exchanging, alpha polypeptide
40795513	40808091	KIAA0841	19q13.12	KIAA0841
40811820	40820427	MGC10433	19q13.12	hypothetical protein MGC10433
40824499	40827613	LOC339321	19q13.12	hypothetical protein LOC339321
40830995	40841524	COX6B	19q13.1	cytochrome c oxidase subunit VIb
40849555	40861207	UPK1A	19q13.13	uroplakin 1A
40895670	40899780	TZFP	19q13.1	testis zinc finger protein
40900761	40921619	MLL4	19q13.1	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 4
40921991	40925191	FLJ22573	19q13.12	hypothetical protein FLJ22573
40925272	40928145	U2AF1L3	19q13.12	U2(RNU2) small nuclear RNA auxiliary factor1-like 3
40928334	40929743	PEN2	19q13.12	presenilin enhancer 2
40931352	40937260	F25965	19q13.1	protein F25965
40937310	40939770	HSPB6	19q13.12	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6
40940925	40953630	LOC148137	19q13.12	hypothetical protein BC017947

40958316	40971564	SNX26	19q13.12	sorting nexin 26
40971618	40981858	LOC400687	19q13.12	hypothetical LOC400687
40982732	40996041	PRODH2	19q13.1	proline dehydrogenase (oxidase) 2
41008697	41034579	NPHS1	19q13.1	nephrosis 1, congenital, Finnish type (nephrin)
41039664	41049878	KIRREL2	19q13.12	kin of IRRE like 2 (Drosophila)
41051310	41062531	APLP1	19q13.1	amyloid beta (A4) precursor-like protein 1
41070983	41083392	TA-NFKBH	19q13.12	T-cell activation NFKB-like protein
41085222	41087013	HCST	19q13.1	hematopoietic cell signal transducer
41087144	41091026	TYROBP	19q13.1	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
41119862	41127937	LRFN3	19q13.12	leucine rich repeat and fibronectin type III domain co
41186050	41191509	FLJ36445	19q13.12	hypothetical protein FLJ36445
41191863	41196981	MGC15677	19q13.12	hypothetical protein MGC15677
41197403	41215615	CLIPR-59	19q13.12	CLIP-170-related protein
41217727	41237504	THAP8	19q13.12	THAP domain containing 8
41237623	41287847	C19orf14	19q13.12	chromosome 19 open reading frame 14
41291809	41296453	LOC400688	19q13.12	S16356 ovo protein - fruit fly (Drosophila melanoga
41296452	41298046	POLR2I	19q12	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide I,
41298237	41308683	CKAP1	19q13.11-q13.12	cytoskeleton associated protein 1
41322757	41333095	CAPNS1	19q13.12	calpain, small subunit 1
41333664	41335611	COX7A1	19q13.1	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1
41364889	41384792	ZNF565	19q13.12	zinc finger protein 565
41411488	41421506	ZNF146	19q13.1	zinc finger protein 146
41448124	41495404	LOC440523	19q13.12	LOC440523
41508353	41514465	LOC440524	19q13.12	LOC440524
41519002	41550715	KIAA1559	19q13.12	KIAA1559 protein
41574701	41601390	ZNF545	19q13.12	zinc finger protein 545
41600080	41605529	LOC126162	19q13.12	similar to peroxisomal acyl-CoA thioesterase 2B; like
41630415	41659358	ZNF566	19q13.12	zinc finger protein 566
41679655	41680840	LOC401914	19q13.12	similar to C-terminal binding protein 2 isoform 2; rib
41693770	41711012	LOC339324	19q13.12	hypothetical protein LOC339324
41727130	41756030	ZNF529	19q13.13	zinc finger protein 529
41788061	41811339	ZNF382	19q13.12	zinc finger protein 382
41820123	41849579	GIOT-1	19q13.12	gonadotropin inducible transcription repressor 1
41872142	41904066	ZNF567	19q13.12	zinc finger protein 567
41930509	41955571	LOC342892	19q13.12	hypothetical protein LOC342892
41955874	41959818	LOC400690	19q13.12	hypothetical LOC400690
41996710	42021121	MGC62100	19q13.12	hypothetical protein LOC388536
42033103	42062311	ZNF345	19q13.12	zinc finger protein 345
42070866	42098924	DKFZp7790	19q13.12	hypothetical protein DKFZp7790175
42099085	42135485	ZNF568	19q13.12	zinc finger protein 568
42155955	42163058	LOC400691	19q13.12	hypothetical LOC400691
42173736	42180341	LOC126167	19q13.12	hypothetical protein LOC126167
42184644	42187772	LOC284409	19q13.12	hypothetical LOC284409
42261222	42312502	FLJ32191	19q13.12	hypothetical protein FLJ32191
42332844	42355455	ZNF585A	19q13.12	zinc finger protein 585A
42367562	42393293	ZNF585B	19q13.12	zinc finger protein 585B
42409206	42426414	ZNF383	19q13.12	zinc finger protein 383
42517420	42547197	HKR1	19q13.12	GLI-Kruppel family member HKR1
42553899	42575806	ZNF527	19q13.1	zinc finger protein 527
42593902	42650179	ZNF569	19q13.12	zinc finger protein 569
42651822	42668082	ZNF570	19q13.12	zinc finger protein 570
42689538	42720601	LOC390927	19q13.12	similar to zinc finger protein 569
42728212	42731913	LOC400692	19q13.12	similar to hypothetical protein
42734148	42796836	ZNF540	19q13.12	zinc finger protein 540
42745131	42777531	ZNF571	19q13.12	zinc finger protein 571
42815229	42838153	LOC400693	19q13.12	similar to Hypothetical zinc finger protein KIAA0961
42850491	42874992	FLJ37549	19q13.12	hypothetical protein FLJ37549
42879116	42902531	ZNF607	19q13.1	zinc finger protein 607
42921028	42956231	ZNF573	19q13.12	zinc finger protein 573
42974701	43002122	LOC401915	19q13.12-q13.13	similar to hypothetical protein FLJ32191
43006205	43037676	LOC147975	19q13.13	hypothetical LOC147975
43067412	43089157	NYD-SP11	19q13.13	NYD-SP11 protein

43264265	43390846	SIPA1L3	19q13.13	signal-induced proliferation-associated 1 like 3
43394187	43405188	DPF1	19q13.13-q13.2	D4, zinc and double PHD fingers family 1
43433719	43439012	PPP1R14A	19q13.1	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) su
43447074	43474948	SPINT2	19q13.1	serine protease inhibitor, Kunitz type, 2
43486644	43487486	C19orf33	19q13.2	chromosome 19 open reading frame 33
43487595	43492274	LOC90522	19q13.2	similar to putative transmembrane protein; homolog
43502322	43511494	KCNK6	19q13.1	potassium channel, subfamily K, member 6
43518298	43553422	C19orf15	19q13.1	chromosome 19 open reading frame 15
43557061	43566304	PSMD8	19q13.2	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit,
43566832	43570508	GGN	19q13.2	gametogenetin
43572535	43578625	LOC388538	19q13.2	similar to SPRED-3
43585626	43591567	LOC147965	19q13.2	hypothetical protein LOC147965
43591538	43608785	RASGRP4	19q13.1	RAS guanyl releasing protein 4
43616180	43770012	RYR1	19q13.1	ryanodine receptor 1 (skeletal)
43770121	43800404	MAP4K1	19q13.1-q13.4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase ki
43801577	43819433	eIF3k	19q13.2	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit k
43830167	43913010	ACTN4	19q13	actinin, alpha 4
43912672	43926954	CAPN12	19q13.2	calpain 12
43971694	43974232	LGALS7	19q13.2	lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7)
43984155	43995422	LGALS4	19q13.2	lectin, galactoside-binding, soluble, 4 (galectin 4)
43997910	44014278	ECH1	19q13.1	enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal
44018869	44032381	HNRPL	19q13.2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L
44050314	44059261	FLJ45909	19q13.2	FLJ45909 protein
44061042	44082201	SIRT2	19q13	sirtuin (silent mating type information regulation
44082479	44091366	NFKBIB	19q13.1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene
44097749	44113376	SARS2	19q13.2	seryl-tRNA synthetase 2
44113188	44115500	MRPS12	19q13.1-q13.2	mitochondrial ribosomal protein S12
44123882	44158220	FBXO17	19q13.2	F-box protein 17
44206505	44215038	FBXO27	19q13.2	F-box protein 27
44266785	44293318	LOC390928	19q13.2	similar to RIKEN cDNA C330005M16
44308301	44361882	PAK4	19q13.2	p21(CDKN1A)-activated kinase 4
44379444	44384362	LOC342897	19q13.2	similar to F-box only protein 2
44385314	44386746	SYCN	19q13.2	syncollin
44426112	44427451	IL28B	19q13.13	interleukin 28B (interferon, lambda 3)
44429613	44437810	LOC441849	19q13.2	similar to Methionine-R-sulfoxide reductase (Selenop
44450997	44452572	IL28A	19q13.13	interleukin 28A (interferon, lambda 2)
44478805	44481152	IL29	19q13.13	interleukin 29 (interferon, lambda 1)
44489048	44503338	LRFN1	19q13.2	leucine rich repeat and fibronectin type III domain co
44510839	44518460	GMFG	19q13.2	glia maturation factor, gamma
44524948	44567382	FLJ10211	19q13.2	hypothetical protein FLJ10211
44568112	44573519	PD2	19q13.1	hypothetical protein F23149_1
44573840	44583048	IXL	19q13.2	intersex-like (Drosophila)
44589327	44591885	ZFP36	19q13.1	zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)
44595590	44607994	CLG	19q13.2	likely ortholog of mouse common-site lymphoma/le
44615692	44618478	RPS16	19q13.1	ribosomal protein S16
44628164	44659150	SUPT5H	19q13	suppressor of Ty 5 homolog (S. cerevisiae)
44663316	44674306	TIMM50	19q13.2	translocase of inner mitochondrial membrane 50 h
44681427	44690949	DLL3	19q13	delta-like 3 (Drosophila)
44697593	44703166	SELV	19q13.2	selenoprotein V
44713470	44715334	FLJ38944	19q13.2	hypothetical protein FLJ38944
44721289	44722664	CRI2	19q13.2	CREBBP/EP300 inhibitor 2
44722657	44738032	LOC390930	19q13.2	similar to Charot-Leyden crystal protein; eosinophil I
44785009	44789954	LGALS13	19q13.1	lectin, galactoside-binding, soluble, 13 (galectin 13)
44820643	44823348	LOC441850	19q13.2	LOC441850
44838393	44843127	LOC148003	19q13.2	similar to Placental tissue protein 13 (Placenta prot
44861854	44868848	LOC400696	19q13.2	eosinophil lysophospholipase-like
44886786	44891928	LGALS14	19q13.2	lectin, galactoside-binding, soluble, 14
44908398	44913713	LOC441851	19q13.2	LOC441851
44913736	44920508	CLC	19q13.1	Charcot-Leyden crystal protein
44939885	44968615	LOC342900	19q13.2	hypothetical LOC342900
45007831	45016681	DYRK1B	19q12-13.1	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation reg
45016938	45028813	FBL	19q13.1	fibrillarlin

45045811	45132373	FCGBP	19q13.1	Fc fragment of IgG binding protein
45140405	45141507	LOC440525	19q13.2	hypothetical gene supported by BC016064; NM_018
45168913	45179193	PSMC4	19q13.11-q13.13	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, A
45194869	45215354	ZNF546	19q13.2	zinc finger protein 546
45221127	45223249	LOC390933	19q13.2	similar to hypothetical protein
45231322	45253952	LOC163131	19q13.2	similar to BC331191_1
45271339	45388861	LOC284323	19q13.2	hypothetical protein LOC284323
45389491	45413314	MAP3K10	19q13.2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10
45413805	45416138	MGC33962	19q13.2	hypothetical protein MGC33962
45419962	45424404	FLJ13265	19q13.2	hypothetical protein FLJ13265
45429392	45430177	LOC440526	19q13.2	LOC440526
45431556	45483036	AKT2	19q13.1-q13.2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
45518814	45546133	FLJ36888	19q13.2	hypothetical protein FLJ36888
45557389	45576230	PLD3	19q13.2	phospholipase D3
45577019	45587934	HIPK4	19q13.2	homeodomain interacting protein kinase 4
45591515	45606130	PRX	19q13.13-q13.2	periaxin
45620255	45623737	SERTAD1	19q13.1-q13.2	SERTA domain containing 1
45638591	45642122	SERTAD3	19q13.2	SERTA domain containing 3
45645541	45663516	BLVRB	19q13.1-q13.2	biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH))
45663988	45774205	SPTBN4	19q13.13	spectrin, beta, non-erythrocytic 4
45774630	45789141	LOC92799	19q13.2	hypothetical protein BC007653
45796943	45827563	LTBP4	19q13.1-q13.2	latent transforming growth factor beta binding protein
45864436	45888374	NUMBL	19q13.13-q13.2	numb homolog (Drosophila)-like
45889274	45914440	ADCK4	19q13.2	aarF domain containing kinase 4
45914848	45938605	ITPKC	19q13.1	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase C
45938607	45948248	FLJ41131	19q13.2	FLJ41131 protein
45948619	45963134	SNRPA	19q13.1	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A
45973218	45975236	MIA	19q13.32-q13.33	melanoma inhibitory activity
45976017	45994683	RAB4B	19q13.2	RAB4B, member RAS oncogene family
45996985	46006177	EGLN2	19q13.2	egl nine homolog 2 (C. elegans)
46006240	46009137	CYP2T2P	19q13.2	cytochrome P450, family 2, subfamily T, polypeptide
46016420	46024516	CYP2F1P	19q13.2	cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide
46041284	46048180	CYP2A6	19q13.2	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide
46073184	46080497	CYP2A7	19q13.2	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide
46088964	46097897	CYP2G1	19q13.2	cytochrome P450, family 2, subfamily G, polypeptide
46105976	46225830	CYP2A7P1	19q13.2	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide
46122012	46148403	CYP2B7	19q13.2	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide
46189044	46216141	CYP2B6	19q13.2	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide
46248197	46260189	CYP2G2	19q13.2	cytochrome P450, family 2, subfamily G, polypeptide
46286208	46293939	CYP2A13	19q13.2	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide
46312193	46326121	CYP2F1	19q13.2	cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide
46332464	46335098	CYP2T3P	19q13.2	cytochrome P450, family 2, subfamily T, polypeptide
46391010	46405047	CYP2S1	19q13.1	cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide
46416663	46459511	AXL	19q13.1	AXL receptor tyrosine kinase
46460264	46505438	HNRPUL1	19q13.2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1
46507934	46522628	MGC20255	19q13.2	hypothetical protein MGC20255
46528068	46551628	TGFB1	19q13.1	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelm)
46552167	46561877	MGC4093	19q13.2	hypothetical protein MGC4093
46584118	46595096	EXOSC5	19q13.1	exosome component 5
46595544	46622750	BCKDHA	19q13.1-q13.2	branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha
46623105	46626475	B3GALT7	19q13.2	UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase po
46629064	46636160	FLJ10241	19q13.2	hypothetical protein FLJ10241
46698382	46698926	LOC400701	19q13.2	hypothetical LOC400701
46703876	46705290	LOC440532	19q13.2	similar to tropomyosin 3
46718436	46719945	PLEKHA3P1	19q13.2	pleckstrin homology domain containing, family A
46774467	46777829	R29124_1	19q13.2	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion mol
46799451	46799698	CEACAMP3	19q13.2	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion mol
46817184	46825268	CEACAM4	19q13.2	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion mol
46869075	46883936	CEACAM7	19q13.2	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion mol
46904377	46925686	CEACAM5	19q13.1-q13.2	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion mol
46951341	46967953	CEACAM6	19q13.2	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion mol
46992396	47007429	CEACAM3	19q13.2	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion mol

47025562	47026831	LOC388544	19q13.2	similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
47032990	47040348	MGC42718	19q13.2	hypothetical protein MGC42718
47040864	47048235	DMRTC2	19q13.2	DMRT-like family C2
47056131	47067324	RPS19	19q13.2	ribosomal protein S19
47073179	47077278	CD79A	19q13.2	CD79A antigen (immunoglobulin-associated alpha)
47079107	47103444	ARHGEF1	19q13.13	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1
47104220	47108911	LOC390937	19q13.2	similar to ETS-domain transcription factor ERF
47152675	47155309	RABAC1	19q13.2	Rab acceptor 1 (prenylated) ATPase, Na+/K+ transp
47162576	47190184	ATP1A3	19q13.31	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 3 polypeptide
47194315	47261797	GRIK5	19q13.2	glutamate receptor, ionotropic, kainate 5
47266358	47277544	ZNF574	19q13.2	zinc finger protein 574
47286963	47328422	POU2F2	19q13.2	POU domain, class 2, transcription factor 2
47394592	47413653	DEDD2	19q13.2	death effector domain containing 2
47416332	47424193	ZNF526	19q13.2	zinc finger protein 526
47426186	47438571	GSK3A	19q13.2	glycogen synthase kinase 3 alpha
47443562	47451113	ERF	19q13	Ets2 repressor factor
47480657	47491789	CIC	19q13.2	capicua homolog (Drosophila)
47493025	47498563	PAFAH1B3	19q13.1	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform
47509328	47521054	FLJ90805	19q13.2	hypothetical protein FLJ90805
47532798	47573778	EGFL4	19q12	EGF-like-domain, multiple 4
47574385	47574726	SBP1	19q13.2	HBV pre-s2 binding protein 1
47583013	47586279	CNFN	19q13.2	cornifelin
47597506	47623418	LIPE	19q13.2	lipase, hormone-sensitive

Im porcinen Gesamt-Contig lokalisierte Gene sind rot hervorgehoben, die Namen dieser Gene sind fett hervorgehoben.

8.4 Verwendete Oligonucleotide

8.4.1 Sequenzprimer für BAC/PAC-Endsequenzen und pGEM[®]-4z-Plasmide

Tab. 12: Sequenzprimer für BES und Plasmide

Primer	Sequenz	T _M [°C]
M13_for	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	54
M13_rev	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	54
SP6	GGA TTT AGG TGA CAC TAT AG	56
BpSP6	TTT TTG CGA TCT GCC GTT TC	58
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	56

8.4.2 PCR-Primer für die Amplifikation der COX7A1 und CAPNS1 Exons

Tab. 13: PCR-Primer für die Amplifikation der COX7A1 Exons

Exon	Primer	Sequence (5'-3')	Produkt	T _M [°C]
Exon 1	CoxEx1_F	CAC CTA CTG GAC GAA TCC	388 bp	59 °C
	CoxEx1_R	AGG TCC CGA GGT ATT ACA G		
Exons 2+3	CoxEx2-3_F	TCC CAA GGG ACA GAA CTA TCC	575 bp	59 °C
	CoxEx2-3_R	CAG GCT TTC TCC CCA GAC		
Exon 4	CoxEx4_F	TGG TGA CTG AGG AGT CTG	463 bp	59 °C
	CoxEx4_R	CAA GCT CGC ATC TTC TTC		

Tab. 14: PCR-Primer für die Amplifikation der *CAPNS1* Exons

Exon	Primer	Sequenz (5' - 3')	Länge des Produktes	T _M [°C]
exon 1	Ex1_F	CTC CTG AGA CCA AAA TTG TAG G	485 bp	58 °C
	Ex1_R	GCT TTG GGA CGA CAA TTC AC		
exon 2	Ex2_F	CCC CAG CCT AAT TAA TGT TC	448 bp	55 °C
	Ex2_R	CCC CAG TCA GAG GCT TC		
exon 3	Ex3_F	GCT TTT TTC AGA GGG ACA AGG	170 bp	58 °C
	Ex3_R	CCC TGG CTC TAC ACT AAC TTC		
exons 4-5	Ex4-5_F	TCT GTG GGG AAC AGG TTG	669 bp	57 °C
	Ex4-5_R	AGT CGG AGA CCC CTT CTC		
exons 5-6	Ex5-6_F	AAG GAA GGA AGG AAA TCC CAT C	377 bp	58 °C
	Ex5-6_R	TGC CCT TTA CGT GTA CAA TCC		
exons 7-9	Ex7-9_F	CCT CCA CCC ACT CTA CCC	895 bp	57 °C
	Ex7_9_R	AAT GAA GCC ACA CCC AAG		
exon 10	Ex10_F	CAG GGA TCG AAC CAG CAT C	186 bp	59 °C
	Ex10_R	TAT CCG AAA AGC CAA TCC CTT C		
exon 11	Ex11_F	CCA TCT GCT CCC AGG ACA G	706 bp	60 °C
	Ex11_R	AAA GAA CCC TTA TCC TGG GAT G		

8.4.3 Vollständige Primerliste

Tab. 15: Vollständige Primerliste

Nr.	Name	Sequenz	Länge	T _M [°C]	PCR-Produkt
1	LIPE1_f	AGC CAG TTC TTC CCT GTC	18	56	468 bp
2	LIPE1_r	TCC AGT CTC AAC ACC CAG	18	56	468 bp
3	LIPE2_f	TCT GAG CAG TGG GAC AAG	18	56	290 bp
4	LIPE2_r	AAC TGT CTT GGG GAC TGG	18	56	290 bp
5	RYR1_1_T7	AAC AAA CAA CCT AGG GCC	18	55	110 bp
6	RYR1_2_T7	CTC CCA CTT CCA ATC CTC	18	55	110 bp
7	RYR1_3_SP6	TTA CTT TGT CTC CGT GGG	18	54	114 bp
8	RYR1_4_SP6	GCT TGG TGA CTC CTA ACG	18	54	114 bp
9	COX7A1_1	AAC AGA AGC TCT TCC AGG	18	54	199 bp
10	COX7A1_2	TCG GTA CAG GAT GTT GTC	18	54	199 bp
11	CLIPR-59_1	TGA GCT GCA TTC TCA CTG AC	20	57	499 bp
12	CLIPR-59_2	CTC AAG CTC TGA GGG AAA GC	20	59	499 bp
13	CAPN4_1	TGT ATT CCT GAA CGG GAG	18	54	272 bp
14	CAPN4_2	TGC AAG AGA GGG CTA ATG	18	54	272 bp
15	POL2RI_1	ACC ACC CGT GCC AAA AG	17	54	172 bp
16	POL2RI_2	CCG CGC ACT GTG TGA CT	17	56	172 bp
17	APLP1_1	GTG GAC CCC ATG CTG ACC	18	60	194 bp
18	APLP1_2	TTC CAG ACC CCC TCC CTC	18	60	194 bp
19	RYR1_5_f	TAG CCT TTC CTG TGG AGG	18	56	423 bp
20	RYR1_6_r	ACA CAA AAG CAC ACA CCG	18	56	423 bp
21	TNNI3_1	TCG CTG ATC TGA ACC AGA	18	56	166 bp
22	TNNI3_2	TCC TCC TTC TTC ACC TGC	18	56	166 bp
23	COX6B_1	GCA CGT TTC CTG GGA AGA	18	56	116 bp
24	COX6B_2	TCA GGA TCT CAG GGT GGG	18	58	116 bp
25	TGFB_1	CTT CCT TCG GAC GTT ACC	18	56	
26	TGFB_2	ATA CCA CAG CTG CCA CAG	18	56	
27	GPI 07	ATT GAT TAG CGT TCC CTG	18	52	295 bp
28	GPI 08	AGT GAT TCT TAT GCC TCC	18	52	295 bp

29	GPI 09	CAT AAA GGA GGA TGT AGG	18	52	226 bp
30	GPI 10	AGT GTG GAT GGA GAA AAG	18	52	226 bp
31	714_A10A166_1_SP6	CGT CGA CAT TTA GGT GAC AC	20	57	409 bp
32	714_A10A166_2_SP6	AAC GCT ATT GAG CAG AAC AC	20	57	409 bp
33	714_A180093_1_T7	TTG CCC TCT CTG ATT GCA TC	20	58	500 bp
34	714_A180093_2_T7	AAG AGA TGG TCT GAC CAT GC	20	58	500 bp
35	714_G09A181_1_T7	AGC TGC ATT CTC ACT GAC AC	20	58	497 bp
36	714_G09A181_2_T7	CTC AAG CTC TGA GGG AAA GC	20	58	497 bp
37	714_G07A91_T7_1	ATG GAA GTT CCC AGT CTC	18	53	284 bp
38	714_G07A91_T7_2	GGC AAT CCA GGA ATA TGC	18	53	284 bp
39	714_G07A91_SP6_1	TGT GGC TTG GAT CCT GAG	18	56	330 bp
40	714_G07A91_SP6_2	GGA TGG GTG AGA CGT GAG	18	58	330 bp
41	714_L20_0072_BpSP6_1	GTT GCT GTG GCT GTG GTA	18	56	500 bp
42	714_L20_0072_BpSP6_2	CAG TGG CAA AAG GGC TGA	18	56	500 bp
43	714_L20_0072_T7_1	ACA GAA CTG ACT ATC CAA GG	20	55	488 bp
44	714_L20_0072_T7_2	CAT TAA CAT GTC TCG CAA GG	20	55	488 bp
45	714_N18_0085_T7_1	GTG CTG AGA TGA GCC ATC	18	56	435 bp
46	714_N18_0085_T7_2	GGG GGA TTA GGG AGA CAG	18	58	453 bp
47	714_N18_0085_BpSP6_1	CGA TCC CTG GCC TTG TTC AG	20	61	500 bp
48	714_N18_0085_BpSP6_2	ACA TCC ACC GAG GTG CAC AC	20	61	500 bp
49	714_H05_0074_BpSP6_1	AGG ATC CTT AGC CCA CTG	18	56	490 bp
50	714_H05_0074_BpSP6_2	TTC AAC CCC CCT CTT TCC	18	56	490 bp
51	714_H05_0074_T7_1	ACT CAG GGT CCT AGT CAG	18	56	496 bp
52	714_H05_0074_T7_2	CGC TAA GGG GTA TGT GAG	18	56	496 bp
53	714_H01_A166_SP6_1	CTG GCG TCG ACA TTT AGG	18	56	322 bp
54	714_H01_A166_SP6_2	GCA TAC ACT CAC CCA GTG	18	56	322 bp
55	714_M20_0046_1	CCA CTG CGG AAG AAC CTG	18	58	301 bp
56	714_M20_0046_2	AGC CTG CCA GGG ATT ACC	18	58	301 bp
57	714_D06_A204_T7_1	GGC GGG GAT TTC TCT CTC	18	59	221 bp
58	714_D06_A204_T7_2	CTG CAG AAG AGC CCG AAG	18	59	221 bp
59	714_D06_A204_BpSP6_1	TGG TGT GTC TCC GTT CTC AC	20	59	188 bp
60	714_D06_A204_BpSP6_2	TCA CAG GAG AGC CAT ACA GC	20	59	188 bp
61	714_D05_A475_T7_1	AGC CAG GAC CCA TCT TCC	18	58	234 bp
62	714_D05_A475_T7_2	CCA CCT CCA GGT CTT TGC	18	58	234 bp
63	714_D05_A475_BpSP6_1	AGG AGC GTG GCT GTT CTG	18	58	176 bp
64	714_D05_A475_BpSP6_2	GAC CCA GAA GCA GGT TGC	18	58	176 bp
65	NPHS1_SP6_1	CCC CAG ATC CAC CCC TAC	18	60	239 bp
66	NPHS1_SP6_2	GTG GGT CCC CAA ATT TCC	18	60	239 bp
67	714_A09_0061_T7_1	ACA GCC AAG CTC CAG CAC	18	58	175 bp
68	714_A09_0061_T7_2	AGC GCC AGG GAA AAG AAG	18	56	175 bp
69	714_F04_A54_T7_1	GTC CCC TCA GGA CCC AAC	18	60	169 bp
70	714_F04_A54_T7_2	GGG TAC CAT GCC CAG ATG	18	58	169 bp
71	714_H01_A166_1	TGC ATG CAT TGT TCG TTC	18	51	153 bp
72	714_H01_A166_2	GAC TGG CGA CAG GAA ATG	18	56	153 bp
73	GAPDS_1	CCC AGA CGT GTC TGT TGT G	19	59	136 bp
74	GAPDS_2	GCC CAT CCT CAT CCT AGT G	19	59	136 bp
75	MS_493_I04_BpSP6_1	TGC AGG TGC AGC CCT AAG	18	58	147 bp
76	MS_493_I04_BpSP6_2	TGG GCA AAG AAT CCA TCT G	19	58	147 bp
77	RP44_204_H11_BpSP6_1	CAC CAC CTC CGT GCC TAC	18	60	209 bp
78	RP44_204_H11_BpSP6_2	CAC CAG CCA GAG CAG AGG	18	60	209 bp
79	APLP1_SP6_1	TTG CAT GCA TTG TTC GTT C	19	60	167 bp
80	APLP1_SP6_2	TTG AGC AGA ACA CGA CTG G	19	58	167 bp
81	714_B10_A143_T7_1	GCA CAC CAA GGG ATG GTC	18	60	221 bp
82	714_B10_A143_T7_2	GAT GAG GTG GGC TTG GTG	18	60	221 bp
83	rhSCN1B_ex6_1	ATT GGC CGC TTC AGA CAC	18	57	230 bp
84	rhSCN1B_ex6_2	TGA GAG AGG GCG AGG TTG	18	57	230 bp
85	rhATP4A_ex16_1	AGG CAC ATA GGC CAC CAC	18	57	174 bp
86	rhATP4A_ex16_2	GGG GTG GAA AAC GAG AAG	18	57	174 bp
87	rhUBA2_ex1_1	CCG TGG GTG TCC TTG AAC	18	58	205 bp

88	rhUBA2_ex1_2	AGC AGC AGG TGA GGA AGC	18	58	205 bp
89	rhPRODH2_1	ACT CAC GGG CTG TTG CTC	18	60	256 bp
90	rhPRODH2_2	CAC ACC GCA GCA TAG CAC	18	60	256 bp
91	rhUSF2_ex4_1	TGA CAT ACC GCG TAG TCC AG	20	60	128 bp
92	rhUSF2_ex4_2	CAC ACC CAC CTG GGT CAC	18	60	128 bp
93	RP44_201I19_T7_1	TTC CAG CCC AAA GCT CAC	18	56	170 bp
94	RP44_201I19_T7_2	AGC GTG AAT CAG GCG AAC	18	56	170 bp
95	RP44_201I19_BpSP6_1	CCT GGC CTG GGA ACT TCT	18	60	250 bp
96	RP44_201I19_BpSP6_2	CCA CCT GCA GGA CTG ACC	18	60	250 bp
97	RP44_477F22_BpSP6_1	CCA AAG CAC CCG ACT GAC	18	58	194 bp
98	RP44_477F22_BpSP6_2	GGT GAC GAA GGA GGT TGG	18	58	194 bp
99	RP44_133I22_BpSP6_1	TAC CTC CGT GGC ATC CAG	18	58	216 bp
100	RP44_133I22_BpSP6_2	ACC GGG ATC TCC ATC CTC	18	58	216 bp
101	RP44_202N7_T7_1	TCC TGA CCC AGG CAG TTC	18	58	178 bp
102	RP44_202N7_T7_2	CCC TAT CAC CCC CAG CTC	18	58	178 bp
103	RP44_202N7_BpSP6_1	AGG GCT CAC CCT GTT TCC	18	60	161 bp
104	RP44_202N7_BpSP6_2	CCA TGG GCC TCA GTT GTC	18	60	161 bp
105	RP44_19_H1_T7_F	CGG GTT AAG GCT TCT GTG	18	59	100 bp
106	RP44_19_H1_T7_R	CAC GCT GGA AAC ACA TGG	18	59	100 bp
107	RP44_19_H1_BpSP6_F	CTT ACC TTG GGG ACA ACG	18	59	113 bp
108	RP44_19_H1_BpSP6_R	CAT CGC ACT GAA GTA TTG G	19	59	113 bp
109	RP44_280J23_BpSP6_F	TCT GTT GTG GAT CTC ACC TG	20	60	115 bp
110	RP44_280J23_BpSP6_R	TCC TAG TGT AGG CAA GGA TG	20	60	115 bp
111	PRODH2_F	CAT TCC CTA TGG CTC CTT G	19	58	105 bp
112	PRODH2_R	CTG AGC AGC TCC TGT TCC	18	58	105 bp
113	RP44_192_K2_SP6_F	CAA AAG GCT CTC CCC AGT C	19	56	184 bp
114	RP44_192_K2_SP6_R	CCG AAC ATT TGG CAG GAC	18	56	184 bp
115	RP44_183_I6_SP6_F	TGC TGG AGC ATG GAT TTG	18	54	173 bp
116	RP44_183_I6_SP6_R	TCC CTC CAT TCT TTT GCT G	19	54	173 bp
117	RP44_475I15_SP6_F	TGT GGT GTC TGG GGT TCC	18	58	151 bp
118	RP44_475I15_SP6_R	CAC CGA CCT CAT CCT TGG	18	58	151 bp
119	RP44_156_C24_T7_F	CGC AAC ATT GCC GAT TAC	18	56	182 bp
120	RP44_156_C24_T7_R	AGG AAG GGG CCT GAA GAG	18	56	182 bp
121	RP44_64_D14_SP6_F	AGT GGG TGT TGG CCT GAG	18	56	168 bp
122	RP44_64_D14_SP6_R	GGA AGA TTC GCC CCA AAG	18	56	168 bp
123	RP44_116_F14_T7_F	ATC CCG TTG CAC CAT AGC	18	56	178 bp
124	RP44_116_F14_T7_R	CTG GGA ACC TCC ACA TGC	18	58	178 bp
125	RP44_70_I20_SP6_F	CGA GTG CCA ACC CCA GAC	18	60	166 bp
126	RP44_70_I20_SP6_R	AGG GAC CCC ACT CCT CAG	18	60	166 bp
127	RP44_70_I20_T7_F	GGG GCC GTA GCT TTA ACC	18	58	208 bp
128	RP44_70_I20_T7_R	CAG ACC CCA ACC GTC AAC	18	58	208 bp
129	RP44_17_L3_T7_F	TTG CGG CCA GTT TCT AGC	18	58	166 bp
130	RP44_17_L3_T7_R	TCA GGA AGA GCC CAG GTG	18	58	166 bp
131	RP44_70I20_SP6_F1	TGC AGA GCT GGG AAG GTC	18	58	215 bp
132	RP44_70I20_SP6_R1	CCA GCA CAG CCA ACA GTG	18	58	215 bp
133	RP44_210_A15_SP6_F	TAC GTG GTT AGG CAG GTG	18	56	198 bp
134	RP44_210_A15_SP6_R	CCC CAG GAA GTC CCA GTC	18	60	198 bp
135	RP44_210_A15_T7_F	TTG GAG GCC TCT GCT CAC	18	58	232 bp
136	RP44_210_A15_T7_R	AGG ACC TTG GGG ATC TCG	18	58	232 bp
137	RP44_203_G19_T7_F	AGT GAC CCA AGC CAC TGC	18	58	195 bp
138	RP44_203_G19_T7_R	CCC CCT CCT TGT TTC TGG	18	58	195 bp
139	RP44_23_B18_T7_F	AAC CAG CTG CCA CAC TCC	18	58	175 bp
140	RP44_23_B18_T7_R	TGT CCC CAG AAC CGA GAG	18	58	175 bp
141	RP44_192_K2_T7_F	CTC CCT GGC CTC TCC TTC	18	60	181 bp
142	RP44_192_K2_T7_R	CAG GAC AGC ACC CCT AGC	18	60	181 bp
143	RP44_75_C1_SP6_F	CCG TTC GCA GAC CAT AGG	18	58	110 bp
144	RP44_75_C1_SP6_R	TGC ACA CCC TCC TGA ACC	18	58	110 bp
145	RP44_75_C1_T7_F	GAC CCT CAT GTG AGA AGT GC	20	61	105 bp
146	RP44_75_C1_T7_R	TCG GGA AAC TTA GCA AGG TG	20	61	105 bp

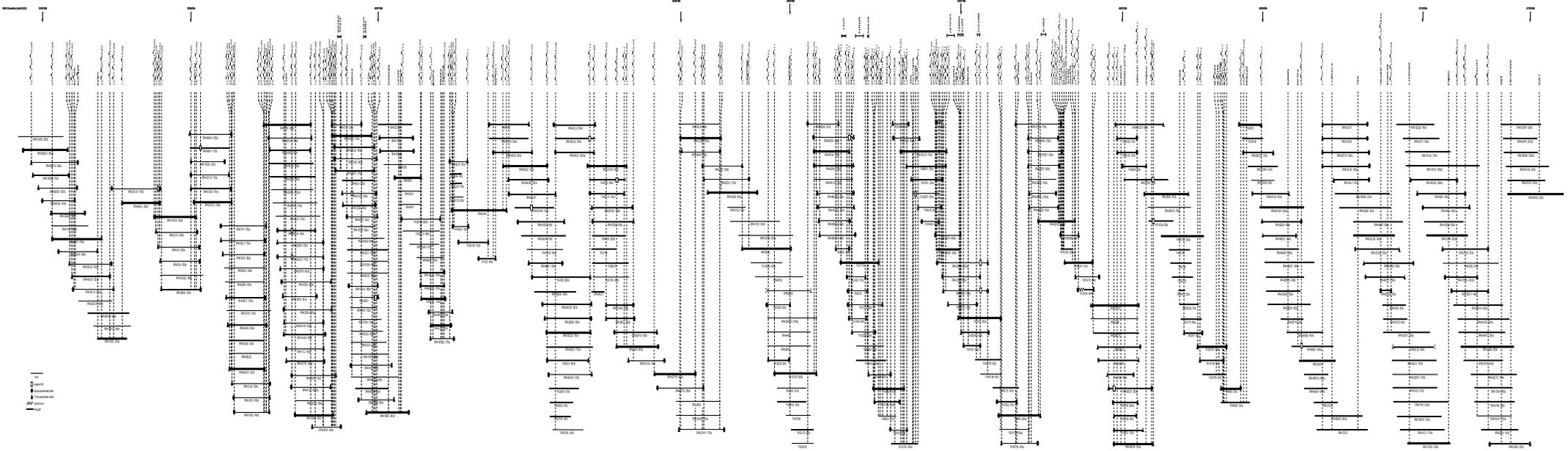
147	RP44_105_O13_SP6_F	CCC GTG TTC CTT CTC TGC	18	58	170 bp
148	RP44_105_O13_SP6_R	AGG GGA ACG ATG CCT GTC	18	58	170 bp
149	RP44_13_L20_T7_F	TGG ATG GAT GGG AAG GTC	18	56	156 bp
150	RP44_13_L20_T7_R	CGA GGG AGG AAA ACA AGG	18	56	156 bp
151	RP44_424_H18_SP6_F	CAG CCC CAG TCA GAG CAC	18	61	225 bp
152	RP44_424_H18_SP6_R	CCT AGC TCC CCG CTA ACC	18	61	225 bp
153	CD22ex2_1	CCC CTG CAC CTA CAG AGC	18	61	229 bp
154	CD22_ex2_2	CCC CAG CTG ACC ACT GTC	18	61	229 bp
155	GPR40ex1_F	CCT ACA ACG CCT CCA ACG	18	58	160 bp
156	GPR40ex1_R	CTT GCC GCA CAC ACT GTC	18	58	160 bp
157	RP44_268_I17_T7_F	AGC TGA ATC ACG GGG TTG	18	56	161 bp
158	RP44_268_I17_T7_R	ACA ATG GGG GCT TTC AGG	18	56	161 bp
159	RP44_229_J2_T7_F	TTT TGA GCC CAG AAT GTG C	19	56	170 bp
160	RP44_229_J2_T7_R	CGC ACG ACT GGT ACT TTC C	19	60	170 bp
161	RP44_75C1T7neu_F	CTC CAC CAA CCG GGT AAC	18	58	277 bp
162	RP44_75C1T7neu_R	ATC ACA CCC AAG GCA AGG	18	56	277 bp
163	RP44_64_D14_T7_F	GCT ATG TGG CCA TCT TTT CC	18	60	148 bp
164	RP44_64_D14_T7_R	CCT TGG ACC TTT GTG TAT GG	18	60	148 bp
165	RP44_240_L15_SP6_F	TTG TCA CTG CAG CAG CTC	18	56	201 bp
166	RP44_240_L15_SP6_R	CCC TCC ATT CTT TTG CTG	18	56	201 bp
167	RP44_240_L15_T7_F	TGC TGA CCC CTT GCT ACC	18	58	578 bp
168	RP44_240_L15_T7_R	GTT GGG CCA CAG GTT GTC	18	58	578 bp
169	RP44_71_A1_T7_F	AGT GGG TGT TGG CCT GAG	18	58	105 bp
170	RP44_71_A1_T7_R	CCC TGC AGA CCT TCC TTG	18	58	105 bp
171	RP44_352K9_SP6_R	GCG GGG ATT AGA GAG AGC	18	58	359 bp
172	RP44_352K9_SP6_F	CCT GAG GAT GTC CCT TGG	18	58	359 bp
173	RP44_272E4_T7_F	AGG CAA AGG GTT TCT CTC C	19	57	169 bp
174	RP44_272E4_T7_R	TGC AGA GAA TGT GGA AAG G	19	57	169 bp
175	RP44_319P6_SP6_F	GCC CCA CTG GGA AAG AAG	18	58	160 bp
176	RP44_319P6_SP6_R	AAA CCC TCC GCC ACT ACC	18	58	160 bp
177	RP44_322F22_T7_F	CCC TGT TCC ACA CAT CAG G	19	62	105 bp
178	RP44_322F22_T7_R	GAG GAG TGG GAG GGA CTG G	19	62	105 bp
179	RP44_352K9_T7_F	TTG GAG GCC TCT GCT CAC	18	58	232 bp
180	RP44_352K9_T7_R	AGG ACC TTG GGG ATC TCG	18	58	232 bp
181	RP44_374L12_T7_F	GGG AGG GGA TTT CTG GAG	18	58	201 bp
182	RP44_374L12_T7_R	CTT CCC AGC CTC CCA TAG	18	58	201 bp
183	RP44_376N2_SP6_F	TAT GGC CAC ACC ATA GCC	18	56	177 bp
184	RP44_376N2_SP6_R	ATG GCC CTG TGG GTT AAG	18	56	177 bp
185	RP44_376N2_T7_F	CTT CCT GCT CCC AAG CTC	18	58	171 bp
186	RP44_376N2_T7_R	AGA AGG CCA CCA GCA GTG	18	58	171 bp
187	RP44_464A14_SP6_F	TGG AGT GGG ACT CAG TGG	18	58	123 bp
188	RP44_464A14_SP6_R	CTT CCC AGC CTC CCA TAG	18	58	123 bp
189	RP44_302B9_T7n_F	GTC ACA AGA CTC ACG CCT CT	20	62	100 bp
190	RP44_302B9_T7n_R	GCC GAC AGC AGA CTG AAG GT	20	64	100 bp
191	RP44_358F1_SP6_F	GGT GAT CTT GGC GTT TGG	18	58	174 bp
192	RP44_358F1_SP6_R	TCA CCT CCT CTG CGA AGC	18	58	174 bp
193	RP44_358F1_T7_F	GCA CAA GTA GGG GCA AGC	18	58	452 bp
194	RP44_358F1_T7_R	CCT TTG AGG GCA GAG AGC	18	58	452 bp
195	RP44_347L14_SP6_F	ACA CTG CAG ACT TCC GAA AC	20	60	123 bp
196	RP44_347L14_SP6_R	TCA AAA GTA GCC AGC AGA GG	20	60	123 bp
197	RP44_347L14_T7_F	AGT GGC AGC CTC TTC TGG	18	58	197 bp
198	RP44_347L14_T7_R	TCC AGG GTG TTG GGA TTC	18	56	197 bp
199	RP44_353C16_T7_F	TTC GAA TCT GGA GGC AGA C	19	60	195 bp
200	RP44_353C16_T7_R	CAT TAG GGG AGG TCA CAC G	19	60	195 bp
201	RP44_404J10_SP6_F	GAT GGG CCG AGC AAT ATG	18	58	239 bp
202	RP44_404J10_SP6_R	AAG GGG GAC ACC TTC CAG	18	58	239 bp
203	RP44_404J10_T7_F	ACA CTG CAG ACT TCC GAA AC	20	60	123 bp
204	RP44_404J10_T7_R	TCA AAA GTA GCC AGC AGA GG	20	60	123 bp
205	KIAA1533_F	CCT CTG AGA TCC GCT ACC	18	58	ca. 220 bp

206	KIAA1533_R	GAG AGA TTC TCA GCC TTG G	19	58	enthält Intron
207	FLJ30663_F	ATC CTG TTC CCA AAC CAG	18	54	91 bp
208	FLJ30663_R	GCA CAG GTG CTT CTG GAG	18	58	(ZNF-Gen !!!)
209	HPN_F	CTG TGG CCC AGA CCT CAC	18	60	209 bp
210	HPN_R	GAT CTT GCC GTC CAC CAG	18	60	209 bp
211	UBA2_F	GAT GAT TCT GCT CCC TTT G	19	56	163 bp
212	UBA2_R	CAT TAA AAA GGC AAC ATG C	19	52	163 bp
213	RP44_4C3_T7_F	TAG TGC AGA ATC ATG GGG TAT AAT TT	26	70	101 bp
214	RP44_4C3_T7_R	CTA ATA TCC CCA AGA AAC AGG CTT T	25	70	101 bp
215	RP44_179O16_SP6_F	ACC AAT CGC TGG CAG AAG	18	56	209 bp
216	RP44_179O16_SP6_R	TGG AGA TTG CTC CGG TTC	18	56	209 bp
217	RP44_179O16_T7_F	AAG GGG CTA CCC TGT CTG	18	56	137 bp
218	RP44_179O16_T7_R	TAC ACA CAA CGC GGA TGG	18	56	137 bp
219	RP44_321F3_T7_F	CCA GTA TGC AGA TTT AAA AGG AA	23	60	104 bp
220	RP44_321F3_T7_R	TTC ATG TGT ATC CCT TTG CTG	21	60	104 bp
221	RP44_358F1_T7_F	GCA CAA GTA GGG GCA AGC	18	58	452 bp
222	RP44_358F1_T7_R	CCT TTG AGG GCA GAG AGC	18	58	452 bp
223	RP44_489P18_T7_F	ATT TGC TTG GCA CTT AAG TTT G	22	60	188 bp
224	RP44_489P18_T7_R	AAG AGC AAT AAA CGA AAG GTT G	22	60	188 bp
225	RP44_208A9_SP6_F	CAC ACC AGC AGC TTT TCT TG	20	60	212 bp
226	RP44_208A9_SP6_R	AAT GTA GGC CCA CAA TGG AG	20	60	212 bp
227	RP44_208A9_T7_F	ACA AAA GCC TGG CAA TAG GG	20	58	102 bp
228	RP44_208A9_T7_R	AGG TAC GAT TTG TGG CAA TC	20	58	102 bp
229	RP44_345L3_SP6_F	TCC CAA ACC CCA AGA AAA C	19	56	111 bp
230	RP44_345L3_SP6_R	TTC CTG CCT TTG TGA GTT G	19	56	111 bp
231	RP44_345L3_T7_F	CCC TCC TCT CCC ATA TTT TG	20	60	112 bp
232	RP44_345L3_T7_R	GGG AGC ACA TGG ATT AAA GG	20	60	112 bp

8.5 Contig-Karte

Physikalische Karte des isolierten BAC/PAC-Contig auf SSC 6q1.2 (Abb. 5).

Die STS-Marker sind ganz oben vertikal mit Namen sowie einer gepunkteten Linie dargestellt, cDNA Hybridisierungssonden sind ganz oben horizontal dargestellt, Gen-assoziierte Marker sind fett gedruckt. Die physikalischen Größen der Hybridisierungsmarker hängen von den Intron-Größen ihrer respektiven genomischen Ziele ab. BACs und PACs sind als horizontale Linien mit ihren Namen und Insertgrößen unterhalb der Marker dargestellt. Für die RPCI-44 BAC-Klone sind die vollen Namen dargestellt, während für die TAIGP714 PAC-Klone Abkürzungen benutzt wurden. So ist die offizielle Nomenklatur für den Klon (<http://www.rzpd.de>) TAIGP714G09A181 auf 714_G09A181 gekürzt worden. Ein minimaler Satz von 49 fettgedruckten Klonen („tiling path“) überspannt den ganzen Contig.



Lebenslauf

Name Rodja Christoph Voß-Nemitz
Geburtsdatum 06.07.1973
Geburtsort Bad Segeberg
Familienstand ledig, keine Kinder
Nationalität deutsch

SCHULAUSBILDUNG

06/1993 Allgemeine Hochschulreife an der Dahlmannschule, Bad Segeberg
1984 - 1993 Dahlmannschule, Bad Segeberg

STUDIUM

02/2005 Approbation als Tierarzt
1999 - 2005 Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover (TiHo)
08/1999 Diplom (Biologie)
1996 - 1999 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
1994 - 1996 Studium der Biologie an der Universität Hamburg

TÄTIGKEITEN

seit 03/05 Assistenztierarzt in der Tierklinik Kessler, Kosfeld, Tassani-Prell, Bessmann in Hofheim
06/03 - 07/03 Studentische Hilfskraft am Institut für Parasitologie der TiHo
12/01 - 01/03 Unterassistent in der Kleintierklinik der TiHo
11/00 - 04/01 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Tierzucht und Vererbungs-forschung der TiHo
08/99 - 10/99 Wissenschaftliche Hilfskraft am Tierärztlichen Institut der Universität Göttingen
07/98 - 04/99 Studentische Hilfskraft am Institut für Tierzucht und Haustiergenetik der Universität Göttingen
01/96 Studentische Hilfskraft am Zoologischen Institut der Universität Hamburg

DIPLOMARBEIT UND DISSERTATION

03/00 - 03/05 Dissertation am Institut für Tierzucht und Vererbungs-forschung der TiHo Hannover unter Anleitung von Prof. Dr. T. Leeb: „Erstellung eines BAC/PAC-Contigs auf SSC 6q1.2 und vergleichende Analyse dieser Genomregion“
11/98 - 08/99 Diplomarbeit am Tierärztlichen Institut der Georg-August-Universität Göttingen unter Anleitung von Prof. Dr. B. Brenig und PD Dr. T. Leeb: "Klonierung und strukturelle Analyse des Promotors und des 1. Exons des caninen Bassoon-Gens (*BSN*)"