

2. Material

2.1 Fische

Die verwendeten Fische der Gattung *Xiphophorus* stammen aus geschlossenen Zuchten der Arbeitsgruppe von Prof. Scharl am Lehrstuhl für Physiologische Chemie I, Biozentrum der Universität Würzburg.

Es wurden Fische aus folgenden Populationen verwendet:

Xiphophorus maculatus, Rio Jamapa, Mexico (*X. mac*). Hier treten phänotypisch die Makromelanophorenmuster *Sd* ("spotted dorsal fin"), *Sp* ("spotted") und *Sr* ("stripe sided body") auf. *Sd* liegt gekoppelt mit dem RY (red-yellow)-Farbmustergen *Dr* ("dorsal red") auf dem X-Chromosom, während *Sr* zusammen mit *Ar* ("anal red") auf dem Y-Chromosom vorkommt. Bei *Sp* handelt es sich ebenfalls um ein X-chromosomales Gen. Die Weibchen dieses Stammes sind homogametisch (XX), die Männchen heterogametisch (XY). *Sd* und *Sp* bilden nach entsprechenden Kreuzungen maligne Melanome, während es bei *Sr* nur zu einer Verstärkung des Makromelanophorenmusters kommt. Als Kontrolle wurde außerdem *X. maculatus*, Rio Jamapa, verwendet, der keinerlei Makromelanophorenmuster ausprägt. Diese Fische wurden vom *Xiphophorus* Stock Center (San Marcos, TX) bezogen.

Xiphophorus helleri III und *F.O.I/8*, Rio Lancetilla, Belize bzw. Umgebung Tierra Blanca (*X. hell*). Fische des verwendeten Stammes besitzen kein Makromelanophorenmuster. Bei diesen Populationen sind keine Geschlechtschromosomen bekannt, sondern die geschlechtsdeterminierenden Faktoren sind über das gesamte Genom verteilt (Dzwillo & Zander, 1967). Indem ein Autosom in der Meiose mit dem Geschlechtschromosom anderer *Xiphophorus*-Arten paart, kann es dennoch zu fertilen Nachkommen aus interspezifischer Kreuzung kommen (Kosswig 1939).

Ferner wurden folgende Kreuzungsbastarde verwendet:

F₁ Bastarde zwischen *X. maculatus* und *X. helleri* (*X. mac/X. hell* F₁) wurden durch künstliche Befruchtung erhalten.

X. mac/X. hell BC₁-BC₅: Bastarde aus der ersten bis fünften Rückkreuzungsgeneration von *X. mac/X. hell* F₁ mit *X. hell*. Die Hälfte dieser Hybride sind sogenannte "Grüne", d.h. diese Fische entwickeln aufgrund des Fehlens des X-Chromosoms keine Melanome und entsprechen phänotypisch *X. helleri* Individuen. 25% der BC₁-Generation bilden gutartige, 25% bösartige Melanome aus. Die BC₂-BC₅-Generationen wurden durch Kreuzung von Hybriden, die das *X. maculatus* Esterase1-Isoenzym und einen gutartigen Tumorphänotyp aufwiesen, mit *X. hell* erhalten.

X. var/X. hell BC_n: Rückkreuzungshybride zwischen *X. variatus* (*X. var*), Rio Panuco, Mexiko mit *X. helleri* über mehr als 10 Generationen. Das von *X. var* stammende Geschlechtschromosom (X-Chromosom) trägt die Gene für das Makromelanophorenmuster *Li* ("lineatus") und das RY-Muster *Or* ("orange").

Bei den im folgenden aufgeführten Stämmen handelt es sich um geschlechtschromosomale Mutanten von *X. maculatus*, deren Phänotyp im Ergebnisteil genauer beschrieben ist:

Spotted4 (*Sp4*), Rio Usumacinta, Mexiko. Weibliche Fische dieses Stamms sind heterogametisch (W/Y^{Sp4}), die Männchen homogametisch (Y^{Sp4}/Y^{Sp4}). Es tritt kein RY-Farbmuster auf.

Nigra (*N1*), Belize River, Belize. Mit *N1* gekoppelt tritt das RY-Farbmuster *Br* ("brown") auf. Weibchen besitzen die Chromosomenkonstitution W/Y^{BrN1} , männliche Fische besitzen Y^{BrN1}/Y^{BrN1} .

Nigra-extended (*N2*), Laborstamm. Bei dem Y-Chromosom liegt ein *N1*-Chromosom vor, das eine nicht definierte Mutation beinhaltet. Weibchen sind wiederum heterogametisch (W/Y^{BrN2}), Männchen homogametisch (Y^{BrN2}/Y^{BrN2}).

Spotted belly (*Sb*), Laborstamm. *Sb* mit Lokalisation auf dem Y-Chromosom ist mit dem RY-Mustergen *Rt* ("ruby throat") gekoppelt. Weibliche Fische besitzen die Geschlechtschromosomen W/Y^{RtSb} , Männchen Y^{RtSb}/Y^{RtSb} .

Sr crossover 30⁸⁴B. In diesem Stamm ist das RY-Farbmustergen *Dr* abweichend mit dem Makromelanophorenmustergen *Sr* gekoppelt. Weibchen sind homogametisch (X^{DrSr}/X^{DrSr}) und prägen *Sr* und *Dr* aus, Männchen sind heterogametisch (X^{DrSr}/Y^{ArSr}) mit den RY-Farbmustern *Dr* und *Ar*.

Sr''. Das Y-Chromosom dieses Stammes trägt eine durch Behandlung mit Röntgenstrahlen induzierte Mutation (Anders et al., 1973). Weibchen sind heterogametisch ($W/Y^{ArSr''}$), Männchen homogametisch ($Y^{ArSr''}/Y^{ArSr''}$).

DrLi, Laborstamm. Das RY-Muster *Dr* ist mit einem mutanten Makromelanophorenlocus auf dem X-Chromosom gekoppelt. Weibchen besitzen die Geschlechtschromosomen X^{DrLi}/X^{DrLi} , Männchen $X^{DrLi}/Y^{ArSr''}$.

Lof-3: Diese Spontanmutation des Mdl^{Sd}-ONC-*Xmrk* X-Chromosoms wurde von A. und F. Anders isoliert.

DrLi (mut), Rückkreuzungsbastard von *DrLi*, der mehr als 10x mit *X. helleri* gekreuzt wurde. Das RY-Muster *Dr* blieb erhalten. Das mutante $X^{DrLi(mut)}$ -Chromosom befindet sich im genetischen Hintergrund von *X. helleri*. Mehr als 95% dieser Individuen sind weiblich, da der von *X. maculatus* stammende X-gekoppelte geschlechtsdeterminierende Faktor (*SD*) die polyfaktorielle Geschlechtsbestimmung von *X. hell* überdeckt.

Lof-2: Bei dieser "loss of function" Mutante handelt es sich um eine Spontanmutation von *Sd*, die in der dritten Rückkreuzungsgeneration von *X. mac/X. hell* mit *X. helleri* auftrat.

2.2 Fischzelllinien

PSM	"Platy Swordtail Melanoma" (Wakamatsu et al., 1981, 1984); aus dem amelanotischen Anteil eines spontanen Melanoms von Xiphophorus-Hybriden abgeleitete Zelllinie, die nur das Y-chromosomale Allel des <i>Xmrk</i> -Onkogens trägt, das überexprimiert wird.
SdSr24	Diese Zellen wurden aus Embryonen des Stadiums 24 eines <i>X. maculatus</i> Weibchens (<i>X^{SdDr}/X^{SdDr}</i>) kultiviert. Die Zellen weisen eine epitheliale Morphologie auf, sind di- bis tetraploid und besitzen neben INV- <i>Xmrk</i> das X-Allel des <i>Xmrk</i> Onkogens (Pagany, 1999).

2.3 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 α	supE44, Δ lacU169 (ϕ 80lacZDM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 (Sambrook et al., 1989)
<i>E. coli</i> LE392	supE44, supF58, hsdR514, galK2, galT22, metB1, trpR55, lacY1 (Murray et al., 1977)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, thi, recA1, gyrA96, relA1, λ -, lac- [F', proAB, lacZDM15, Tn10(tet)] (Bullock et al., 1987))

2.4 Vektoren

pUC18	2,69 kb (Yanisch-Perron et al., 1985)
Charon 40	(Dunn & Blattner, 1987)
Lawrist 7	8,19 kb

2.5 Oligonukleotide

Für die AP-PCR wurden speziell für diese Anwendung entwickelte 10mer Primer von Operon Technologies Inc. (CA, U.S.A.) verwendet (Kit A: 1-20). Weitere 10mer Oligonukleotide wurden von Eurogentec, Belgien bezogen.

U1	5'-TACAACGAGG-3'
U2	5'-TGGATTGGTC-3'
U3	5'-CTTTCTACCC-3'
U4	5'-TTTTGGCTCC-3'
U5	5'-GGAACCAATC-3'

U6 5'-AAACTCCGTC-3'
U7 5'-TCGATACAGG-3'

Die im folgenden aufgelisteten Oligonukleotide wurden von GIBCO BRL im Auftrag hergestellt.

Xer12a 5'-CTTTGCTACATGGATGACAGC-3'
Xer13a 5'-ACACATGTCCGGGCCTAGG-3'
p16F8 5'-TAAACCAGAACAATAAGTGG-3'
p16R16 5'-CTGTATTGCTCTTCGTCCA-3'
Act1 5'-GTAGGTGATGAAGCCCAGAGC-3'
Act2 5'-AGGGAGCTCGTAGCTCTTCTC-3'
Act3 5'-TGATGACCTGTCC-3'
EcoAd1 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
EcoAd2 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
MseAd1 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
MseAd2 5'-TACTCAGGACTCAT-3'
Eco+A 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
Mse+G 5'-GATGAGTCCTGAGTAAG-3'
Eco+ACC 5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3'
Eco+ATG 5'-GACTGCGTACCAATTCATG-3'
Eco+AAC 5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
Eco+AGA 5'-GACTGCGTACCAATTCAGA-3'
Eco+AGC 5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'
Eco+AGG 5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'
Eco+ACT 5'-GACTGCGTACCAATTCACT-3'
Eco+ATA 5'-GACTGCGTACCAATTCATA-3'
Mse+GCC 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGCC-3'
Mse+GAT 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGAT-3'
Mse+GAG 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGAG-3'
Mse+GTC 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGTC-3'
Mse+GCA 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGCA-3'
Mse+GTG 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGTG-3'
Mse+GAA 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGAA-3'
Mse+GGT 5'-GATGAGTCCTGAGTAAGGT-3'

Alle übrigen für die Amplifizierung von Bereichen der *Xmrk*-Gene verwendeten Oligonukleotide sind gesondert im Anhang aufgeführt.

Die folgenden beiden Oligonukleotide wurden vom Hersteller (MWG Biotech) am 5'-Ende fluoreszenzmarkiert.

Int6for flu 5'-CTCTGATTCAGGCTGTTAGG-3'

Int7rev flu 5'-CACTCTGCAGTATACAGAGG-3'

2.6 Hybridisierungssonden

Methyltransferaseprobe: ein ca. 900 bp cDNA-Fragment, das für die Aminosäuren 1115-1422 der Xiphophorus DNA-Methyltransferase kodiert (Altschmied et al., zur Publikation eingereicht).

0,7 kb *Bam*HI: in pBluescript II KS+ *Bam*HI kloniert (pBSSdBam49), beinhaltet ein 0,7 kb großes *Bam*HI Fragment aus dem ersten Intron von *Xmrk*.

5,3 kb *Eco*RI: in pBluescript II KS+ *Eco*RI kloniert (pBSSdEco108), enthält ein 5,3 kb großes *Eco*RI Fragment aus dem ersten Intron von *Xmrk*.

Xmrk cDNA: Ca. 4,1 kb großes *Xba*I/*Hind*III Fragment, in pBluescript II KS-*Eco*RI kloniert, das die cDNA von *Xmrk* enthält (pXmrk G4).

K-Probe: PCR Fragment, das mit den Primern Ins2/Hg80 aus *X. mac* amplifiziert wurde und ein etwa 360 bp großes Fragment darstellt, das Exon21 einschließlich der 5'-Sequenzen von Intron22 von *Xmrk* beinhaltet.

C-Probe: Ca. 300 bp großes PCR Produkt aus dem letzten Exon von *Xmrk*, amplifiziert aus *X. mac* mit den Primern Sw2/Sw1.

3'-Cosmidendprobe: Ca. 600 bp großes Endfragment, das nach Spaltung des INV2-Cosmids 008G01 mit *Pvu*II, Ligation von Linkern (LIS1/LIS2) und PCR mit dem Sp6-spezifischen Primermix erhalten wurde.

Ex1/Jd9: PCR Fragment, das mit den Primern Ex1/Jd9 aus *X. maculatus* Weibchen amplifiziert und anschließend mit *Ava*II gespalten wurde. Die Probe enthält auf das erste Exon folgende Intronsequenzen von *Xmrk*.

Hg51/Hg70: PCR Produkt, das mit den Primern Hg51/Hg70 aus *X. mac* amplifiziert wurde und genomische *Xmrk* Sequenzen von Exon7 einschließlich Exon17 enthält.

2.7 Enzyme und Enzymkits

Restriktionsendonukleasen	GIBCO BRL Life Technologies, Neu Isenburg New England Biolabs, Schwalbach
DNA-Polymerase I (Klenow)	GIBCO BRL Life Technologies, Neu Isenburg
T4 DNA-Ligase	GIBCO BRL Life Technologies, Neu Isenburg
T4 Kinase	GIBCO BRL Life Technologies, Neu Isenburg
ProteinaseK	Eurogentec, Belgien
RNaseA	Serva, Heidelberg
Lysozym	Eurogentec, Belgien
Taq Polymerase	Amersham Buchler, Braunschweig Promega, Mannheim
DNaseI	Pharmacia LKB, Freiburg
QIAEX Gelextraktionskit	QIAGEN, Hilden
Plasmid Midi Kit (25)	QIAGEN, Hilden
Cycle Sequencing™ Kit	Pharmacia LKB, Freiburg
Sequenase™ Kit	U.S.Biochemical
SureClone™ Ligation Kit	Pharmacia LKB, Freiburg

2.8 Radiochemikalien

[α - ³² P]dCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig Hartmann Analytic
[γ - ³² P]ATP (3000 Ci/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig Hartmann Analytic
[α - ³⁵ S]dATP (>1000 Ci/mmol)	Amersham Buchler, Braunschweig Hartmann Analytic, Braunschweig

2.9 Nylonmembranen

Hybond™ N+	Amersham Buchler, Braunschweig
------------	--------------------------------

2.10 Medien, Stammlösungen und Puffer

Sofern nicht extra erwähnt, wurden sämtliche Medien und Lösungen nach Sambrook et al., 1989 hergestellt.

MTB-Medium:	20%	Bacto Trypton
	5%	Bacto Hefeextrakt
	0,75%	KCl

Nach Autoklavieren und Abkühlung auf RT werden dem Medium 1,5 mM MgSO₄ zugefügt.

2.11 Sonstige Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von höchster Reinheit und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Roth GmbH, Karlsruhe

Sigma GmbH, Deisenhofen

Merck, Darmstadt

Difco Lab., Detroit, MI, U.S.A.

GIBCO BRL Life Technologies, Neu Isenburg

Serva, Heidelberg

Biozym Diagnostik, Hameln

Pharmacia LKB, Freiburg

2.12 Geräte

PCR-Maschinen

Hybaid OmniGene, MWG Biotech

PTC-100, MJ Research Inc., MA, U.S.A.

Zentrifugen

Eppendorf-Tischzentrifuge 5415 C

Sorvall[®] RC-5B (Rotor: SS34)

Labofuge^{GL}, Heraeus

Minifuge RF, Heraeus

Röntgenfilmentwickler

Protec Compact 35

Szintillationszähler

Beckmann LS 1801, Kontron MR300

UV Transilluminatoren

HerolabUVT 2020 (254 bzw. 366 nm)

UV Spektralphotometer

GeneQuant II, Pharmacia LKB, Freiburg

UV "Crosslinker"

GS Gene LinkerTM, Bio-Rad

Hybridisierungsöfen

Compact Line OV 4, Biometra

Sequenziergerät

A.L.F.TM DNA Sequencer, Pharmacia

Zellkulturinkubator

Heraeus

Verwendete Hard-und Software:

Macintosh Performa 5200 und Power Macintosh 4400/200

Microsoft[®] Word 5.1a

Microsoft[®] Excel 4.0

Deneba CanvasTM 3.0 und 5.0

Mapmaker Macintosh V2.0

Map Manager QTb11