

# INHALTSVERZEICHNIS

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND GLOSSAR

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>13</b>
1.1	Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	15
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b> .....	<b>16</b>
2.1	Lemuren auf Madagaskar.....	16
2.2	Der Graue Mausmaki ( <i>Microcebus murinus</i> ) .....	18
2.2.1	Taxonomische Einordnung .....	18
2.2.2	Vorkommen und Lebensweise.....	21
2.3	Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) .....	22
2.3.1	Struktur und Funktion des MHC.....	25
2.3.1.1	Struktur und Funktion der MHC-Klasse-I-Moleküle.....	26
2.3.1.2	Struktur und Funktion der MHC-Klasse-II-Moleküle .....	28
2.3.2	Evolution des MHC .....	30
2.3.3	Der MHC bei den Primaten .....	33
2.4	<i>MIC</i> -Gene ( <i>MHC-class-I-chain related genes</i> ) .....	34
2.5	Vergleich des MHC verschiedener Spezies; die <i>Framework</i> -Hypothese (AMADOU 1999) . .....	36
<b>3</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>37</b>
3.1	Chemikalien .....	37
3.2	Stammlösungen und Puffer .....	39
3.3	Zusammensetzung von Nährmedien .....	41
3.3.1	Nährmedien.....	41
3.3.2	Zusätze für die verschiedenen Nährmedien .....	41
3.4	Verwendete Kits.....	42
3.5	Verwendete Enzyme .....	42
3.6	Oligonukleotide.....	42
3.7	Verwendete Hybridisierungsproben .....	43

3.8	DNA-Längenstandards.....	46
3.9	Vektoren.....	47
3.10	Genbank .....	47
3.11	Verwendete BAC-Klone .....	49
3.12	Bakterienstämme und Bakterienkultur.....	49
3.12.1	Flüssignährmedien für Bakterien .....	49
3.12.2	Festnährmedien für Bakterien .....	50
3.13	Computerprogramme .....	50
3.13.1	Phylogenetische Stammbaumrekonstruktion.....	51
3.14	Einwegartikel .....	51
3.15	Geräte.....	52
3.16	Herstelleradressen .....	54
<b>4</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>57</b>
4.1	Allgemeine Richtlinien zur Arbeit mit Nukleinsäuren .....	57
4.2	Isolierung von Nukleinsäuren .....	57
4.2.1	Kleinansatz zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	57
4.2.2	Großansatz zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	58
4.3	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	59
4.3.1	Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektrometrie .....	59
4.3.2	Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel .....	60
4.4	Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen .....	60
4.5	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen .....	61
4.6	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen .....	62
4.7	Fällung und Konzentration von Nukleinsäuren .....	62
4.7.1	Ethanol- und Isopropanolfällung von Plasmid-DNA .....	63
4.7.2	Ethanol-fällung von Sequenzierungsreaktionsansätzen .....	63
4.8	Reinigung von Nukleinsäuren.....	64
4.8.1	Phenol-Chloroform-Extraktion .....	64
4.9	Übertragung von Nukleinsäuren auf Nitrocellulose .....	64
4.9.1	Transfer von DNA aus Agarosegelen – Southernblot (SOUTHERN 1975) .....	65
4.9.2	Herstellung von DNA dot blots (KAFATOS et al. 1979).....	66

4.10	Markierung mittels "Random-priming" Reaktion (FEINBERG u. VOGELSTEIN 1983) ..	66
4.11	Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren .....	67
4.12	Autoradiographie .....	68
4.13	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	68
4.13.1	Kolonie-PCR .....	70
4.14	Ligation von DNA .....	70
4.14.1	Ligation eines PCR-Produktes .....	71
4.14.2	Ligation von DNA-Fragmenten .....	72
4.15	Schrotschussklonierung .....	72
4.16	Dephosphorylierung freier 5'-Enden .....	73
4.17	Herstellung kompetenter Bakterienzellen .....	74
4.18	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen durch Elektroporation .....	74
4.19	Selektion transformierter <i>E. coli</i> -Zellen .....	75
4.20	Sequenzierung .....	76
4.21	<i>Screening</i> der BAC-Bank .....	77
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>78</b>
5.1	Etablierung von Hybridisierungsproben .....	78
5.2	Herstellung einer MHC-Klasse-I-Hybridisierungssonde .....	78
5.3	Herstellung von Hybridisierungssonden aus verschiedenen <i>Framework</i> - Genen .....	79
5.4	Isolierung von MHC-Gen-tragenden BAC-Klonen des <i>Microcebus murinus</i> .....	84
5.5	Physikalische Kartierung der verschiedenen MHC-Klasse-I-Regionen mittels Southernblot-Hybridisierung .....	85
5.5.1	Genomische Analyse des <i>BATI – TCF19</i> - Intervalls (Contig 1) .....	86
5.5.2	Genomische Analyse des <i>CAT56 – TRIM26</i> – Intervalls (Contig 2) .....	94
5.5.3	Genomische Analyse des <i>PPP1R11 – MOG</i> - Intervalls (Contig 3) .....	104
5.5.4	Genomische Analyse der zusätzlichen <i>TRIM26</i> - Region (Contig 4) .....	113
5.5.5	Überprüfung der erweiterten MHC-Klasse-II-Region des <i>Microcebus murinus</i> auf MHC-Klasse-I-Gene .....	116
5.6	Subklonierung und Sequenzierung einzelner BAC-Klone .....	121
5.7	Evolutionäre Analysen des Contig 1 .....	122

5.7.1	Vergleich des <i>NFKBIL 1- STG</i> - Intervalls bei <i>Microcebus murinus</i> und beim Menschen .....	122
5.7.2	Vergleich der MHC-Klasse-I-Sequenz des BAC-Klone 487C11 von <i>Microcebus murinus</i> mit MHC-Klasse-I-Sequenzen anderer Spezies.....	125
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>127</b>
6.1	Physikalische Kartierung des <i>BAT1 – TCF19</i> – Intervalls (Contig 1).....	129
6.2	Physikalische Kartierung des <i>CAT56 – TRIM26</i> – Intervalls (Contig 2).....	131
6.3	Physikalische Kartierung des <i>PPP1R11 – MOG</i> – Intervalls (Contig 3) .....	132
6.4	Physikalische Kartierung der zusätzlichen <i>TRIM26</i> – Region (Contig 4).....	133
6.5	Vergleich der MHC-Klasse-I-Regionen des <i>Microcebus murinus</i> mit verschiedenen Spezies .....	134
6.6	Ausblick .....	135
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>136</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>138</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>140</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>161</b>
10.1	Zusammenstellung der insgesamt erhaltenen BAC-Klone aus dem mehrfachen <i>Screening</i> der <i>Microcebus murinus</i> BAC-Bank.....	161
10.1.1	Auflistung der MHC-Klasse-I-positiven Klone.....	161
10.1.2	Auflistung der positiven BAC-Klone aus den Framework-Gen- <i>Screening</i> -Runden..	164