

**Die geschlechtsbestimmende Region des Platyfisches  
*Xiphophorus maculatus* auf den  
Geschlechtschromosomen X und Y: Molekulare Analyse  
der genomischen Struktur und molekulargenetische  
Untersuchung von Genkandidaten**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Christina Schultheis**

aus  
Fulda

Würzburg, 2007

**Eingereicht am:**

**Mitglieder der Promotionskommission**

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Dr. M. Scharl

Gutachter: PD Dr. M. Alsheimer

**Tag des Promotionskolloquiums:**

**Doktorurkunde ausgehändigt am:**

## Vorwort und Danksagung

Wächst man so wie ich als Sandwichkind inmitten zweier Brüder auf -gegängelt mit immer neuen Boshaftigkeiten wie „Mädchen dürfen nicht mit Autos spielen“ oder „Tina, Pilze sind für Mädchen giftig, iss sie lieber nicht“- stellt man sich schon in frühester Kindheit die Frage: Warum gibt es eigentlich Männer? Daher möchte ich mich herzlichst bei meinen beiden Brüdern Thomas und Andreas bedanken, die mich schon früh für dieses Thema sensibilisiert haben.

Am Ende meiner Arbeit möchte ich mich denen widmen, die mich den ganzen Weg begleitet, geleitet und unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Manfred Scharthl sowie dem Zweitkorrektor meiner Arbeit PD Dr. Manfred Alsheimer und der gesamten Physiologische Chemie I für ein freundschaftliches, über das normale Maß hinausragendes, kollegiales Miteinander. Hervorheben möchte ich die Arbeitsgruppe Volff unter der Leitung von Prof. Dr. Jean-Nicolas Volff, dem Betreuer meiner Arbeit und Dr. Alexander Froschauer sowie Conny Schmitt, die mich mit der Thematik und Methoden unermüdlich vertraut gemacht haben. Des Weiteren bei Yvonne Selz, Astrid Böhne, Ingo Braasch und Quingchun Zhou (Sorry Ingo und Quingchun, Ladies first). Ich hoffe, dass unsere Freundschaft weit über die Zeit der Doktorarbeit hinausragt.

Besonders möchte ich mich bei Christoph und meiner Familie, meinen Eltern, Geschwistern und Omi für Rücksicht, Unterstützung und auch Vitamingeld bedanken. Insbesondere meiner Schwester Stephanie, die mir mit der Aussicht auf den Nobelpreis Mut machte (allerdings den einzigen, der in Oslo verliehen wird): „Wenn ihr daran forscht, dass es irgendwann mal keine oder andere Männer gibt, müsstet ihr eigentlich den Friedensnobelpreis dafür erhalten!“

Ganz herzlichen Dank an alle, die ich hier vergessen haben sollte.

Meinen Eltern



## Inhaltsverzeichnis

<b>Vorwort und Danksagung</b>	1
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	3
<b>Zusammenfassung</b>	10
<b>Abstract</b>	13

### **A.** Einleitung 15

1.	Evolution der sexuellen Fortpflanzung und Geschlechtsbestimmungssysteme	15
1.1	Kosten und Nutzen der sexuellen Fortpflanzung	15
1.2	Geschlechtsbestimmungssysteme und Geschlechtsbestimmungsmechanismen in Vertebraten	16
1.2.1	Geschlechtsbestimmungsmechanismus und Geschlechtsbestimmungssysteme in Säugetieren	17
1.2.2	Geschlechtsbestimmungssysteme und Geschlechtschromosomen in Tetrapoden (ausgenommen den Säugetieren)	19
1.2.3	Geschlechtsbestimmungssysteme und Geschlechtsbestimmungsmechanismen in Fischen	21
2.	Evolution der Geschlechtsbestimmungsmechanismen und Geschlechtschromosomen: Variatio delectat? - Variabilität trifft Konservierung	22
3.	Fische als genetische Modellorganismen	27
4.	Modellorganismus <i>Xiphophorus</i>	30
4.1	Geschlechtsbestimmung und Geschlechtschromosomen in <i>Xiphophorus</i>	31
4.1.1	Geschlechtschromosomen und Geschlechtsbestimmungsmechanismus in <i>Xiphophorus maculatus</i>	31
4.2	Das <i>Xiphophorus</i> Melanom-Modell	33
4.2.1	Onkogen und Protoonkogen flankieren die geschlechtsbestimmende Region auf den Geschlechtschromosomen	35

## B. Material 39

1.	Fische	39
2.	Genomische Bibliotheken	39
3.	Bakterienstämme und Vektoren	40
4.	Enzyme	40
5.	Medien, Zusätze und Pufferlösungen	40
6.	Sonstige Chemikalien	40
7.	Oligonukleotid-Primer	41
8.	Geräte, Hard- und Software	42

## C. Methoden 43

1.	Molekularbiologische Methoden	43
1.1	Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	43
1.1.1	Isolierung hochmolekularer genomischer DNA aus Fischen	43
1.1.2	Isolierung von Plasmid-, Cosmid-, BAC-DNA	44
1.1.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab	44
1.1.2.2	Isolierung von Plasmid-, Cosmid- und BAC-DNA mittleren Maßstabes	44
1.1.2.3	Isolierung von RNA aus verschiedenen Geweben	44
1.2	Aufarbeitung von Nukleinsäuren	45
1.2.1	Restriktionsanalyse	45
1.2.2	RFLP (Restriktions-Fragment-Polymorphismus)-Analyse	46
1.2.3	Gelelektrophorese von DNA und RNA	46
1.2.3.1	Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA	46
1.2.3.2	PFGE (“Pulsed-Field-Gel-Electrophoresis”)	46
1.2.4	Fragmentisolierung (Gelextraktion)	47
1.2.5	Southern-Blotting Verfahren	47
1.3	Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten	48
1.3.1	Klonierung von PCR-Produkten	49
1.3.2.	Klonierung zufällige zerkleinerter DNA-Fragmente verschiedener BAC (artifizielles Bakterienchromosom) –Klone (Schrotschuss-Methode)	49

1.3.3	Transposon-Mutagenese	50
1.3.4	Sequenzanalysen	51
1.4	DNA-Hybridisierung nach Southern-Blotting	52
1.5	Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden	53
1.5.1	Markierung von DNA-Fragmenten durch random-priming mittels Hexanukleotiden	53
1.5.2	Markierung von DNA-Fragmenten durch PCR	54
1.6	Polymerase-Kettenreaktion	54
1.6.1	Standard-PCR	54
1.6.2	Anwendungen der PCR	55
1.6.2.1	Amplifizierung von 5' und 3'-cDNA-Enden (RACE; Rapid amplification of cDNA ends)	55
1.6.2.2	Amplifizierung von BAC-Enden (Linker-PCR nach Riley, 1990)	55
1.6.2.3	Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	56
1.6.2.4	Hot-PCR	57
1.7	Synthese und Verarbeitung von RNA	57
1.7.1	cDNA Synthese durch Reverse Transkription von RNA	57
1.7.2	In-vitro-Transkription (RNA-Synthese)	57
1.8	Untersuchung der Genexpression durch <i>In-situ</i> -Hybridisierung	57
1.8.1	<i>In situ</i> -Hybridisierung (in Geweben sowie auf Parafinschnitten)	57
1.8.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung auf Gewebeschnitten	57
1.8.3	<i>In situ</i> -Hybridisierung in Gewebe und Embryonen	59
2.	Cytogenetische Methoden	60
2.1	Chromosomen-Präparation und Fixierung	60
2.2	C-Banding	60
2.3	Herstellung von FISH-Sonden (Random Priming)	61
2.4	FISH (Fluoreszenz <i>In situ</i> Hybridisierung mit zwei Markern) auf Metaphasechromosomen (Protokoll C. Ozouf Costaz unveröffentlicht)	61

## D. Ergebnisse:

63

1.	Abdeckung der geschlechtsbestimmenden Region mit BAC-Klonen	63
1.1	Aufbau der Contigs der geschlechtsbestimmenden Region von <i>Xiphophorus maculatus</i>	63
1.2	Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Diplomarbeit	67
1.3	Abdeckung des Y Chromosoms mit BAC-Klonen	67
1.3.1	Erweiterung des Y-chromosomalen <i>Xmrk</i> -Contigs	67
1.3.2	Schließen der Lücke auf dem Y-chromosomalen <i>Xmrk</i> -Contig mittels Cosmid-Bibliothek-Klonen	72
1.3.3	Erweiterung des Y-chromosomalen <i>Xmrk</i> -Contigs in 3'-Richtung	76
1.3.4	Erweiterung des Y-chromosomalen <i>Xmrk</i> -Contigs mit Hilfe verschiedener Genkandidaten	78
1.3.4.1	<i>Cad20</i> als Marker zur Erweiterung des Y-chromosomalen <i>Xmrk</i> -Contigs	78
1.3.4.2	<i>Fah</i> als Marker zur Erweiterung des Y-chromosomalen <i>Xmrk</i> -Contigs	79
1.4	Zusammenführung des Y-chromosomalen <i>Xmrk</i> -Contigs mit dem <i>Y-cript</i> -Contig	81
1.5	Abdeckung des X Chromosoms mit BAC-Klonen	83
1.5.1	Erweiterung des X-chromosomalen <i>Xmrk</i> -Contigs	83
1.5.2	Erweiterung des X-chromosomalen <i>Xmrk</i> -Contigs durch Klone, identifiziert bei der Erweiterung des Y chromosomalen <i>Xmrk</i> -Contigs und FISH Analyse	84
1.5.3	Strategie zur Anfügung des X-chromosomalen <i>cad20</i> -Contigs an das X-chromosomale <i>egfrb</i> - oder <i>Xmrk</i> - Contig	87
1.6	Chromosomale Zuordnung verschiedener Klone	88
1.7	Das X- und Y-chromosomale <i>egfrb</i> -Contig	92
1.8	Zusammenfassung Kapitel D1	97
2.	Molekulare Analyse der Geschlechtsbestimmenden Region	97
2.1	Transponierbare Elemente, endogene Retroviren und sich wiederholende Sequenzen in der Geschlechtsbestimmenden Region	97
2.1.1	<i>MIToy</i> , Identifizierung eines MITE („miniatur inverted repeat transposable element“) Transposons in der Geschlechtsbestimmenden Region	98

2.1.2	<i>Fishmy</i> , Identifizierung eines neuen endogener Retrovirus in <i>Xiphophorus</i> mit Foamy-Virus verwandter pol Sequenz	102
2.2	Genkandidaten in der geschlechtsbestimmenden Region: Molekulargenetische und bioinformatische Analyse	104
2.2.1	Fredi, ein möglicher Transkriptionsfaktor mit Helix-turn-Helix-Motif	106
2.2.2	<i>Fah</i> ein Genkandidat mit unbekannter Funktion in der geschlechtsbestimmenden Region	107
2.2.2.1	Expressionsanalysen von <i>fah</i> in <i>Xiphophorus maculatus</i> , Identifizierung von <i>fah</i> -Isoformen mit unterschiedlicher Expression	110
2.2.2.2	Lokalisierung der <i>fah</i> -Isoform im Ovar und frühem Embryostadium	112
2.2.2.3	Lokalisierung der Hoden spezifischen <i>fah</i> -Isoform <i>herrenfahrrad</i>	113
2.2.2.4	Genomische Lokalisierung von <i>fah</i> in der Geschlechtsbestimmenden Region	114
2.2.2.5	<i>Fah</i> -Orthologe in anderen Fischarten	116
2.2.2.6	<i>Fah</i> in Medaka: Identifizierung und Expressionsanalysen	117
2.2.2.7	<i>Fah</i> in Zebrafisch, Identifizierung und Expressionsanalysen	118
2.2.2.8	Genomische Umgebung von <i>fah</i> in verschiedenen Fischarten, Identifizierung von Genkandidaten	119
2.2.3	<i>tan</i> ein zu <i>fah</i> verwandter und gekoppelter Genkandidat	120
2.2.3.1	Expressionsanalysen von <i>tan</i> in <i>Xiphophorus maculatus</i>	124
2.2.3.2	Medaka- <i>tan</i> , Datenbank- und Expressionsanalysen	125
2.2.3.3	Ist <i>tan</i> auch ein Zebrafisch-Gen?	127
2.2.4	Orthologe <i>fah/tan</i> Sequenzen in Tetrapoden	128
2.2.5	Weitere Genkandidaten in der Umgebung von <i>fah</i> in der geschlechtsbestimmenden Region von <i>Xiphophorus maculatus</i>	129
2.2.5.1	<i>Cadherin</i> , Eine Zell-Zell Adhäsionsprotein in der geschlechtsbestimmenden Region	129
2.2.5.2	Genkandidat <i>KIAA0241</i>	132
2.2.5.3	Genkandidat <i>RNF31</i>	133
2.3	Genomische Struktur der geschlechtsbestimmenden Region	135
2.3.1	Y-spezifische Sequenzen in der Geschlechtsbestimmenden Region	136
2.3.2	Genomische Umordnungen zwischen dem X und Y Chromosom in der geschlechtsbestimmenden Region	138

## E. Diskussion

141

1.	Probleme bei der Erweiterung X- und Y-chromosomaler Contigs der geschlechtsbestimmenden Region und Möglichkeiten zur Fortführung der Erweiterung	141
2.	Molekulare Analyse der geschlechtsbestimmenden Region	144
2.1	Transponierbare Elemente in der geschlechtsbestimmenden Region	144
2.1.1	Einfluss transponierbarer Elemente auf die Evolution von Geschlechtschromosomen	144
2.2.2	Einfluss transponierbarer Elemente und Wiederholungssequenzen auf die genomische Struktur der geschlechtsbestimmenden Region von <i>Xiphophorus maculatus</i>	145
2.1.3	Einfluss transponierbarer Elemente auf Pseudogenentstehung in der geschlechtsbestimmenden Region von <i>Xiphophorus maculatus</i>	146
2.1.4	<i>MIToy</i> , ein MITE (Miniature inverted transposable Element)-Transposon im Kontext	147
2.2	Genkandidaten und Pseudogene in der geschlechtsbestimmenden Region	148
2.2.1	Duplikationsereignisse in der geschlechtsbestimmenden Region: Genduplikationen und Genamplifikationen	148
2.2.2	Pseudogene und deren Einfluss auf den Mechanismus der Geschlechtschromosomendifferenzierung	149
2.2.3	Die Genkandidaten <i>fah</i> und <i>tan</i>	150
2.2.3.1	<i>Fah</i> und <i>tan</i> entstanden mutmaßlich durch ein altes Genduplikationsereignis	150
2.2.3.2	Funktion von <i>fah</i> und <i>tan</i> und Identifizierung einer möglichen neuen Proteindomäne in <i>fah</i> und <i>tan</i>	151
2.2.3.3	<i>Fah</i> ein möglicher Kandidat für Geschlechtsbestimmung und Geschlechtsdifferenzierung in <i>Xiphophorus maculatus</i>	152
3.	Vergleichende Genomanalyse der geschlechtsbestimmenden Region mit Fisch und Tetrapoden	152

## F. Anhang

157

1.	Tabellen	157
2.	Literaturverzeichnis	162
3.	Publikationsliste	175
3.1.	Rezensierte Fachzeitschriften	175
3.2.	Fachbücher und nicht rezensierte Fachzeitschriften	175
4.	Vorträge und Konferenzbeiträge	176
4.1.	Vorträge	176
4.2.	Posterpräsentationen	176
5.	Lebenslauf	179
6.	Ehrenwörtliche Erklärung	180

## Zusammenfassung:

Mit über 24.000 Arten sind etwa die Hälfte aller heute lebenden Wirbeltiere Fische. Im Gegensatz zu Vögeln oder Säugetieren weisen Fische eine erstaunliche Vielfalt und Variabilität der Geschlechtsbestimmungsmechanismen auf. Sämtliche Formen von Zwitterigkeit sowie umweltbedingte und genetische Geschlechtsbestimmung sind beschrieben worden. Die molekularen Grundlagen der genetischen Geschlechtsbestimmung bei Fischen sind jedoch weitgehend unbekannt. Für einige Fischarten, wie etwa der Zebrafisch, die beliebte Modellorganismen zur Untersuchung z.B. von Krankheiten sind, liegen bereits sequenzierte Genome vor. Dennoch sind diese Modellorganismen aufgrund bisher nicht identifizierbarer Geschlechtschromosomen oder fehlender geschlechtsgebundener molekularer Marker als Modellorganismen zur Untersuchung der genetischen Geschlechtsbestimmung und der Evolution der Geschlechtschromosomen ungeeignet. Bei Stichling und Medaka, ebenfalls Fische mit vollständig sequenzierten Genomen, konnte hingegen die geschlechtsbestimmende Region identifiziert werden. Im Medaka ist bereits das geschlechtsbestimmende Gen identifiziert worden, eine Y-spezifische Kopie des Gens *dmrt1*. *Dmrt1bY* konnte aber lediglich in einigen Medaka Arten nachgewiesen werden und stellt somit keinesfalls das universelle geschlechtsbestimmende Gen der Fische dar. Da die geschlechtsbestimmenden Regionen von Medaka und Stichling evolutionär gesehen relativ jung und linienspezifisch sind, spiegeln sie nur begrenzt den evolutionären Verlauf der Entstehung von Geschlechtschromosomen und Geschlechtsbestimmungsmechanismen wider.

Der Platyfisch *Xiphophorus maculatus* ist ein hervorragender Modellorganismus zur Untersuchung der Geschlechtsbestimmung und Evolution von Geschlechtschromosomen. Er wird seit Ende 1920 zur Untersuchung von malignen Melanomen verwendet. Interspezifische Hybride bilden durch die kreuzungsbedingte Aktivierung eines Tumorlocus erbliche Melanome aus. Der Tumorlocus konnte bereits molekular identifiziert werden. Er entspricht dem Onkogen *Xmrk*, das durch eine *Xiphophorus*-spezifische Duplikation des Protoonkogens *egfrb* gebildet worden ist. Onkogen und Protoonkogen, die beide für epidermale Wachstumsfaktorrezeptoren codieren, befinden sich in der Subtelomerregion auf den Geschlechtschromosomen des Platyfisches. Sie flankieren die etwa 1 Mb große geschlechtsbestimmende Region. Neben dem geschlechtsbestimmenden Locus sind verschiedene pigmentzelldefinierende Loci in



dieser Region vorzufinden. Die Geschlechtschromosomen X und Y des Platyfishes sind sehr homolog, lassen sich aber sowohl cytogenetisch als auch genetisch gut voneinander unterscheiden.

Zur Untersuchung der genetischen Struktur der geschlechtsbestimmenden Region und zur Identifizierung des geschlechtsbestimmenden Gens mittels positioneller Klonierung, wurde eine artifizielle Bakterienchromosom-(BAC) Bibliothek aus männlichen Platyfishen (Genotyp XY) angelegt. Onkogen und Protoonkogen sowie verschiedene andere X- und Y-chromosomale molekulare Marker wurden als Startpunkte für „Chromosomen-Walking“ und den Aufbau von X- und Y-chromosomalen artifizielle Bakterienchromosom (BAC)-Contigs verwendet. Hauptaufgabe meiner Doktorarbeit war die Erweiterung und physikalische Verknüpfung verschiedener X- und Y-chromosomaler Contigs mittels molekularbiologischer und cytogenetischer Methoden sowie die Identifizierung von Genen mittels Bioinformatik und funktioneller Analyse. Bis zum jetzigen Zeitpunkt decken die BAC-Contigs 3,1 Mb auf dem Y-Chromosom und 3,8 Mb auf dem X-Chromosom in der geschlechtsbestimmenden Region ab. Sie stellen mitunter die größten geschlechtschromosomalen Contigs bei Fischen dar. Die X- und Y-chromosomalen Contigs werden derzeit in Kollaboration mit dem Sequenzierungszentrum Genoscope in Frankreich komplett durchsequenziert.

Erste Sequenzanalysen weisen auf eine molekulare Differenzierung zwischen den X- und Y-Geschlechtschromosomen in der geschlechtsbestimmenden Region hin. Es konnten ein duplizierter Bereich auf dem Y Chromosom sowie eine Inversion in der geschlechtsbestimmenden Region identifiziert werden. Nichthomologe Rekombinationsereignisse zwischen transponierbaren Elementen und wiederholende Sequenzen sind mutmaßlich an dieser molekularen Umordnung beteiligt. Solche transponierbaren und sich wiederholenden Elemente akkumulieren in der geschlechtsbestimmenden Region und erschwerten auch maßgeblich Aufbau und Ausweitung der geschlechtschromosomalen Contigs. Während die meisten Elemente auf beiden Geschlechtschromosomen zu finden sind, konnten auch Y-spezifische Kopien nachgewiesen werden, wie beispielsweise der endogene Retrovirus *foamy*.

Eine Reihe von Genkandidaten wurden in der geschlechtsbestimmenden Region identifiziert. Einige stellen aussichtsreiche Kandidaten für den geschlechtsbestimmenden Locus dar. So ist das Gen *fredi*, das für einen putativen Transkriptionsfaktor mit Helix-Turn-Helix Motiv codiert, im Hoden stark exprimiert. Verschiedene *fredi* Kopien sind auf dem X und Y Chromosom in der geschlechtsbestimmenden Region identifiziert worden.

Interessanterweise ist die codierende Sequenz der X-chromosomalen *fredi* Kopien durch ein transponierbares Element zerstört. Die Y-chromosomalen Kopien sind hingegen scheinbar nicht beeinträchtigt.

Zwei weitere miteinander verwandter Genkandidaten namens *fah* und *tan*, die bislang für Genprodukte mit unbekanntem Eigenschaften codieren, liegen nebeneinander in der geschlechtsbestimmenden Region vor. Expressionsanalysen beider Gene weisen eine spezifische Expression im Ovar und zwar in der vegetativen Hemisphäre der Oocyten auf. Orthologe Gene wurden in Medaka und Zebrafisch identifiziert und kloniert. Expressionsanalysen in Medaka zeigten eine Ovar-spezifische Transkription wie in *Xiphophorus*, während im Zebrafisch *fah* und *tan* ubiquitär exprimiert sind. Interessanterweise konnte im Platyfisch eine Spleißvariante von *fah* identifiziert werden, die auch im Hoden exprimiert ist. Dies macht *fah* zu einem vielversprechenden Kandidaten für den geschlechtsbestimmenden Locus. Die genomischen Regionen, in der *fah* und *tan* bei anderen Fischarten wie Medaka, Zebrafisch und Kugelfisch identifiziert wurden, zeigen hohe Syntenie zur geschlechtsbestimmenden Region des Platyfisches und könnten auch bei diesen Fischarten eine Rolle in der Geschlechtsbestimmung spielen. Ein einziges Gen, das mit *fah* und *tan* verwandt ist, konnte auch in Maus, Huhn und Frosch nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte auf dem menschlichen X-Chromosom eine mit Stoppcodons durchzogene, zu *fah/tan* homologe Pseudogene Sequenz identifiziert werden. Diese Syntenie zwischen Geschlechtschromosomen von Fischen und Säugern könnte auf eine evolutionär sehr alte geschlechtsbestimmende Region der Wirbeltiere hindeuten.

Zusammenfassend hat diese Arbeit neben neuen Erkenntnissen über die Evolution der Geschlechtschromosomen bei Fischen verschiedene Genkandidaten für den geschlechtsbestimmenden Locus geliefert, die nun auch funktionell analysiert werden müssen.

## Abstract

Fishes are the species richest vertebrate group. Contrary to the situation known from birds and mammals sex determination in fish is extremely variable. All possible forms of hermaphroditism, environmental and genetic sex determination have been described. The molecular basis of genetic sex determination remains extensive unknown so far. Famous fish models such as the zebrafish are useless to investigate sex chromosome evolution since sex chromosomes are not recognizable, and no sex-linked genetic loci or molecular markers have been identified. In the pufferfish *Tetraodon* nothing is known about the sex determination. However, in Medaka and three-spine stickleback, also fishes with sequenced genomes, the sex determining regions have been identified and the master sex determining gene in Medaka has been already identified. It displays a Y-specific copy of the gene *dmrt1*. *Dmrt1bY* has been detected only in some Medaka-species and therefore could not represent the universal master sex-determining gene in fish. The sex-determining regions of Medaka and stickleback are, from the evolutionary point of view, relatively young and lineage-specific and do not reflect the evolution of sex chromosome and sex chromosome differentiation.

The platyfish *Xiphophorus maculatus* is an excellent model organism to investigate vertebrate's sex chromosome evolution and sex determination. The sex chromosomes (XY) of the platyfish are poorly differentiated but genetically well-defined and the sex-determining (SD) region, subtelomeric on the sex chromosomes is delimited by markers identified at the molecular level. Beside the master sex-determining locus several other loci involved in pigmentation and cancer formation are arranged in this region. The molecular nature of these different loci is unknown so far. Using the molecular markers, *Xmrk* an oncogene and its protooncogenic ancestor *egfrb* (both encoding for epidermal like growth factor receptor tyrosine kinases) as starting point for chromosome walking, bacterial artificial chromosome (BAC) -contigs have been assembled covering megabases on the X and the Y chromosome. These contigs are going to be sequenced to near completion in collaboration with GENOSCOPE, Paris, France and Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France.

Primary sequence analysis revealed initial molecular differentiation between the X and the Y chromosomes in the sex-determining region. Differential duplications, deletions, inversions and transpositions have been identified. The high number of transposable and repeated elements and endogenous retroviruses identified in the sex-determining region

might play a role in rearrangements caused by non-homologous recombination between elements. Besides, genes from the sex-determining region have been affected by transposable elements. For example the X chromosomal copies of the gene candidate *fredi* (encoding for a DNA binding protein with helix turn helix domain) have been disrupted by the transposable element *MIToy*, (a miniature inverted repeat transposable element, MITE) whereas the Y chromosomal copies remain apparently functional. Most transposable elements and endogenous retroviruses identified in the sex-determining region are present on both sex chromosomes. However, some Y-specific sequences have been identified, for example a Y-specific cluster of the LTR-like repeat *xir* and one copy of an endogenous retrovirus called *fishmy* similar to the *foamy* virus of mammals.

About 40 genes have been identified so far by sequence analysis, some of them having no known functions in other organisms. Several genes show a sexual dimorphic expression in gonads and are candidates for the sex-determining locus.

The linked gene candidates *fah* (Fahrrad) and *tan* (Tandem) encode for an unknown protein-product. Both genes are preferentially expressed in the ovary, more precisely in the vegetal hemisphere of the oocytes. Orthologues sequences to *fah* and *tan* have been identified and cloned in Medaka and zebrafish. The expression pattern in Medaka is similar to *Xiphophorus*, whereas zebrafish *fah* and *tan* are rather ubiquitously expressed. Interestingly an isoform of *fah* with an alternative start codon has been identified in *Xiphophorus maculatus* being preferentially expressed in ovary and also in testis, making *fah* to a promising gene candidate for the master sex-determining locus. Comparative genomics distinguished regions in Medaka, Tetraodon and zebrafish highly syntenic to the sex-determining region of *Xiphophorus maculatus*. These regions might be involved in sex determination in Tetraodon and zebrafish.

*Fah* and *tan* have been identified in frog, dog and chicken but only as single gene called *velo*. Therefore *fah* and *tan* seems to have arisen by old fish specific gene duplication independent of the whole genome duplication in fish. An orthologues sequence to *velo* and *fah/tan*, piled up with multiple stop codons in the open reading frame, has been identified on human X chromosome. This result reminds of traces of an ancestral sex-determining region present in vertebrate genomes 450 million years ago.

This work gains novel insights in sex chromosome evolution in fish. Two gene candidates have been identified being promising gene candidates for the master sex determining locus in *Xiphophorus maculatus*.

# Die geschlechtsbestimmende Region des Platyfishes *Xiphophorus maculatus* auf den Geschlechtschromosomen X und Y: Molekulare Analyse der genomischen Struktur und molekulargenetische Analyse von Genkandidaten

## A. Einleitung

### 1. Evolution der sexuellen Fortpflanzung und Geschlechtsbestimmungssysteme

#### 1.1 Kosten und Nutzen der sexuellen Fortpflanzung:

Die sexuelle Fortpflanzung stellt eines der kostspieligsten Erfolgsrezepte der Evolution dar. Ein System, bei dem nur ein Geschlecht reproduktionsfähig und meist alleine für die Aufzucht der Nachkommen verantwortlich ist, lässt die Ausbildung eines zweiten Geschlechts als unökonomisch und energieaufwendig erscheinen. Hinzu kommen noch aufwendige Rituale bei der Partnerwahl [Rice, 2002; Butlin, 2002]. Dennoch ist geschlechtliche Fortpflanzung im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet und entwickelte sich schon früh in der Evolution mit der Abspaltung der Eukaryoten von den Prokaryoten vor etwa 1,6 bis 2,1 Milliarden Jahren [Knoll, 1992; Butlin, 2002]. Prokaryoten, die sich prinzipiell asexuell durch Querteilung vermehren, führen schon eine Urform des Sexes durch. Dabei werden Teile des Genoms von einem Donor auf einen Rezeptor übertragen, ein Vorgang, der als Konjugation bezeichnet wird [Tatum und Lederberg 1947]. Meist werden dabei Resistenzgene von einem Individuum an das andere weitergeben und somit ein Selektionsvorteil geschaffen. Die evolutionäre Überlebensrate der meisten asexuellen Arten ist mit 12-40 Mio Jahren äußerst gering. Daher wird die asexuelle Fortpflanzung als Sackgasse der Evolution angesehen. Bdelloid-Rädertierchen (*Bdelloid rotifers*) stellen mit über 80 Millionen Jahren jungfräulicher, asexueller Fortpflanzung lediglich eine Ausnahme dar [Butlin, 2002].

Die sexuelle Vermehrung ist zwar weit verbreitet, aber nicht universell in Tier- und Pflanzenreich. Beispiele für unisexuelle Arten, bestehend aus nur einem Geschlecht, sind der Fisch *Poecilia formosa* [Schories et al., 2007; Lamatsch et al., 2000] oder die Streifenrennechse *Cnemidophorus uniparens* [Crews und Fitzgerald 1980]. Jede dieser Arten hat sexuelle Verwandte und stammt von einem sexuellen Vorfahren ab. Der

umgekehrte Vorgang, dass sich aus einer unisexuellen Population eine sexuelle Population entwickelt, ist bisher nicht bekannt [Grimanelli et al., 2001; Butlin, 2002].

Die sexuelle Fortpflanzung stellt also ein weit verbreitetes Erfolgsrezept in Tier- und Pflanzenreich dar. Welche Vorteile haben sexuelle Arten gegenüber asexuellen oder unisexuellen Arten? Die Vorzüge der geschlechtlichen Fortpflanzung liegen in dem Austausch des genetischen Materials, während der Meiose begründet. Durch homologe Rekombination werden defekte Gene aus dem Genom eliminiert, und die Anhäufung schädlicher Mutationen wird vermieden [Carvahlo, 2003]. Nach Hamilton et al., 1999 liegt der Vorteil in der Resistenz gegenüber Parasiten begründet. Unterstützt wird die Parasiten-Hypothese durch die Beobachtungen an fakultativ asexuellen Schnecken, die sich bei starkem Parasitenbefall sexuelle fortpflanzen. Untersuchungen beim Stichling haben gezeigt, dass die Partnerwahl von der Zusammensetzung der MHC-Gene abhängt. MHC-Moleküle sind körpereigene Antigene auf der Oberfläche jeder Körperzelle, die immunologische Vorgänge regulieren. Ein Weibchen paart sich bevorzugt mit einem Männchen, dessen MCH-Allele möglichst unterschiedlich zu ihren eigenen sind. Die Nachkommen besitzen aufgrund der hohen Variabilität der MHC-Allele eine höhere Resistenz gegenüber Parasiten [Milinski et al., 2005].

## **1.2 Geschlechtsbestimmungssysteme und Geschlechtsbestimmungsmechanismen in Vertebraten**

Die sexuelle Fortpflanzung ist im Tier- und Pflanzenreich ein weit verbreitetes Erfolgsrezept der Evolution. Auch wenn die Ausbildung zweier Geschlechter sehr kostspielig ist, so überwiegen doch die Vorteile der geschlechtlichen Fortpflanzung (Kapitel 1.1). Wie wird das Geschlecht bestimmt? Geschlechtsbestimmung ist kein einheitlicher Prozess, sondern äußerst variabel und vielgestaltig (siehe Kapitel A1.2.1-1.2.3). Nicht nur in Vertebraten wurden unterschiedlichste Geschlechtsbestimmungssysteme identifiziert. Sämtliche Formen von Hermaphroditismus (ein Individuum kann gleichzeitig oder zeitlich versetzt männlichen oder weiblichen Geschlechts sein) sowie Gonochorismus (Getrenntgeschlechtlichkeit) sind beschrieben worden [Devlin und Nagahama, 2002; Schartl, 2004]. Genetische Faktoren, Temperatur, der pH-Wert oder auch soziale Faktoren können die Ausbildung des Geschlechts bestimmen. Bei der genetischen Geschlechtsbestimmung sind unterschiedliche Kopien-

Anzahlen oder Allele eines Regulatorgens für die Ausbildung des Geschlechts verantwortlich. Bei der von Umwelteinflüssen abhängigen Geschlechtsbestimmung aktivieren äußere Kriterien, wie beispielsweise Temperatur, der pH-Wert oder soziale Faktoren, ein Regulatorgen [Volff et al., 2007].

### 1.2.1 Geschlechtsbestimmungsmechanismus und Geschlechtsbestimmungssysteme in Säugetieren

Die Geschlechtschromosomen und der Geschlechtsbestimmungsmechanismus sind beim Menschen sehr gut untersucht. Über mehr als dreitausend Jahre stellten Philosophen und Wissenschaftler immer wieder neue -teils abstruse- Theorien zur Bestimmung des menschlichen Geschlechts auf. Ob dies mit unserem patriarchalischen Weltbild und dem Wunsch, einen männlichen Nachkommen zu zeugen, in Zusammenhang steht, bleibt dahingestellt. In der biblischen Darstellung im 1. Buch Moses wird der Mann, Adam, von Gott geschaffen (Abb. A1.) und die Frau, Eva, aus der Rippe Adams. Eine Vorstellung, die auch heute noch von Kreationisten nicht nur in Amerika vertreten und gelehrt wird. In der Antike war man der Überzeugung, das Geschlecht sei von der Feurigkeit des Geschlechtsaktes abhängig, Jungen würden daher in eher heißen Sommernächten als an kalten Wintertagen gezeugt. Der Einfluss der Temperatur auf die Geschlechtsbestimmung setzte sich neben der Ernährung bis in das 19. Jahrhundert durch [Mittwoch, 2000; 2005]. Auch wenn die Temperatur keinen Einfluss auf die Geschlechtsbestimmung hat, scheint sie eine Rolle bei der Spermatogenese zu spielen. McLachlan und Storey [2003] erklären damit, weshalb der Hoden des Mannes verletzungsanfällig außerhalb der Körperhöhle liegt.



**Abb. A1:** Entstehung des Adam [Schäfer, 2003], nach einer Vorlage von Michelangelos aus der Sixtinischen Kapelle im Vatikan.



Mit der Entdeckung der Chromosomen Ende des 19. Jahrhunderts wurde offensichtlich, dass das Geschlecht beim Menschen chromosomal bestimmt wird. Der Mensch besitzt zwei Geschlechtschromosomen X und Y. Männer sind heterogametisch und besitzen X und Y Chromosomen während Frauen zwei X Chromosomen aufweisen und homogametisch sind. Die Geschlechtschromosomen sind im Hinblick auf ihre Größe und den Geninhalt sehr unterschiedlich (heteromorphisch). Das X Chromosom ist groß (165Mb) und besitzt etwa 1000 Gene, wovon ein Großteil Haushaltsgene sind [Ross et al., 2005], während das Y Chromosom klein (65Mb) ist, genetisch degeneriert und die meisten Gene verloren hat [Ross et al., 2005; Graves 2006]. Nur 46 der 178 Gene des Y Chromosoms codieren für funktionelle Proteine, die übrigen stellen Pseudogene dar [Skaletsky et al., 2003; Graves 2006]. Bezogen auf das gesamte menschliche Genom beträgt der Unterschied zwischen Mann und Frau 3,3%. Ein relativ großer Prozentsatz wenn man bedenkt, dass das Genom zwischen Schimpansen, dem nächsten Verwandten des Menschen, und Mensch nur um 5% divergiert [Britten, 2002].

Die wichtigste Funktion des Y Chromosoms ist die Geschlechtsbestimmung. Das geschlechtsbestimmende Gen wurde 1905 auf dem Y Chromosom lokalisiert und 1990 durch positionelle Klonierung identifiziert [Wilson, 1911; Sinclair et al., 1990]. *SRY* (sex-determining region on the Y) steht an der Spitze der Geschlechtsbestimmungskaskade der Säugetiere [Sinclair et al., 1990; Marshall Graves, 2002]. Es gehört zur HMG-Box Genfamilie (High mobility Group box), den *SOX*-Genen (*SRY* like HMG-box-containing), deren Proteinprodukte eine architektonische Funktion bei der Chromatin-Struktur übernehmen und an Entwicklungsvorgängen beteiligt sind. *SRY* ist eher ein untypischer Vertreter dieser Familie, da die sonst hoch konservierte HMG-Box kaum erhalten ist. Es entstand mutmaßlich aus dem X-chromosomalen Gen *SOX3* [Zusammenfassung siehe Marshall Graves 2002]. Der Reaktionsmechanismus von *SRY* ist bisher nur unvollständig entschlüsselt. *SRY* beeinflusst die Expression geschlechtsbestimmender und geschlechtsdifferenzierender Gene und könnte als Transkriptionsfaktor dieser Gene fungieren [Cohen, 1994]. Jin et al., 2007 konnten erstmals direkte Zielgene von *SRY* beschreiben und die Funktion als Transkriptionsfaktor bestätigen.

Die heteromorphen Geschlechtschromosomen stellen Überreste ursprünglich homologer Chromosomenpaare dar [Ohno, 1967]. Im Laufe der 200 Millionen Jahren andauernden Säugetierevolution entwickelten sich aus einem homologen Autosomenpaar durch den Prozess der Y Chromosom Degenerierung zwei unterschiedliche



Geschlechtschromosomen [Charlesworth, 1991] (Entstehung von divergierten Geschlechtschromosomen siehe Kapitel 3). Das X Chromosom blieb -aufgrund der homologen Rekombination der beiden X Chromosomen in Weibchen- von der Degenerierung und so vor Anhäufung von Mutationen weitgehend verschont [Charlesworth, 1991; Charlesworth et al., 2005; Graves, 2006]. Homologe Rekombination zwischen dem X und dem Y Chromosom, die für den korrekten Ablauf der Meiose unerlässlich ist [Rappold, 1993], findet nur noch an der Spitze der Chromosomen in der sogenannten pseudoautosomalen Region statt. Der übrige Bereich ist vollständig divergiert. Schreitet der Degenerierungsprozess weiter fort, könnte das Y Chromosom in 5-10 Millionen Jahren mit samt dem geschlechtsbestimmenden Gen *SRY* vollständig verschwunden sein [Marshall Graves, 2002]. Stellt dies eine evolutionäre Sackgasse der Säugetiere und Menschen dar oder könnte der Mensch als unisexuelle Art weiter existieren?

Untersuchungsergebnisse von Säugetieren, Monotremen (Kloakentiere, sind eine Unterordnung der Säugetiere, die Eier legen) und Eutherians (Plazentatiere, artenreichste Säugetierordnung) zeigen jedoch, dass die Ausbildung zweier Geschlechter von *SRY* unabhängig sein kann. Zum einen stellt *SRY* nicht das ursprüngliche geschlechtsbestimmende Gen der Säugetiere dar, sondern entwickelte sich mit Übergang zu den Therians (Taxon innerhalb der Säugetiere, umfasst die Beutelsäuger sowie die Plazentatiere (Euteria) und stellt Schwestertaxon zu den Kloakentieren (Monotremata) dar.) vor 130-170 Millionen Jahren. Monotremen, wie beispielsweise das Schnabeltier, besitzen ein anderes bisher nicht identifiziertes geschlechtsbestimmendes Gen [Graves, 2002; 2006]. Zum anderen wurden zwei Maulwurfarten identifiziert, die das Y Chromosom und/oder *SRY* bereits verloren haben. In *Ellobius lutescens* weisen beide Geschlechter den Genotyp X0 auf und in *Ellobius tancrei* sind Männchen und Weibchen XX chromosomal [Just et al., 1995].

### **1.2.2 Geschlechtsbestimmungssysteme und Geschlechtschromosomen in Tetrapoden (ausgenommen den Säugetieren)**

Vögel besitzen ein genetisches Geschlechtsbestimmungssystem mit heterogametischen ZW-Weibchen (ZW wird zur Unterscheidung vom männlichen heterogametischen XY-System verwendet) und homogametischen ZZ-Männchen. Mit Ausnahme der nichtfliegenden Laufvögel, haben Vögel morphologisch unterschiedliche (heteromorphe) Geschlechtschromosomen. Das geschlechtsbestimmende Gen der Vögel konnte bisher

noch nicht identifiziert werden, vieles deutet allerdings auf *dmrt1* als männliches Geschlechtsbestimmungsgen hin. *Dmrt1* ist auf dem Z-Chromosom lokalisiert [Schartl, 2004a; Nanda et al., 2000b]. Somit besitzen Männchen zwei *dmrt1* Gene, während Weibchen nur ein *dmrt1* Gen aufweisen. In Weibchen wird die Expression von *dmrt1* herabgesetzt, daher haben Männchen unabhängig von der Dosiskompensation (Prozess der Inaktivierung eines Geschlechtschromosoms im homogametischen Geschlecht, der bei Vögeln bisher nicht beschrieben wurde), die doppelte Gendosis *dmrt1* [Teranishi et al., 2001]. *Dmrt1* codiert für einen Transkriptionsfaktor mit konserviertem Proteinmotiv, der DM-Domäne. Mitglieder dieser Proteinfamilie spielen eine wichtige Rolle bei der Geschlechtsbestimmung in Vertebraten und Invertebraten (siehe Kapitel 2) [Marin und Baker, 1999; Zarkower 2001].

Die Geschlechtsbestimmungssysteme der Reptilien sind deutlich variabler als die der Vögel. Krokodile, Brückenechsen, die meisten Schildkröten und einige Eidechsenarten weisen einen temperaturabhängigen Geschlechtsbestimmungsmechanismus auf. Bei Krokodilen sind höhere Temperaturen für die Ausbildung von Männchen verantwortlich, während bei Schildkröten höhere Temperaturen Weibchen erzeugen [Ferguson und Joanen, 1982; Schartl, 2004a; Kawai et al., 2007]. Ob die Temperatur direkt oder indirekt auf regulatorische geschlechtsbestimmende Gene einwirkt ist bisher unbekannt. Das einzige bisher bekannte Gen, das vor bzw. während der Geschlechtsdifferenzierung temperaturabhängig exprimiert wird, ist *dmrt1*. Daher könnte es eine Rolle bei der Geschlechtsbestimmung in Reptilien spielen [Schartl, 2004].

Alle Schlangen, die meisten Eidechsenarten und einige Schildkröten weisen genetische Geschlechtsbestimmung auf. Während in Schlangen weibliche Heterogametie (ZZ/ZW-System) vorherrscht [Singh, 1972] weisen Schildkröten und Eidechsen XX/XY und ZZ/ZW Geschlechtsbestimmungssysteme auf [Kawai et al., 2007]. Darüber hinaus wurde eine unisexuelle Eidechsenart beschrieben [Crews und Fitzgerald, 1980].

Alle bisher untersuchten Amphibienarten weisen genetische Geschlechtsbestimmungsmechanismen mit männlichen und weiblichen Heterogametien auf. Der Modellorganismus *Xenopus laevis* beispielweise zeigt ein weibliches heterogametisches ZW-System. Er besitzt -wie die meisten Amphibienarten- homomorphe Geschlechtschromosomen [Schmid und Steinlein, 2001; Schartl, 2004a; Malone et al., 2006]. Über das geschlechtsbestimmende Gen in Amphibien ist bisher kaum etwas bekannt, kein Kandidat konnte bisher identifiziert werden. *Dmrt1*, das in Vertebraten in die Geschlechtsbestimmung involviert ist, konnte als geschlechtsbestimmendes Gen in

Amphibien ausgeschlossen werden, könnte aber eine Rolle bei der Geschlechtsdifferenzierung übernehmen [Schartl, 2004a].

### 1.2.3 Geschlechtsbestimmungssysteme und Geschlechtsbestimmungsmechanismen in Fischen

Das Geschlechtsbestimmungssystem der Säugetiere oder Vögel ist weitgehend konserviert. *SRY* stellt seit mehr als 130 Millionen Jahren das geschlechtsbestimmende Gen der Säugetiere (Theria) dar [Marshall Graves, 2002; Volff et al., 2007]. Im Gegensatz dazu sind die Geschlechtsbestimmungssysteme und Geschlechtsbestimmungsmechanismen in Fischen vielgestaltig, sehr variabel und evolutiv gesehen kaum konserviert. Sämtliche Formen von Hermaphroditismus und Gonochorismus wurden beschrieben. Bei der genetischen Geschlechtsbestimmung wurden männliche und weibliche Heterogamien (XX/XY und ZZ/ZW-Systeme) identifiziert, teilweise mit autosomalem Einfluss oder gänzlich polyfaktoriell. In anderen Arten ist die Geschlechtsbestimmung von der Umgebung abhängig. Dabei können Temperatur und pH-Wert genauso eine Rolle spielen wie soziale Faktoren [Baroiller und D’Cotta, 2001, Volff et al., 2007].

Neben *SRY*, dem geschlechtsbestimmenden Gen der Säugetiere (Theria), konnte in dem kleinen Aquarienmodellfisch Medaka (*Oryzias latipes*) ein weiteres geschlechtsbestimmendes Gen der Vertebraten identifiziert werden. Medaka besitzt ein XX/XY Geschlechtsbestimmungssystem. Das geschlechtsbestimmende Gen, *dmrt1bY*, konnte durch Kandidaten-Gen Methode und positionelle Klonierung unabhängig voneinander auf dem Y Chromosom identifiziert werden [Matsuda et al, 2002; Nanda et al., 2002]. *Dmrt1bY*, ist eine Y-spezifische Kopie des autosomalen Gens *dmrt1* und das einzig funktionelle Gen in der 200 kb großen Y-chromosomalen, geschlechtsbestimmenden Region, die durch transchromosomale Duplikation der Kopplungsgruppe 9 entstand [Kondo et al., 2004; 2006]. Evolutionäre Analysen zeigten, dass sich *dmrt1bY* etwa vor 10 Millionen Jahren entwickelte, evolutiv gesehen relativ jung ist und lediglich in einigen *Oryzias*-Arten (*Oryzias latipes* und *Oryzias curvinotus*) nachgewiesen worden. Daher kann es als Haupt-Geschlechtsbestimmendes Gen der Fische ausgeschlossen werden [Veith et al., 2003; Volff et al., 2003b; Kondo et al., 2002; 2004; 2006]. Andere geschlechtsbestimmende Gene konnten bisher bei Fischen noch nicht identifiziert werden.

## 2. Evolution der Geschlechtsbestimmungsmechanismen und Geschlechtschromosomen: Variatio delectat? - Variabilität trifft Konservierung

Die Geschlechtsbestimmungsmechanismen der Vertebraten, mit deren kontrollierenden Geschlechtsbestimmungsgenen *SRY* der Säugetiere (Theria) und *dmrt1bY* des Fisches Medaka, oder externen Faktoren wie Temperatur, scheinen ständig wechselnden evolutionären Prozessen zu unterliegen und entwickelten sich scheinbar unabhängig voneinander. Kontrollierende Gene oder Umweltfaktoren wirken auf andere regulatorische geschlechtsbestimmende Gene ein, die über die Vertebraten hinaus konserviert sind. Orthologe geschlechtsbestimmende Gene wurden in Insekten, Würmern, Fischen und bei Säugetieren identifiziert. *Dmrt1* beispielsweise ist in Vertebraten ein konserviertes Geschlechtsbestimmungsgen. Homologe Gene zu *dmrt1* konnten auch außerhalb der Vertebraten, bei *Drosophila*, *dsx* (*double sex*) oder bei *C. elegans*, *mab-3* (*male abnormal*) identifiziert werden. *Dsx* und *mab-3* sind in die Geschlechtsbestimmung involviert. [Marin und Baker, 1999; Zarkower, 2001, Herpin et al., 2007]. Auf Proteinebene codieren die Gene für einen Transkriptionsfaktor mit sogenannter DM-Domäne. *Sox9*, *WT1* und *SFI* ist in Säugern und Fischen und *AMH* in Säugern und Reptilien konserviert [Schartl, 2004a]. Marin und Baker [1998] schließen daher auf eine ursprüngliche geschlechtsbestimmende Kaskade, aus der sich die unterschiedlichen Geschlechtsbestimmungsmechanismen entwickelten. Die Konservierung unten stehender Gene in der geschlechtsbestimmenden Kaskade hängt mit dem pleiotrophischen Charakter der Gene zusammen, d.h. sie wirken auf unterschiedliche Gene in verschiedenen Prozessen ein. Eine plötzliche oder/und häufige Veränderung dieser Gene könnte fatale Auswirkungen nach sich ziehen [Marin und Baker, 1998; Raymond et al, 1998; Zarkower, 2001]. Die an der Spitze stehenden Gene sind aufgrund des Evolutionsdrucks austauschbar und werden der Hypothese Wilkins [1995] zu Folge von weiter unten stehenden Genen an die Spitze rekrutiert.

Die variablen, kontrollierenden Geschlechtsbestimmungsgene an der Spitze der geschlechtsbestimmenden Kaskade sind meistens auf den Geschlechtschromosomen lokalisiert. Die Geschlechtschromosomen der Vertebraten scheinen sich unabhängig voneinander aus unterschiedlichen Autosomen des gemeinsamen Vorfahren entwickelt zu haben [Ohno 1967]. Durch den Erfolg verschiedener Sequenzierungsprojekte und die damit verbundene Sequenzierung kompletter Genome oder Genomabschnitte konnte und

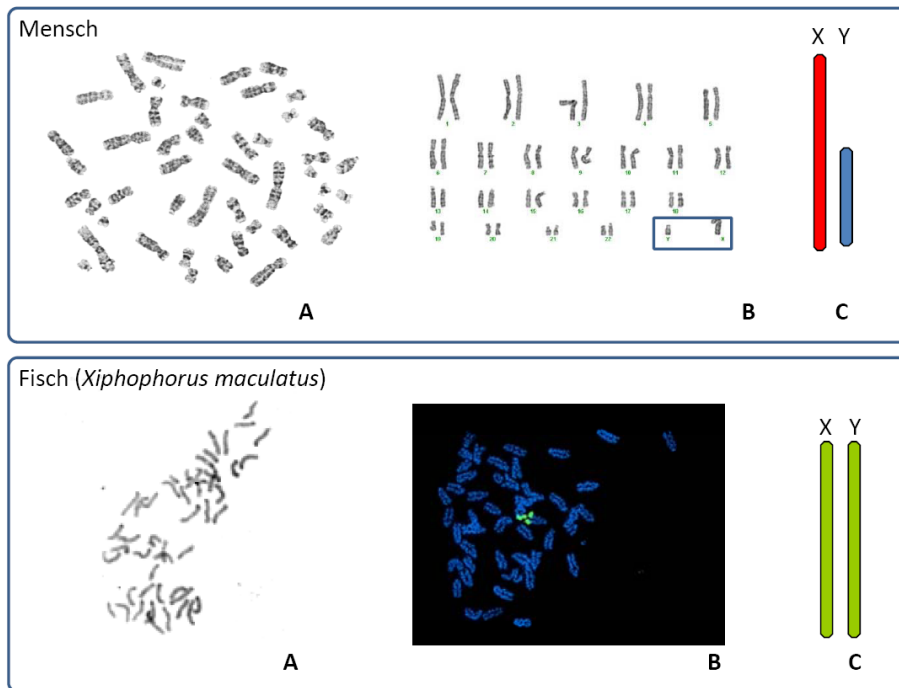
kann das Feld der vergleichenden Genomanalyse („Comparative Genomics“) ausgebaut werden. Vergleicht man den Geninhalt der Geschlechtschromosomen von Huhn, Reptilien, Säugetieren und Fischen miteinander, kann die Evolution und Entstehung der Geschlechtschromosomen der Vertebraten untersucht werden.

Die Geschlechtschromosomen der Säugetiere entstanden vor 310-210 Millionen Jahren durch einen mehrstufigen Prozess [Lahn et al., 1999, 2001; Graves, 2006]. Da das Y Chromosom im Laufe der Evolution degenerierte, beschränken sich die meisten Untersuchungen zur Entstehung und Evolution der Geschlechtschromosomen auf das X Chromosom. Durch vergleichende Genomanalysen X-chromosomaler Gene des Menschen in Monotrematen, Beuteltieren und Huhn konnte eine sehr alte, etwa 310-210 Millionen Jahre Region identifiziert werden, die in allen Säugetieren konserviert ist. Plazentalen Säugetieren wurde vor etwa 100-180 Millionen Jahren eine Region angefügt, die in Monotrematen und Beuteltieren autosomal ist [Waters et al., 2001]. Gene dieser hinzugefügten Region sind beim Huhn auf Chromosom 1 und Gene der ursprünglichen Region sind weitgehend auf Chromosom 4 lokalisiert, einige auf Chromosom 12 [Graves, 2006]. Umgekehrt sind eine Vielzahl Z-chromosomaler Gene des Huhns beim Menschen auf Chromosom 9 einige auch auf Chromosom 5 und 18, was vermuten lässt, dass die Geschlechtschromosomen von Säugetieren und Mensch aus unterschiedlichen Autosomen eines gemeinsamen Vorfahren entstanden [Nanda et al., 2000b]. Untersuchungen beim Schnabeltier konnten ein mögliches Bindeglied zwischen dem ZW-System der Vögel und dem XY-System der Säugetiere identifizieren. Das Schnabeltier besitzt 10 Geschlechtschromosomen, 5 X und 5Y Chromosomen, die während der Meiose einen Translokationskreis bilden. Das X Chromosom an einem Ende des Ringes ist homolog zu dem X Chromosom der Säugetiere, während auf dem X Chromosom am anderen Ende das Gen *dmrt1* lokalisiert ist, das beim Huhn auf dem Z Chromosom liegt und aussichtreicher Kandidat für das geschlechtsbestimmende Gen der Vögel darstellt [Grützner et al., 2004; 2006]. Laut einer Hypothese von Ezaz et al. könnte das XY-System der Säugetiere aus dem ZW-System der Vögel oder Reptilien hervorgegangen sein [Ezaz et al., 2006].

Auch wenn die meisten Reptilien ein temperaturabhängiges Geschlechtsbestimmungssystem aufweisen, wurde in Schlangen, einigen Schildkröten und Eidechsenarten eine genetische Geschlechtsbestimmung nachgewiesen (Kapitel 1.2.2). Geschlechtschromosomen sind nur schwer von Autosomen zu unterscheiden und daher nur in wenigen Reptilienarten identifiziert worden [Ezaz et al., 2006, Kawai et al.,

2007]. Schlangen und Vögel weisen einen sehr ähnlichen Karyotyp auf, beide besitzen Makro- und Mikrochromosomen und ein weibliches heterogametisches ZW-Geschlechtsbestimmungssystem. Daher wurde früher angenommen, die Z Chromosomen von Schlangen und Vögeln könnten einen gemeinsamen Ursprung haben [Ohno, 1967; Matsuda et al, 2005]. Untersuchungen bei denen Z-chromosomale Gene der Vögel und Schlangen in der jeweiligen anderen Klasse getestet wurden, zeigten, dass sich die Geschlechtschromosomen von Huhn und Reptilien wahrscheinlich aus unterschiedlichen Autosomen entwickelten. Gene des Z-Chromosoms der Vögel wurden bei Schlangen auf Chromosom 2 nachgewiesen, umgekehrt wurden Z-chromosomale Gene der Schlangen beim Vogel auf Chromosom 2 identifiziert und beim Menschen auf Chromosomen 7 und 10 [Matsuda et al., 2005; Kawai et al., 2007]. Geschlechtschromosomen der Reptilien scheinen nicht aus einem gemeinsamen Autosomenpaar entstanden zu sein, wie Untersuchungen bei Schildkröten und Schlangen vermuten lassen [Kawai et al., 2007].

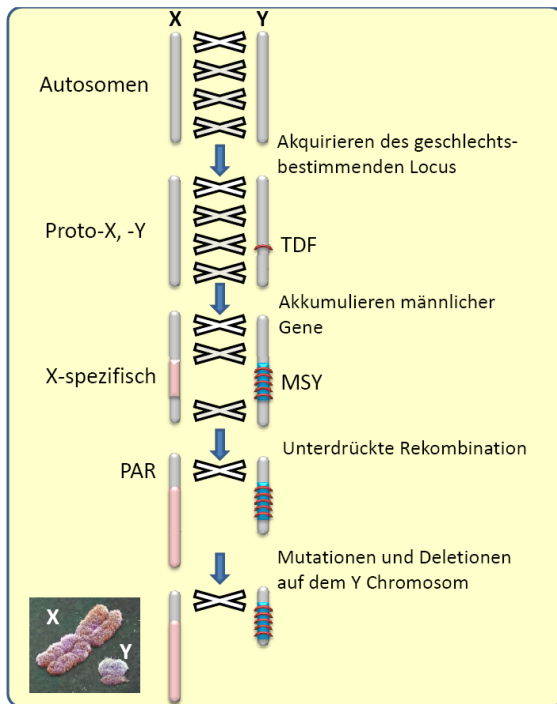
Das Phänomen der Entstehung neuer Geschlechtschromosomen ist möglicherweise bei Fischen besonders ausgeprägt und könnte mit der Variabilität der Geschlechtsbestimmungsmechanismen und der Ausbildung neuer geschlechtsbestimmender Gene in Verbindung stehen. Daher sind Fische interessante Modellorganismen zur Untersuchung der Evolution der Geschlechtsbestimmung und der Geschlechtschromosomen [Volf et al., 2007]. Molekulare Untersuchungen der geschlechtsbestimmenden Regionen von Medaka, lokalisiert in Kopplungsgruppe 1, Stichling (Kopplungsgruppe 19) und Fugu (Kopplungsgruppe 19) konnten zeigen, dass der Geninhalt der geschlechtsbestimmenden Regionen komplett unterschiedlich ist. Daher konnte auch das geschlechtsbestimmende Gen *dmrt1bY* von Medaka nicht in der geschlechtsbestimmenden Region von Stichling oder Fugu nachgewiesen werden [Matsuda et al., 2002, Kondo et al., 2004; 2006; Peichel et al., 2004, Kikuchi et al., 2007, Volf et al., 2007]. *Dmrt1bY* entstand vor 10 Millionen Jahre und ist auf einige *Oryzias*-Arten begrenzt. Medaka weist damit eines der jüngsten männlichen Geschlechtsbestimmungssysteme der Vertebraten auf [Kondo et al., 2004]. Die geschlechtsbestimmenden Gene in Fugu oder Stichling konnten noch nicht identifiziert werden. Vieles deutet darauf hin, dass diese, wie in Medaka, linienspezifisch und evolutiv sehr jung sein könnten [Peichel et al., 2005; Kikuchi et al., 2007].



**Abb. A2:** Metaphasechromosomen Mensch (oben) und dem Fisch *Xiphophorus maculatus* (unten). Der Mensch besitzt morphologisch unterschiedliche Geschlechtschromosomen (A oben; B oben, blauer Kasten). Geschlechtschromosomen beim Fisch lassen sich morphologisch nicht unterscheiden (A unten), können aber mit cytogenetischer Methoden identifiziert werden (hier BAC der geschlechtsbestimmenden Region eingesetzt als Sonde) (B unten). Schematische Darstellung heteromorpher (C oben) und homomorpher (C unten) Geschlechtschromosomen. (Abbildungsnachweis: Mensch: Metaphasechromosomen A: [http://www.uni-kiel.de/medgen/bilder/\\_+21.jpg](http://www.uni-kiel.de/medgen/bilder/_+21.jpg); B: <http://www.humane-genetik.de/grafik/karyogramm.jpg>; *Xiphophorus maculatus*: eigene Bilder).

Die Geschlechtschromosomen der Säugetiere (Theria, XY) und Vögel (ZW) können morphologisch gut voneinander unterschieden werden. Beim Menschen besitzen Männchen ein degeneriertes kleines Y Chromosom und ein eher unberührtes X Chromosom, Weibchen sind homogametisch und besitzen zwei X Chromosomen. Vögel weisen ein weibliches heterogametisches System auf mit einem degenerierten W Chromosom in Weibchen, Männchen besitzen den Genotyp ZZ. In den meisten Fischarten und Reptilien lassen sich die Geschlechtschromosomen, wenn überhaupt, morphologisch nur schwer voneinander unterscheiden (homomorphe Geschlechtschromosomen) (Abb. A2) [Volf et al., 2007; Kawai et al., 2007]. Die morphologischen Unterschiede lassen Rückschlüsse auf das evolutive Stadium der Geschlechtschromosomen zu. Säugetiere (Theria) und Vögel weisen weit evolvierte Geschlechtschromosomen auf, Reptilien, soweit bekannt, ein mittleres Entwicklungsstadium und Fische eine relativ frühe Phase [Kawai et al., 2007, Volf et al., 2007].





**Abb A3:** Differenzierung der Geschlechtschromosomen aus Autosomen (in dieser Abbildung eines XY-Systems) [nach Graves, 2006]. Ein Chromosom akquiriert einen geschlechtsbestimmenden Locus (z.B. einen Hoden determinierenden Faktor, TDF). Die Akkumulierung Y-spezifischer Allele führt zur unterdrückten homologen Rekombination und zur Entstehung einer X-spezifischen Region (rosa) und einer Y-spezifischen Region (MSY). Homologe Rekombination (weiße Kreuze) findet nur in der Pseudoautosomalen Region statt. Unterdrückte homologe Rekombination führt zur schnellen Degenerierung der MSY.

Auch wenn sich die Geschlechtschromosomen der Vertebraten aus unterschiedlichen Autosomen des gemeinsamen Vorfahren entwickelten [Ohno, 1967], die evolutiven Wege hin zu heteromorphen Geschlechtschromosomen scheinen konserviert und gemeinsamen Prozessen unterworfen zu sein. Beginnend mit der Aneignung eines männlichen bzw. weiblichen geschlechtsbestimmenden Gens auf einem Autosom, das zum proto-Y bzw. -W wird, je nachdem um welches Geschlechtsbestimmungssystem es sich handelt gefolgt von der Anhäufung Y- oder W- spezifischer Gene, die eine Unterdrückung der homologen Rekombination zur Folge hat. Unterdrückte homologe Rekombination führt zur Anhäufung von Mutationen und Ansammlung von transponierbaren Elementen in der nicht-rekombinierenden Region auf dem Y bzw. W Chromosom, die ihrerseits die homologe Rekombination unterbinden. Dieses Aufschaukeln führt letztendlich zur Degenerierung des X bzw. W Chromosoms, während das Partnerchromosom X bzw. Z von diesen genomischen Modifikationen weitgehend unberührt bleibt, da homologe Rekombination im homogametischen Geschlecht stattfinden kann und Mutationen dadurch weitgehend vermieden werden können [Charlesworth, 1991; Charlesworth et al., 2005; Graves, 2006; Abb. A3]. Das Homogametische Geschlecht (XX oder ZZ) besitzt -



aufgrund der Degenerierung des Y bzw. W Chromosoms im heterogametischen Geschlecht- für einige Gene zwei Allele. Dieses Ungleichgewicht wird durch den Prozess der Dosiskompensation (epigenetische Inaktivierung eines Geschlechtschromosoms im homogametischen Geschlecht) ausgeglichen [Lyon, 1961]. Der Prozess der Inaktivierung eines Z Chromosoms im homogametischen Geschlecht wurde bei Vögeln bisher noch nicht beschrieben.

Die initiiierenden Schritte, die zur Degenerierung führen, sind bisher kaum verstanden. Untersuchungen beim Menschen könnten aber auf Inversionsereignisse hindeuten [Charlesworth et al., 2005]. Einen Ansatz zum Verständnis bieten Modellorganismen mit neu entwickelten Geschlechtschromosomen [Graves, 2006]. 90% der Fischarten weisen homologe, morphologisch kaum differenzierte Geschlechtschromosomen auf, die evolutionär betrachtet relativ jung sind [Devlin und Nagahama, 2001; Volff et al., 2007]. Homologe Rekombination zwischen den Geschlechtschromosomen ist, wenn überhaupt, nur in der Geschlechtsbestimmenden Region unterdrückt, was auf erste molekulare Differenzierung der Geschlechtschromosomen hindeutet. Daher sind Fische die idealen Modellorganismen zur Untersuchung der Geschlechtschromosomenevolution und der Evolution von Geschlechtsbestimmungsmechanismen.

### 3. Fische als genetische Modellorganismen

Fische sind wechselwarme, fast ausschließlich im Wasser lebende Wirbeltiere mit Kiemen. Diese unterteilen sich in Knorpelfische (Chondrichthyes), zu denen unter anderem die Haie und Rochen zählen, und Knochenfische (Osteichthyes), die alle anderen Fische umfassen. Zwei weitere Fischtaxa, die Panzerfische (Placodermi) und die Stachelhaie (Acanthodii), sind ausgestorben [Nelson, 1994]. Die Strahlenflosser (Actinopterygii) bilden zusammen mit den Muskelflossern (Sarcopterygii) die Reihe der Osteichthyes. Mit fast 25.000 Arten umfassen die Strahlenflosser (Actinopterygii) 95% aller lebenden Fischarten und machen die Hälfte aller heute lebenden Vertebratenarten aus. Die größte Gruppe innerhalb dieser Klasse stellen Teleostei dar, die alleine fast das komplette Taxon abdecken [Lecointre und Le Gyader, 2006].

Besonderheit der Teleostei ist die fisch-spezifische Genomduplikation (FSGD), die zu einer Tetraploidisierung des Genoms führte. Von einer darauf folgenden Rediploidisierung blieben viele Gene verschont und besitzen relativ ursprüngliche, etwa 320-350 Millionen Jahre alte Duplikate, während Co-orthologe in Tetrapoden häufig als

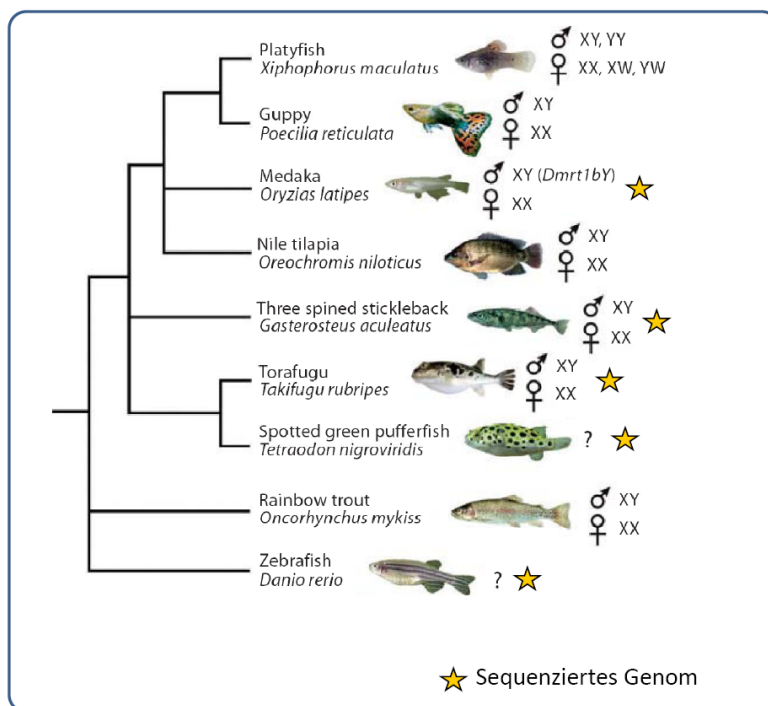
Einzelgene vorliegen. Verschiedene evolutionäre Wege, wie Pseudogenentwicklung, Deletion, Subfunktionalisierung (während in Tetraopden zwei Speißformen eines Gens existieren, werden die Funktionen der Spleißformen auf beide Kopien aufgeteilt.) oder Neofunktionalisierung (ein Gen erhält eine neue Funktion, während die andere Kopie die ursprüngliche Funktion erfüllt.) wurden für die Duplikate beschrieben [Meyer und Schartl, 1999; Taylor et al., 2001, Froschauer et al., 2006, Volff, 2005].

Einige Teleostei sind Gegenstand laufender oder bereits abgeschlossener Genomsequenzierungsprojekte (Abb. A4). Der Zebrafisch *Danio rerio* oder Medaka *Oryzias latipes* sind in der Biologie und Medizin als Modellorganismen zur Untersuchung von Entwicklungsprozessen oder Krankheiten nicht mehr wegzudenken [Wittbrodt et al., 2002; Furutani-Seiki und Wittbrodt, 2004]. Die beiden Pufferfische *Tetraodon nigrovirides* und *Takifugu rubripes* sind aufgrund ihres kompakten Genoms Modellorganismen für Genomvergleiche („Genomics“) [Brenner et al., 1993; Roest Crollius et al., 2000]. Andere Teleosteiarten wie Chichliden, Guppies oder Stichling stellen Modelle zur Untersuchung der molekularen Grundlagen der Artbildung und der Evolution der Entwicklung und des Verhalten dar [Volff, 2005, Froschauer et al., 2006]. Arten wie der atlantische Lachs oder die Regenbogenforelle sind in ökonomischer Hinsicht interessant [Volff, 2005].

Teleostei zeigen eine erstaunliche Variabilität der genetischen Geschlechtsbestimmungsmechanismen mit möglicherweise immer wieder neu entstehenden Geschlechtschromosomen [Volff et al., 2007]. Da die Entstehung differenzierter Geschlechtschromosomen in Vertebraten gemeinsamen evolutiven Wegen unterliegt, die initiierenden Schritte bisher jedoch kaum verstanden sind, stellen Fische ideale Modellorganismen zur Untersuchung der Evolution der Geschlechtschromosomen dar [Graves, 2006].

Die variablen Mechanismen der Geschlechtsbestimmung in Fisch könnten mit der Entwicklung neuer Geschlechtschromosomen gekoppelt sein. Um das Phänomen der Variabilität der genetischen Geschlechtsbestimmung zu verstehen, ist es unerlässlich, molekulare Mechanismen der Geschlechtsbestimmung in möglichst vielen Fischarten zu untersuchen. Auch wenn für viele Teleostei (Abb A4) bereits sequenzierte Genome vorliegen, kommen nicht alle Arten als einfache Modellorganismen zur Untersuchung der Geschlechtsbestimmung und Evolution der Geschlechtschromosomen in Frage. Voraussetzung für einen Modellorganismus sind molekular identifizierbare Geschlechtschromosomen möglichst mit molekularen Markern, die mit dem

geschlechtsbestimmenden Locus gekoppelt sind, sowie möglichst einfache genetische Geschlechtsbestimmungsmechanismen [Volff und Scharl 2001; Wolff et al., 2007]. Der Zebrafisch, einer der wichtigsten Vertebratenmodellorganismen, kommt als Modellorganismus zur Untersuchung der Geschlechtsbestimmung und Evolution der Geschlechtschromosomen nicht in Frage, da bisher weder geschlechtsgekoppelte Marker noch Geschlechtschromosomen identifiziert werden konnten. Auch über den Geschlechtsbestimmungsmechanismus ist bisher kaum etwas bekannt. Ähnlich ist die Situation beim Pufferfisch *Tetraodon nigroviridis*. Bei Stichling, Medaka, und Fugu, Fische mit vollständig sequenzierten Genomen, konnte hingegen die geschlechtsbestimmenden Regionen identifiziert werden [Kondo et al., 2004; 2006; Peichel et al., 2004, Kikuchi et al., 2007, Wolff et al., 2007] und in Medaka ist bereits das geschlechtsbestimmende Gen identifiziert worden, eine Y-spezifische Kopie des Gens *dmrt1* [Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002]. *Dmrt1bY* konnte aber lediglich in einigen Medaka-Arten nachgewiesen werden und stellt somit keinesfalls das universelle geschlechtsbestimmende Gen der Fische dar [Kondo et al., 2006]. Zwar liegt für den Platyfish *Xiphophorus maculatus* kein sequenziertes Genom vor, er stellt aber dennoch einen hervorragenden Modellorganismus zur Untersuchung der Geschlechtsbestimmung und Evolution der Geschlechtschromosomen dar (siehe Kapitel 4).

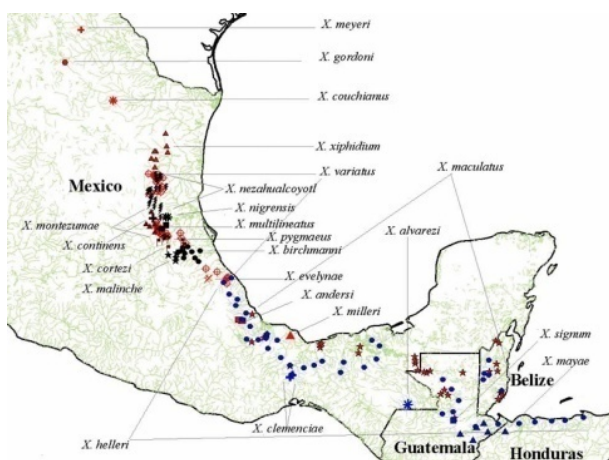


**Abb. A4:** Verschiedene Teleostei-Fischmodelle und ihre Geschlechtsbestimmungssysteme mit identifiziertem kontrollierendem Geschlechtsbestimmungsgen in Klammern [Volff et al., 2007, Torafugu erweitert nach Kikuchi et al., 2007].

#### 4. Modellorganismus *Xiphophorus*

Fische der Gattung *Xiphophorus* (Günther 1866) gehören zur Unterfamilie der lebendgebärenden Zahnkarpfen (Poeciliinae). Poeciliinae werden mit den Unterfamilien der Aplocheilichthyinae sowie der Proatopodinae (Leuchtaugenfische) zur Familie der Poeciliden zusammengefasst. 23 *Xiphophorus*-Arten (Abb. A5) sind bisher beschrieben [Meyer und Schartl, 2002], die in drei Untergruppen gegliedert werden, den Nord-Schwertträgern, Südschwertträgern und Platyfischen.

*Xiphophorus*-Arten sind beliebte Aquarienfische, die ursprünglich aus Flüssen und Flussdeltas Mittelamerikas (Mexiko, Belize, Honduras und Guatemala) stammen. Seit den 1920er Jahren dienen interspezifische *Xiphophorus*-Kreuzungen als Modellorganismen zur Untersuchung von erblichen Melanomen [Gordon, 1927; Kosswig, 1928]. Der für die Melanomentwicklung verantwortliche Tumorlocus *Tu* konnte molekular identifiziert werden und ist mit einer Reihe von Genloci gekoppelt [Wittbrod et al., 1989, 1992]. Diese Loci sind für die Bestimmung des Geschlechts (*SD*-Locus, sex-determining Locus) und den Zeitpunkt der Geschlechtsreife verantwortlich (*P*-Locus, Pubertylocus). Andere bestimmen geschlechtsgebundene dimorphe Pigmentierungsmuster (*RY*-Locus Red-Yellow Pigmentpatternlocus) oder die Ausprägung von großen Pigmentzellen, den Makromelanophoren bzw. den Phänotyp der Melanome (*Mdl*-Locus; Macromelanophore determining Locus). Daher stellen Fische der Gattung *Xiphophorus* hervorragende Modellorganismen nicht nur zur Untersuchung der Entstehung von Hautkrebs, Pigmentierung und der genetischen Geschlechtsbestimmung dar [Gutbrod und Schartl, 1999; Volf und Schartl 2002].



**Abb. A5:** Vorkommen der 23 *Xiphophorus*-Arten in Mittelamerika. Blaue Symbole stellen die Fundorte der Schwertträger dar, rote Zeichen symbolisieren die Fundorte der Platyfische. (Quelle: [www.xiphophorus.org](http://www.xiphophorus.org))

## 4.1 Geschlechtsbestimmung und Geschlechtschromosomen in *Xiphophorus*

Die Geschlechtsbestimmung in Fischen der Gattung *Xiphophorus* ist gut untersucht und spiegelt begrenzt die Variabilität der Geschlechtsbestimmung in Fischen wider. In den meisten *Xiphophorus*-Arten überwiegt ein XX/XY System (Platyfische *Xiphophorus variatus* und *Xiphophorus xiphidium*) teils mit autosomalem Einfluss (Südschwertträger, *Xiphophorus nigrensis* und den Nordschwertträger *Xiphophorus cortezi*). Im Gegensatz dazu ist die Geschlechtsbestimmung in *Xiphophorus hellerii* polyfaktoriell, bei der eine Vielzahl von männlichen und weiblichen Geschlechtsbestimmungsgenen eine Rolle spielen. Für *Xiphophorus alvarezi* wurde ein stabiler ZZ/ZW Mechanismus beschrieben, bei dem in einer Population ein autosomaler Einfluss in die Geschlechtsbestimmung involviert ist [Kallman, 1984; Volff und Schartl, 2001, Volff et al., 2007].

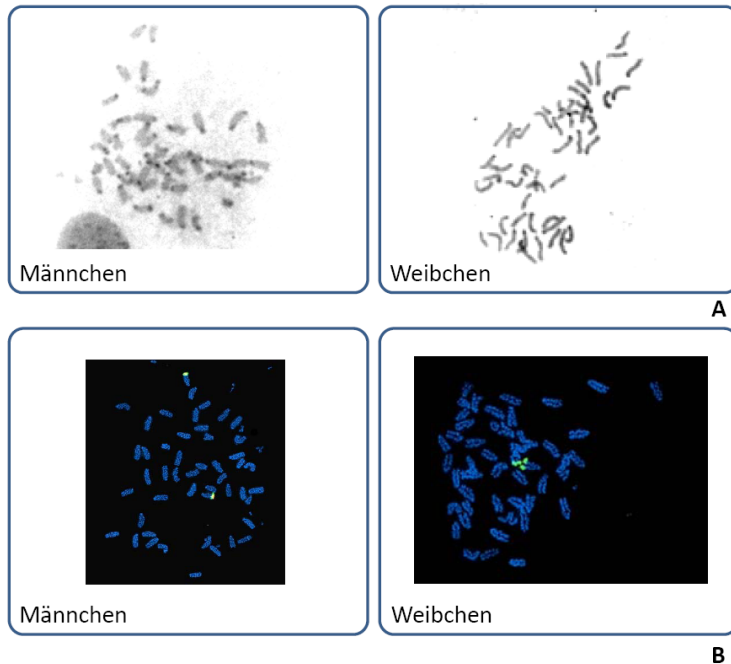
Die am besten untersuchte *Xiphophorus*-Art hinsichtlich der Geschlechtsbestimmung stellt der Platyfisch *Xiphophorus maculatus* dar [Volff und Schartl, 2001]

### 4.1.1 Geschlechtschromosomen und Geschlechtsbestimmungsmechanismus in *Xiphophorus maculatus*

*Xiphophorus maculatus* besitzt drei Geschlechtschromosomen X, Y und W, wobei das W Chromosom in einigen Populationen (z.B. Rio-Jamapa Population) nicht vorkommt. Weibchen besitzen den Genotyp XX, WX oder WY, während Männchen XY oder YY sind. WW Weibchen können nur unter Laborbedingungen gezüchtet werden. Somit sind bei *Xiphophorus maculatus* sowohl homogametische (XX [und WW]) und heterogametische (WX und WY) Individuen genauso wie homogametische (YY) als auch heterogametische (XY) Individuen nachweisbar. *Xiphophorus maculatus* ist daher ein ausgezeichneter Modelorganismus zur Untersuchung männlicher und weiblicher heterogametischer Geschlechtsbestimmung innerhalb einer Art [Kallman, 1984; Volff und Schartl, 2001].

Die Geschlechtschromosomen -wie bei fast allen Fischarten- sind kaum differenziert und YY und WW Individuen sind daher lebensfähig. Unterschiede zwischen dem X und Y Chromosom konnten weder durch Syntonemal Komplex Analysen (Untersuchung der Paarung während der Meiose) noch durch vergleichende genomische Hybridisierung nachgewiesen werden [Traut und Winking, 2001]. Auch morphologisch können die Geschlechtschromosomen nicht von Autosomen unterscheiden werden (Abb. A6, A) sind

aber genetisch und cytogenetisch gut definiert (Abb. A6, B) [Nanda et al., 2000a]. Das Y Chromosom kann in manchen Populationen durch FISH-Experimente (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung), bei denen ein *XIR*-Element als Sonde eingesetzt wird, von dem X Chromosom unterschieden werden [Nanda et al., 2000a]



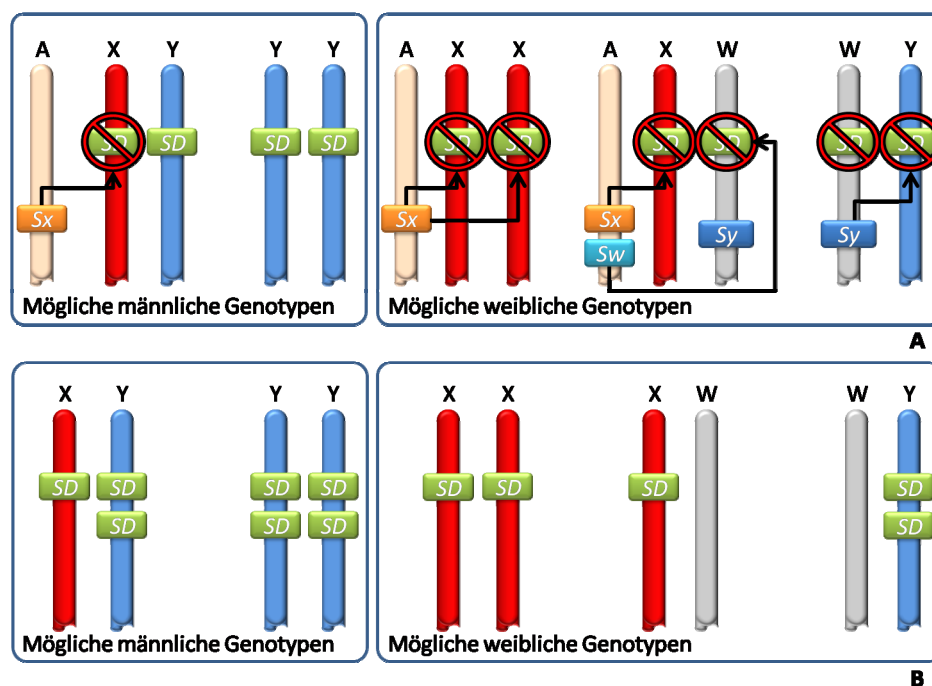
**Abb. A6.** A und B: Männliche und weibliche Metaphasechromosomen von *Xiphophorus maculatus* mit X/Y System der Geschlechtsbestimmung (A: C-Banding Methode). B: Markierung der geschlechtsbestimmenden Region auf dem X bzw. Y Chromosom mittels FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) (unter Verwendung von BAC-Klonen (artifizielles Bakterienchromosom) als Sonde).

Zwei Modelle schlagen einen Mechanismus der Geschlechtsbestimmung in *Xiphophorus maculatus* vor. In beiden Modellen ist die Geschlechtsbestimmung unabhängig von Umweltfaktoren. Kallman [1984] geht von einer autosomal beeinflussten Geschlechtsbestimmung aus (Abb. A7, A). Alle Geschlechtschromosomen besitzen ein männliches geschlechtsbestimmendes Gen (*SD*). Lediglich das Y-chromosomale Allel ist aktiv, während die Expression der Allele auf dem X und W Chromosom durch autosomal lokalisierte Suppressoren (*Sx* und *Sw*) unterdrückt wird. Auf dem W Chromosom ist, dem Modell zu Folge, ein weiterer Supressor (*Sy*) lokalisiert. *Sy* unterbindet die Expression des männlichen geschlechtsbestimmenden Gens auf dem Y Chromosom. Dies erklärt das Vorkommen von WY Weibchen in einigen Populationen.

Im Gegensatz zu Kallman [1984] beschreiben Volff und Schartl [2001] einen von Autosomen unabhängigen Geschlechtsbestimmungsmechanismus (Abb. A7, B). In dem Modell ist die Geschlechtsbestimmung von der Gendosis eines männlichen geschlechtsbestimmenden Gens (*SD*) abhängig. Die Geschlechtschromosomen besitzen eine unterschiedliche Kopienanzahl dieses Gens. Auf dem Y Chromosom wurden 2 Kopien vorgeschlagen. Das X Chromosom besitzt nur eine Kopie, während auf dem W



keine Kopie lokalisiert ist. Männchen besitzen demnach mindestens 3 Kopien, während in Weibchen maximal 2 Kopien des männlichen geschlechtsbestimmenden Gens auftreten. Das geschlechtsbestimmende Gen von *Xiphophorus maculatus* konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Daher wäre auch ein weibliches geschlechtsbestimmendes Gen vorstellbar. Analog dazu wäre dann das weibliche Geschlechtsbestimmungsgen dosisabhängig [Volf und Schartl, 2001]. Die Identifizierung des geschlechtsbestimmenden Locus wird Aufschluss über den Geschlechtsbestimmungsmechanismus geben.

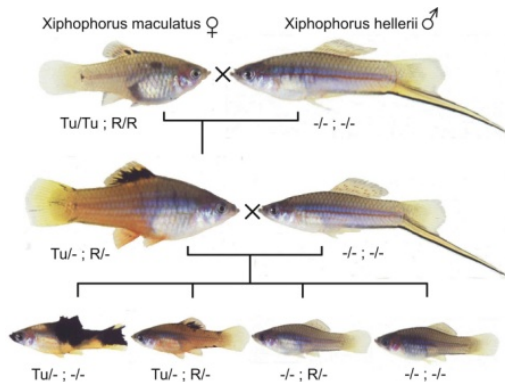


**Abb. A7:** Modelle zum Geschlechtsbestimmungsmechanismus in *Xiphophorus maculatus*: Modell **A** nach Kallman [1984]. Die Geschlechtsbestimmung ist autosomal beeinflusst. Alle Geschlechtschromosomen (X rot; Y blau und W grau) besitzen ein männliches geschlechtsbestimmendes Gen (*SD*, grün). Lediglich die Y chromosomale Kopie ist funktionell. Die Expression der Kopien auf dem Y und W Chromosom werden von Suppressoren (*Sx* orange und *Sw* hellblau), die auf Autosomen (A hellorange) lokalisiert sind, unterdrücken. Das W Chromosom besitzt einen weiteren Suppressor (*Sy*, blau), der die Kopie von *SD* auf dem Y Chromosom, in WY Weibchen reprimiert. Weitere Erklärungen siehe Text. Modell **B**, nach Volf und Schartl [2001], geht von einem dosisabhängigen männlichen Geschlechtsbestimmungsgen (*SD*, grün) aus. Unterschiedliche Kopienanzahlen sind auf den Geschlechtschromosomen (X rot, Y blau und W grau) vorgeschlagen. Weitere Erklärung siehe Text.

## 4.2 Das *Xiphophorus* Melanom-Modell

Nachkommen aus interspezifischen Kreuzungen zwischen Platyfisch (*Xiphophorus maculatus*) und Schwerträger (*Xiphophorus hellerii*) bilden spontan maligne Melanome (böartige Hautgeschwüre) aus (Abb. A8) [Gordon, 1927]. Die Melanome gehen aus speziellen Pigmentzellen, den Makromelanophoren hervor, die deutlich größer sind als

die für die Körperfarbe verantwortlichen Mikromelanophoren [Kallman, 1975]. Induziert werden die Melanome durch ein gestörtes regulatorisches Gleichgewicht zwischen einem dominanten Tumor-Induzierenden-Locus (*Tu*) und einem Tumor-Regulator-Locus (*R*). *R* unterdrückt die onkogene Aktivität von *Tu* und fungiert als Tumor-Suppressor [Nairn et al., 1996; Kazianis et al., 1999]. Beide Loci kommen nur im Platyfisch, nicht aber im Schwertträger vor. Werden Schwertträger und Platyfisch miteinander gekreuzt, sind die Nachkommen der F1-Generation heterozygot für beide Loci. In diesen Hybriden kann eine stärkere Pigmentierung an den Rückenflossen beobachtet werden, die von Makromelanophoren induziert wird. Vereinzelt können benigne Melanome auftreten. Werden diese Kreuzungshybride mit einem Schwertträger zurückgekreuzt, bilden 25% der Nachkommen der F2-Generation maligne und invasive Melanome aus. *Tu* ist in diesen Fischen in Melanomen stark aktiviert, da der wirkungsvolle Tumorsuppressor *R* nicht vorhanden ist. *Tu* und *R* sind auf unterschiedlichen Chromosomen (*R* in Kopplungsgruppe V, *Tu* in Kopplungsgruppe XXIV, Walter et al., 2004) lokalisiert und können daher unabhängig voneinander vererbt werden [Gordon 1927, Kosswig 1928; Scharl, 1995; Meierjohann et al., 2004].



**Abb. A8:** Kreuzungsschema zur Bildung maligner Melanome in interspezifischen *Xiphophorus*-Kreuzungshybriden (Abbildung). Beschreibung siehe Text

Die molekulare Identität des autosomal lokalisierten *R* ist bisher unbekannt. Allerdings konnte in der gleichen Kopplungsgruppe wie *R* (Kopplungsgruppe V) eine orthologe Sequenz zu dem Tumorsuppressor *CDKN2* identifiziert werden. Somit stellt das orthologe *Xiphophorus-CDKN2* einen Kandidaten für *R* dar [Nairn et al., 1996; Kazianis et al., 1998, Meierjohann et al., 2004].



Die molekulare Identität von *Tu* indes ist aufgeklärt. Das Onkogen *Xmrk* (Melanoma-Rezeptor-Tyrosin-Kinase) ist für die Ausbildung der bösartigen und invasiven Tumore verantwortlich und wurde als *Tu* identifiziert [Wittbrod et al., 1989, 1992].

Das Onkogen *Xmrk* entstand durch ein *Xiphophorus* spezifisches Duplikationsereignis aus *egfrb* und kann nicht außerhalb der Gattung *Xiphophorus* nachgewiesen werden [Adam et al., 1993; Volff und Scharl 2003]. Beide Gene, die für einen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor codieren, sind nahezu identisch (lediglich 14 Unterschiede in der Aminosäuresequenz bezogen auf insgesamt 1165 Aminosäurereste). Daher wird angenommen, dass es sich um ein relativ junges, etwa 5 Millionen Jahre altes Duplikationsereignis handelt. [Weis und Scharl, 1998; Volff und Scharl, 2003; Meierjohann et al., 2004].

Beide Gene, *Xmrk* und *egfrb*, liegen in der Subtelomerregion auf den Geschlechtschromosomen etwa 1 Mb voneinander getrennt. *Xmrk* entstand mutmaßlich durch intrachromosomale Segmentduplikation [Gutbrod und Scharl, 1998; Nanda et al., 2000a; Froschauer et al., 2001].

Im Gegensatz zu *egfrb* zeigt *Xmrk* ein begrenzteres Expressionsmuster und ist in Melanomen stark überexprimiert. Die Duplikation in ein neues genomisches Umfeld könnte für die veränderte Transkription verantwortlich sein [Adam et al., 1993, Meierjohann et al., 2004]. In der 5'-Region von *Xmrk* konnte eine Anhäufung einer Wiederholungssequenz namens *xir* nachgewiesen werden. *Xir* gehört zu einem LTR (Lange wiederholende Endsequenz) Retrovirus. Dieses Element könnte bei der veränderten Transkription von *Xmrk* eine Rolle spielen und auch an dem Duplikationsereignis, das zur Entstehung von *Xmrk* führte, beteiligt gewesen sein [Volff et al., 2003; Meierjohann et al., 2004].

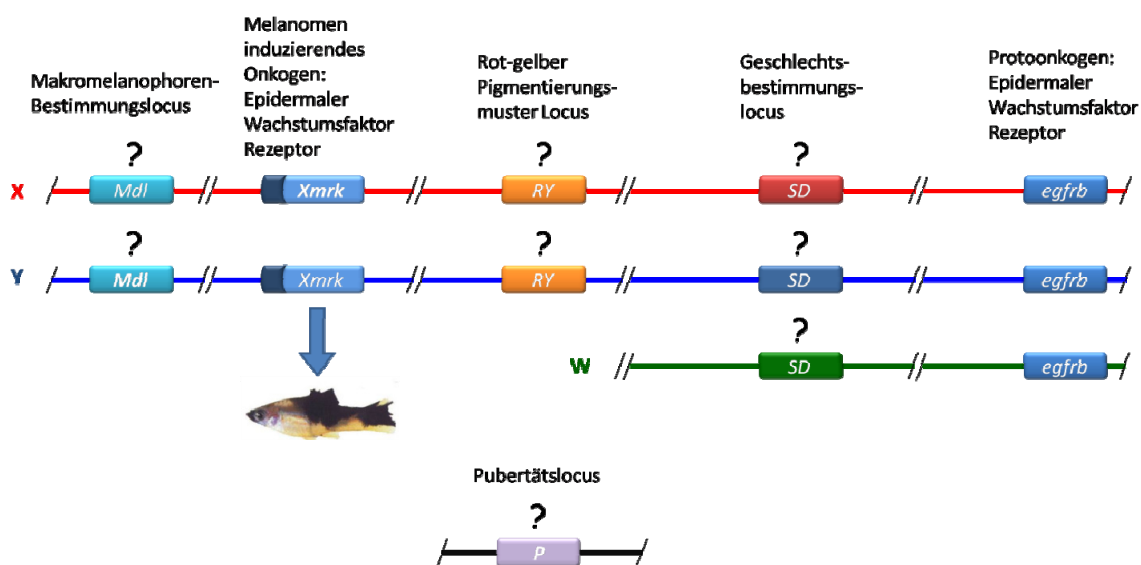
#### **4.2.1 Onkogen und Protoonkogen flankieren die geschlechtsbestimmende Region auf den Geschlechtschromosomen**

##### **Genloci und molekulare Marker in der geschlechtsbestimmenden Region**

Die geschlechtsbestimmende Region befindet sich subtelomerisch auf den Geschlechtschromosomen X und Y (Abb A6, B; A9) und wird von dem Onkogen *Xmrk* und dem Protoonkogen *egfrb* flankiert [Adam et al., 1993; Gutbrod und Scharl, 1999; Volff und Scharl, 2003]. Daher kann 80 jährige Forschung der Melanomentwicklung in

*Xiphophorus* zur Untersuchung der genetischen Geschlechtsbestimmung und der Evolution der Geschlechtschromosomen genutzt werden.

Der Geschlechtsbestimmungslocus (*SD*) ist mit verschiedenen Genloci gekoppelt. Dazu zählt der Pubertätslocus, der bisher noch nicht genau positioniert werden konnte und für den Beginn der Geschlechtsreife verantwortlich ist, sowie zwei Pigmentierungsmusterloci, *RY*- und *Mdl*-Locus. *RY*-Locus ist für die rote, gelbe und bräunliche Färbung der Haut, Iris und Flossen verantwortlich. *Mdl*-Locus trägt die genetische Information für die Ausbildung großer melaninhaltiger Zellen, den sog. Makromelanophoren, die für das vielgestaltige Pigmentierungsmuster verantwortlich sind. In den durch *Xmrk* verursachten Melanomen ist der *Mdl*-Locus für den Phänotyp der Melanome verantwortlich und kann als Tumor-Modifizierer angesehen werden. Die beschriebenen Loci wurden nur auf dem X und Y Chromosom identifiziert. Auf dem W Chromosom hingegen konnten außer dem Protoonkogen keine weiteren Loci nachgewiesen werden [Weis und Schartl, 1996, Kallman 1975, 1989; Gutbrod und Schartl, 1999].



**Abb. A9:** Genloci in der geschlechtsbestimmenden Region auf dem X, Y und W Chromosom von *Xiphophorus maculatus*. Beschreibung siehe Text [nach Gutbrod und Schartl, 1999].

Die molekularen Marker *Xmrk* und *egfrb* limitieren die geschlechtsbestimmende Region auf dem X und Y Chromosom und wurden als Ausgangspunkte für den Aufbau geschlechtschromosomaler Contigs verwendet [Froschauer et al., 2002]. Diese Contigs stellen die Grundlage für die molekulare Untersuchung der geschlechtsbestimmenden Region dar.

## Molekulare Analyse der geschlechtsbestimmenden Region

Erste Sequenzdaten wiesen einige potentielle Gene in der geschlechtsbestimmenden Region nach (siehe Tabelle D7), die ortholog zu Genen anderer Vertebraten sind. Einzelne dieser Gene sind in der geschlechtsbestimmenden Region dupliziert oder liegen als Multikopiengene vor, während es sich in anderen Fischarten oder in Tetrapoden um Einzelgene handelt. Dazu zählen die Multikopiengene *mc4r* (siehe Kapitel D1.3.1) [Froschauer et al, 2002] und *droscha*. *Droscha* codiert für eine Ribonuklease des Typs III. Auch das Onkogen *Xmrk* stellt eine *Xiphophorus*-spezifische Duplikation dar [Adam et al., 1993]. Die geschlechtsbestimmende Region scheint daher anfällig für Genduplikationsereignisse zu sein [Froschauer et al. 2001, Volff und Schartl 2001, Volff et al., 2003].

Jeder identifizierte Genkandidat stellt einen möglichen Kandidaten für die bisher unbekannt Genloci der geschlechtsbestimmenden Region dar. Bioinformatische und molekularbiologische Untersuchungen der potentiellen Gene lieferten bisher noch keinen Kandidaten für den Geschlechtsbestimmenden Locus. Darüber hinaus konnte kein regulatorisches geschlechtsbestimmendes Gen, wie beispielweise *dmrt1* oder ein Gen aus der *Sox*-Genfamilie in der geschlechtsbestimmenden Region identifiziert werden [Veith et al., 2003, Wenning persönliche Kommunikation].

Neben Genkandidaten wiesen Sequenzanalysen eine Fülle von transponierbaren Elementen und sich wiederholenden Sequenzen in der geschlechtsbestimmenden Region auf (siehe Tabelle D6). Transponierbare Elemente wurden 1948 von Barbara Mc Clintock entdeckt [Mc Clintock, 1950]. Dabei handelt es sich um DNA-Fragmente, die ihren Ort im Genom verändern können und in ein neues chromosomales Umfeld transponieren. Eukaryotische transponierbare Elemente werden in zwei Klassen unterteilt. Die Einteilung erfolgt nach dem Mechanismus der Transposition. Klasse 1 Elemente transponieren über eine RNA Zwischenstufe, während Klasse 2 Elemente durch DNA transponieren. Die von Barbara Mc Clintock beschriebenen transponierbaren Elemente, DNA-Transposons, gehören zur zweiten Gruppe. Wie auch Retroelemente sind für DNA-Transposons sich wiederholende Sequenzen, die das Transposon flankieren, charakteristisch. Insertiert ein DNA-Transposon an einer bestimmten Zielstelle im Genom, wird ein kleiner Bereich dupliziert, dieser Vorgang wird Duplizieren der Zielsequenz (TSD- „target site duplication“) genannt. TSD ist eine weitere Charakteristik von DNA-Transposons. Klasse I Elemente, auch Retroelemente bezeichnet, werden

wiederum in zwei Klassen unterteilt. Die Klassifizierung beruht auf der Struktur des Elements. LTR-Retroelemente besitzen lange terminierende Wiederholungssequenzen in gleicher Orientierung (LTR), die Nicht-LTR-Elemente nicht vorweisen [als Zusammenfassung Feschotte et al., 2002].

Neben LTR- und nicht-LTR Retroelementen konnte ein DNA-Transposon, Helitron, in der geschlechtsbestimmenden Region identifiziert werden. Dabei handelt es sich um ein autonomes Element, das über einen rollenden Kreis-Mechanismus transponiert. Im Gegensatz zu den anderen beschriebenen transponierbaren Elementen weist das Helitron auf dem Y Chromosom eine zusätzliche Kopie auf [Zhou et al., 2006]. Auch von der Wiederholungssequenz *xir* konnte eine Y-spezifische Anhäufung in der geschlechtsbestimmenden Region identifiziert werden [Nanda et al., 2000a]. Dies deutet auf eine beginnende molekulare Differenzierung der Geschlechtschromosomen in der geschlechtsbestimmenden Region hin. Gestützt wird diese Vermutung durch die Synaptonemal-Complex-Analysen und vergleichende genomische Hybridisierungsanalyse von Traut und Winking [2001]. Sie konnten eine meiotische Rekombination zwischen dem gesamten X und Y Chromosom nachweisen, die aber in der geschlechtsbestimmenden Region unterdrückt zu sein scheint. Die Untersuchung der geschlechtsbestimmenden Region ist von besonderem Interesse, um weitere molekulare Unterschiede zu identifizieren. Daraus resultierende Ergebnisse könnten zum Verständnis der Evolution der Geschlechtschromosomen beitragen und die molekulare Identität des geschlechtsbestimmenden Locus aufklären.

## B. Material

### 1. Fische

Die verwendeten *Xiphophorus maculatus* Arten stammten aus geschlossenen Zuchten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Schartl, Physiologische Chemie I, Biozentrum der Universität Würzburg (Tabelle B1)

**Tabelle B1.:** Genotypen der verwendeten *Xiphophorus*-Fische; M: Männchen, F: Weibchen;  
\* Unterpopulation von WLC 1235 mit rekombinantem X-Chromosom

Population	Stamm-Nummer	Genotyp
<i>Xiphophorus maculatus</i> Rio Jamapa	WLC 1274, „Schröder“	M: $X^{\text{DrSd/INV1}}/Y^{\text{ArSr/INV2}}$ F: $X^{\text{DrSd/INV1}}/X^{\text{DrSd/INV1}}$
<i>Xiphophorus maculatus</i> Rio Jamapa	WLC 1352, „RJ“	M: $X^{\text{DrSd/INV1}}/Y^{\text{ArSr/INV2}}$ F: $X^{\text{DrSd/INV1}}/X^{\text{DrSd/INV1}}$
<i>Xiphophorus maculatus</i> Rio Jamapa	WLC 1235, „ArDr“	M: $X^{\text{DrSd/INV1}}/Y^{\text{ArSr/INV2}}$ F: $X^{\text{DrSd/INV1}}/X^{\text{DrSd/INV1}}$
<i>Xiphophorus maculatus</i> Rio Jamapa, BCn <i>X.mac/X.hell hIII</i>	WLC 1235, „MAD*/ WAD*“	M: $X^{\text{DrSd/INV2}}/Y^{\text{ArSr/INV2}}$ F: $X^{\text{DrSd/INV1}}/X^{\text{DrSd/INV2}}$
<i>Xiphophorus hellerii</i>	WLC 407	F: $X^{\text{DrSd}}$ in <i>X. hellerii</i>
	WLC 1337, „hIII“	

Andere Fischarten aus der Zuchtanlage der Universität Würzburg sind *Poecilia formosa* (Tampico), *Poecilia mexicana* (Media Luna), *Oryzias latipes* (Stamm HB32c), *Danio rerio* (Stamm m14).

Folgende Fischarten stammen aus der Zucht eines ansässigen Fischers aus Würzburg: Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Hecht (*Esox lucius*), Karpfen (*Cyprinus carpio*), Europäischer Aal (*Anguilla anguilla*) und Stör (*Acipenser sturio*).

### 2. Genomische Bibliotheken

Zwei genomische Bibliotheken wurden in dieser Arbeit verwendet: zum einen eine BAC- (Bacterial Artificial Chromosome)-Bibliothek [Froschauer et al. 2002], zum anderen eine Cosmid-Bibliothek [Burgtorf et al. 1998]. Die BAC-Bibliothek deckt das 10-fache haploide Genom von *Xiphophorus maculatus* XY-Individuen des Stammes Rio Jamapa WLC1274 [Froschauer et al. 2002] ab. Die Cosmid Bibliothek deckt das *Xiphophorus maculatus* Genom 2,7-fach ab [Burgtorf et al. 1998].

### 3. Bakterienstämme und Vektoren

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden *E. coli* DH5 $\alpha$  [Sambrook et al. 1989], *E. coli* XL1-blue [Bullock et al., 1989] oder für Transposontagging *E. coli* JM109 F' Lac[Tnseq2] und *E. coli* HB101 verwendet [Fischer et al., 1996]. Als Vektoren für die Subklonierung von DNA-Fragmenten oder Klonierung von PCR-Produkten wurden pBluescript II KS+/- (STRATAGENE, Amsterdam), pBluescript CS2+ oder pCR®II-TOPO (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe) verwendet. Für die Klonierung von Transposontagging Klonen wurde der Vektor pJOE2114 verwendet [Fischer et al., 1996].

### 4. Enzyme

Superscript™ II Reverse Transkriptase, *Taq* DNA Polymerase, Large Fragment of Polymerase I (Klenow-Polymerase) und Restriktionsendonukleasen wurden von Invitrogen, Karlsruhe, Genaxxon Bioscience, Biberach und Fermentas Life Science, St. Leon-Rot bezogen.

T4-DNA-Ligase, DNaseI (RNase-frei) und alkalische Phosphatase wurden von Roche Diagnostics GMBH, Mannheim bezogen, Proteinase K und RNase A von Merck KGAG, Darmstadt.

### 5. Medien, Zusätze und Pufferlösungen

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle Medien, Zusätze und Pufferlösungen nach Sambrook [1989] hergestellt. Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (50  $\mu\text{g/ml}$ ), Chloramphenicol (12,5  $\mu\text{g/ml}$ ), Kanamycin (30  $\mu\text{g/ml}$ ), Streptomycin (200  $\mu\text{g/ml}$ ), Tetracyclin (15  $\mu\text{g/ml}$ ).

### 6. Sonstige Chemikalien

Chemikalien (höchster Reinheit) wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck KG, Darmstadt; Pharmacia GMBH, Erlangen; Roth Chemie GMBH, Karlsruhe; Serva Electrophoresis GMBH, Heidelberg; Sigma-Aldrich Chemie GMBH, Taufkirchen.

## 7. Oligonukleotid-Primer

DNA-Oligonukleotide wurden von Invitrogen™ sowie biomers.net GmbH (Custom Primers), Ulm bezogen.

cad_F2;	GATGCAGACCAGCACCAGTA
cad_R2;	CCCCAGTCGTTTCAGGTAGTC
KIAA_F1;	GGTTTAGTGTCCGGGTCTGGA
KIAA_R1;	GGCTCTGATCCACTCGTCTC
RNF31_F1;	CCTGTGATTGGCTGACCTCT
RNF31_R1;	GCTGCAGCAGAGACAGAGC
Xmac_FAH_F2;	TGTGGTCCTTCTCAGCATCA
Xmac_FAH_R2;	GACCCTAGCGATGCCATAAA
Xmac_FAH_F4;	CCTGCAGGTATTCAGCCATT
Xmac_FAH_F5;	CCATACAGCCACTTCGGACT
Xmac_FAH_R7;	GCTCCTCCTCCAGTCTTCCT
Xmac_FAH_R4;	CAAAGCCAGGGTAAGGCATA
Xmac_FAH_R5;	CGGAGGTTGTGGATGGTACT
Xmac_FAH_R6;	AGCTCCTCCTCCAGTCTTCCT
Med_FAH/TAN_F4;	TGATTCCCAGGAGGAGACAC
Med_FAH/TAN_R4;	CGACGACTGCACGTAGAAGA
Xmac_FAH_F4;	CCTGCAGGTATTCAGCCATT
Xmac_FAH_F5;	CCATACAGCCACTTCGGACT
Xmac_FAH_R7;	GCTCCTCCTCCAGTCTTCCT
Danio_tan_R2;	GCCAGTACCACGACCTGATT
Med_fah_F2;	GCATTCGATGAGTTTGGTGA
Med_fah_R2;	TGAATTCAGGAGCCAAGGTT
Med_tan_F2;	TTCTCGTGCACCAATAGCAG
Dan_fah_F2;	TCACCACCCAGTAAACCACA
Dan_fah_R2;	CTGTAGGTTGTGGGCCTTGT
Med_fah_F1;	TTCCCACAACAAGCACACAT
Med_fah_R1;	TTTGGGAATGGAGGACAGAG
Med_tan_R2;	CCAACACGGTCCACCTAAAG
Danio_tan_F1;	GAACCCATTGGTGGTTTGTG
Danio_tan_R1;	AGGAATGCCATCAGTGGAAAG
Danio_fah_F1;	ACAATTCACAACCAATGG
Danio_fah_R1;	TTGAATTCTCTTATCTGC
Med_tan_F1;	TTCTCCCTCCATGTCAGGTC
Xmac_fah_F1;	AAGTTCCTCCATCCCAGACCTT
Xmac_fah_R1;	TCGCCATCATAAACAGTGGA
Xmac_tan_F1;	TAGCCATGCCTATGCCCTAC
Xmac_tan_R1;	TGGCGCAACATTCAATAG
Xmac_tan_F2;	ATGTTGAGCTCTCGCTGGTC
Xmac_tan_R2;	AGTGTGTGAGGTGGCTTCC
Xmac_fah_F3;	GACACGGATCTCTTCCCAA
Xmac_fah_R3;	GAGGGGTGGCATGTCTTCTA
Med_fah_F3;	CTCTTTCCCAAGCACGTGTA
Med_fah_R3;	TGTCTCCTCCTGGGAATCAC
Med_tan_F3;	GAAACTGGCTGCGTTAAGA
Med_tan_R3;	TGGACCATAACCATCCCATTT
Danio_fah_F3;	TTGCGGTGTTTGTATCCTG
Danio_fah_R3;	TGTACGAACACGCAGATCAT
Danio_fah_F4;	AAACATGTGCATGCTGTGGT
Danio_fah_R4;	GGTCCAGTAACTTGCCTCCA
Danio_tan_F3;	CTTCCACTGATGGCATTCTC
Danio_tan_R3;	GCTCACATTGCCTATTACAG

## 8. Geräte, Hard- und Software

Folgende Geräter wurden in der Doktorarbeit verwendet:

Gerät	Firma
Kaltzentrifuge	Eppendorf und Beckman Coulter
Superspeed Zentrifuge	Du Pont
CEQTM 2000XL	Beckman Coulter
Heizblock	Hartenstein
Eismaschine	Scotsman
Pipetten	Eppendorf und Gilson
Mikozentrifuge	Eppendorf
PCR-Maschine	Biomed
pH-Meter	WTW pH523, Metrohm-Herisau
DNA/RNA Calculator	Gene Quant II, Amersham
Inkubator	Hartenstein
Elektrophorese-Geräte	Bio-Rad, Hartenstein
Spektrometer	Amersham
Vortexer	Hartenstein
Gene Linker	Biorad

Weitere Geräte werden bei der jeweiligen Methode erwähnt.

### Hard- und Software:

Text- und Bildbearbeitung erfolgten mit Microsoft® Office XP, Vista und Corel Essentials® 9.0/11.0. Sequenzanalysen wurden mit (i) Wisconsin GCG Package Version 10.3, Accelrys Inc., San Diego, CA und der darin enthaltenen PAUP4\* Software durchgeführt, die auf UNIX-basierten Zentralrechnern im Rechenzentrum der Universität Würzburg installiert sind, sowie (ii) mit BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.0.5.2, Tom Hall Nucl. Acids Version 3.1 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net), Kumar et al., 2004) Online Datenbanken und Onlinetools sind im Folgenden aufgelistet und werden in den einzelnen Kapiteln nochmals gesondert aufgeführt.

<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>  
<http://www.repeatmasker.org/>  
<http://www.girinst.org/rebase/index.html>  
<http://www.ensembl.org/index.html>  
<http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>  
<http://www.expasy.ch/>  
<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/sixframe.html>  
<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>  
<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>  
[http://bioinformatics.org/sms2/combine\\_fasta.html](http://bioinformatics.org/sms2/combine_fasta.html)  
<http://filaman.ifm-geomar.de/search.php>  
<http://compbio.dfc.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/Blast/index.cgi>  
[http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)  
<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>  
[http://medaka.lab.nig.ac.jp/est\\_index.html](http://medaka.lab.nig.ac.jp/est_index.html)



## C. Methoden

### 1. Molekularbiologische Methoden

#### 1.1 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

##### 1.1.1 Isolierung hochmolekularer genomischer DNA aus Fischen

Hochmolekulare genomische DNA kann durch Scherkräfte in kleine Bruchstücke zerlegt werden. Daher werden solche Präparate sehr vorsichtig gemischt und pipettiert. Essentieller Schritt ist der proteolytische Abbau der Zellproteine durch Proteinase K. Für eine optimale Aktivität benötigt Proteinase K 0,5% SDS und Temperaturen von 55-65<sup>0</sup>C. Dadurch ist es möglich alle Proteine, sogar bis zu freien Aminosäuren zu entfernen. Durch eine anschließende Phenolfällung wird Proteinase K inaktiviert und entfernt [Lottspeich und Zorbas 1998].

**Durchführung:** Die Fische werden auf Eis betäubt und dekapitiert. Das frisch entnommene oder bei -80°C gelagerte Gewebe eines Individuums (Gehirn, Kiemen, Augen oder ganzer Kopf, Niere, Leber, Milz, Hoden, Muskel) wird in fünffachem Volumen Lysepuffer (200 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH 8, 0,2% (w/v) SDS, 100 µg/ml Proteinase K) in einem Glashomogenisator vorsichtig zerkleinert und 3h bei 80°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Suspension wird in SST-Röhrchen (BECKTON DICKINSON, Rutherford, New Jersey) überführt, mit ½ Volumen Phenol (Roti®-Phenol, ROTH) versetzt und 15 min auf einem Taumelschüttler inkubiert. Nach Zugabe von ½ Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) und weiteren 15 min Inkubation auf dem Taumelschüttler wird zur Phasentrennung 10 min bei 2.500 Upm (Upm – Umdrehungen pro Minute) (HETTICH® Rotina) zentrifugiert. Anschließend wird 1 Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, 15 min inkubiert und zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in ein autoklaviertes Reagenzglas überführt, mit einem Volumen 2-Propanol versetzt und durch leichtes Schütteln vorsichtig gemischt. Die sichtbar ausfallende hochmolekulare DNA wird um einen Glasstab gewickelt, in 70% Ethanol getaucht und in TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8) rückgelöst.

### 1.1.2 Isolierung von Plasmid-, Cosmid-, BAC-DNA

#### 1.1.2.1 Isolierung von Plasmid DNA im kleinen Maßstab

Das alkalische Lyseverfahren von Birnboim und Doly [1979] stellt die am häufigsten angewandte Lysemethode dar.

**Durchführung:** 5 ml einer Bakteriensuspension werden durch Zentrifugation (6000 g für 10 min) sedimentiert. Das Pellet wird in 200 µl Resuspensionspuffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris-Cl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) aufgenommen. Die Suspension wird mit 400 µl alkalischem Lysepuffer (0,2 N NaOH, 1% SDS) versetzt, durch Schütteln gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Neutralisation mit 300 µl Neutralisationspuffer (7,5 M NH<sub>4</sub>OAc) wird die Lösung 5 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird mit 500 µl Isopropanol versetzt und 10 min bei 20.000 g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und die DNA in 300 µl 2 M NH<sub>4</sub>OAc rückgelöst. Der verbleibende Niederschlag wird durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt und durch Zugabe von 200 µl Isopropanol und Zentrifugation gefällt. Das DNA-Pellet wird mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, pH 8) aufgenommen.

#### 1.1.2.2 Isolierung von Plasmid, Cosmid und BAC DNA mittleren Maßstabes

Die Präparation von Plasmid-, Cosmid- und BAC-DNA im mittleren Maßstab erfolgt mit dem QIAGEN® Plasmid Midi Kit nach Angaben des Herstellers, das Kulturvolumen für Cosmide beträgt davon abweichend 150 ml, die für BACs 200 ml.

Bei BAC und Cosmid Klonen, die für Schrotschuss („shot-gun“-)Sequenzierung verwendet werden sollen, wird der QIAGEN® Large-Construct Kit verwendet. Bei diesem Protokoll wird nicht-zirkuläre DNA durch Exonuklease abgebaut, wodurch die Kontamination der DNA-Präparation durch bakterielle genomische DNA vollständig eliminiert werden kann.

### 1.1.3 Isolierung von RNA aus verschiedenen Geweben

Arbeiten mit RNA sollten aufgrund der Anwesenheit von RNasen sehr reinlich durchgeführt werden. RNasen sind wesentlich stabiler als DNasen. Sie benötigen keine Cofaktoren und können nicht durch Autoklavieren zerstört werden. Die zur Isolierung

eingesetzten Puffer sollten daher hoch rein sein. Vorhandene *RNasen* können mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) inaktiviert werden [Lottspeich und Zorbas 1998].

**Durchführung:** Die Gewebe von ca. 10 Fischen (z.B. *Xiphophorus maculatus*, *Oryzias latipes* oder *Danio rerio*) Männchen bzw. Weibchen werden entnommen. Die Gewebe werden getrennt voneinander gepoolt und auf Trockeneis schockgefroren. Pro 50-100 mg Gewebe wird 1 ml Trizol hinzugefügt und im Ultra-Turrax homogenisiert. Bevor die Gewebe 10 min bei 10.000 Upm zentrifugiert werden, werden diese 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführen und es werden 200 µl Chloroform pro 1 ml Trizol hinzugefügt, nach 30 sec Schütteln werden die Proben 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Proben 10 min bei 10.000 Upm zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 500 µl Isopropanol werden hinzugefügt, bevor die Proben 10 min auf Eis inkubiert werden. Anschließend werden die Proben bei 4°C und 10.000 Upm 10 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand abgenommen und das Pellet mit 75% EtOH gewaschen (1 ml pro 1 ml Trizol) und bei 4°C und 10.000 Upm 15 min zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgenommen und das Pellet 1-2 min bei 55°C getrocknet. Nach dem Trocknen wird die RNA in 85 µl DEPC Wasser aufgenommen und mit *DNase* verdaut. Dazu werden 10 µl 10 x *DNase* Puffer und 3-5 µl *DNase* zur RNA hinzugefügt und 30 min bei 37°C inkubiert. Es wird eine RNA Aufreinigung nach MN-Kit-Protokoll (Mackerei und Nagel) angeschlossen.

## 1.2 Aufarbeitung von Nukleinsäuren

### 1.2.1. Restriktionsanalyse

Zur Spaltung der DNA mit kommerziellen Restriktionsendonukleasen werden die empfohlenen Puffer und Inkubationstemperaturen verwendet. Dabei werden maximal 5% (v/v) Enzym eingesetzt, da das im Lagerungspuffer enthaltene Glycerin die Enzymaktivität vermindern kann. Zur Hydrolyse von genomischer DNA wurden 2-5 U Enzym pro µg DNA eingesetzt und 4-6 h inkubiert. Für Plasmide, Cosmide und BACs werden 1-5 U Enzym pro µg DNA verwendet und 1-2 h inkubiert.

### 1.2.2. RFLP (Restriktions-Fragment-Polymorphismus)-Analyse

Die zu untersuchende DNA wird mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, zum Teil auch mit zwei Enzymen. Die erhaltenen Restriktionsfragmente werden mittels Gelelektrophorese der Länge entsprechend aufgetrennt.

### 1.2.3. Gelelektrophorese von DNA und RNA

Linearisierte DNA kann in verschiedenen Gelmatrices im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt und ihre Größe mittels eines Standards bestimmt werden. Für die Elektrophorese von Nukleinsäuren werden Agarose- und Polyacrylamid-Gelsysteme verwendet. Die Polyacrylamidgele zeichnen sich durch ein besonderes Auflösungsvermögen aus, während Agarosegele über einen weit größeren Längenbereich trennen. Grundsätzliche Unterschiede zwischen der elektrophoretischen Auftrennung von DNA und RNA Molekülen bestehen nicht [Jansohn et al., 2007].

#### 1.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA

Agarose wird aus der roten Meeresalge hergestellt. Agarose-Gelsysteme sind die Standardmethode für die Trennung, Isolierung und Reinigung von linearisierter DNA-Fragmenten, superspiralisierter Plasmid-DNA und RNA. Durch die Variation der Agarosekonzentration können DNA und RNA Fragmente unterschiedlicher Größe separiert werden. Die Agarosekonzentration richtet sich nach der zu erwartenden Fragmentgröße. In dieser Arbeit wurden Agarosegele in Konzentrationen von 0,5-2% verwendet. Dazu wurde die Agarose (Roti®-garose, ROTH) in den Laufpuffer TAE (40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8) aufgenommen, durch Aufkochen geschmolzen und nach Abkühlen in den Gelschlitten gegossen, ein Kamm als Platzhalter für die Geltaschen eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose bei Raumtemperatur wird das Gel in die Laufapparatur eingesetzt, die DNA mit 1/10 Volumen Ladepuffer (50% Glycerin, 100 mM EDTA, 1% SDS, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte meist bei 1,5 V/cm für 20 h bis 5 V/cm für 2 h.

#### 1.2.3.2 PFGE ("Pulsed-Field-Gel-Electrophoresis")

Durch PFGE können DNA-Moleküle bis zu einer Größe von 6000 kb separiert werden. Die Methode dient zur Größenbestimmung der BAC-Klone. BAC-DNA (ca. 200ng) wird durch den „rare cutter“ *NotI* (selten schneidende Restriktionsenzyme) fragmentiert und

anschließend auf ein 1,2-1,3 % iges Agarosegel (Roti®-garose, ROTH) aufgetragen. Die DNA-Fragmente wandern unter dem Einfluss von zwei elektrischen Feldern. Das Elektrophoresegerät stammt von STRATAGENE RAGETM (Rotating Agarose Gel Elektrophoresis System), die Einstellung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

#### 1.2.4. Fragmentisolierung (Gelextraktion)

DNA-Fragmente werden aus Agarose-Gelen ausgeschnitten und mit verschiedenen Methoden aus der Agarose isoliert, z.B. für weitere Klonierung, Sequenzierung oder als Hybridisierungs sonden. In dieser Arbeit werden kommerzielle Kits verwendet wie QIAEX® II Gel Extraction Kit (QIAGEN) und Concert™ Rapid Gel Extraction System (INVITROGEN).

#### 1.2.5. Southern-Blotting Verfahren

Die DNA wird mit Restriktionsenzymen verdaut, durch Gelelektrophorese in einem 0,8-1% Agarosegel aufgetrennt und nach fotografischer Analyse mit einem Lineal als Längenlegende auf eine Nylonmembran (Hybond™-N+, AMERSHAM) übertragen.

**Durchführung:** Das Agarosegel wird 2 Mal für 15 min in 0,25 M HCl unter leichtem Schütteln inkubiert. Unter Säureeinwirkung werden die DNA-Fragmente depurinert, was die Übertragung großer Fragmente erleichtert. Darauf folgt die Denaturierung der DNA durch Inkubation in 0,5 M NaOH/ 1,5 M NaCl. Zum Blotten wird das Gel umgekehrt auf eine Glasplatte gelegt. Die Membran, zuvor im selben Puffer äquilibriert, wird auf das Gel gelegt, und zwei getränkte Lagen Gel-Blotting-Papier (SCHLEICHER & SCHÜLL™) als Pufferbrücke auf die Membran gelegt. Zur Erzeugung des Kapillarstroms folgen 10-15 Lagen trockenes Gel-Blotting-Papier und mehrere Lagen Zellstoffpapier. Eine Glasplatte und ein Gewicht werden zur Beschwerung aufgelegt.

Für den schnellen Transfer von Plasmid-, Cosmid-, oder BAC-DNA sind zwei Stunden Transfer ausreichend, da im Gel genügend Puffer (250-300 ml/ 400 cm<sup>2</sup>) enthalten ist. Für den Transfer genomischer DNA wird das Gel auf 2-3 Lagen Saugpapier gelegt, deren Enden in Transferpuffer (0,2 N NaOH) hängen und so einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom aufrechterhalten. Der Transfer erfolgte für mindestens 6 h oder Ü/N.

Nach der Übertragung werden die Geltaschen mit Bleistift auf der Membran eingezeichnet, und zur kovalenten Bindung der DNA an die Membran, die noch feuchte Membran mit UV-Licht bestrahlt (150 mJ, 254 nm, Gs Gene Linker®, BIORAD™) oder 2

Stunden bei 80°C gebacken. Die Membranen werden trocken zwischen Saugpapier gelagert.

### 1.3 Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Unter Klonierung versteht man das Einbringen eines DNA-Fragmentes in einen Vektor, der eine massenhafte Vermehrung der DNA-Fragmente ermöglicht. Im Gegensatz zu PCR-Produkten sind Klonierungsprodukte stabil und einfacher zu handhaben. Darüberhinaus wird das klonierte DNA-Fragment für eine Reihe weiterer molekularbiologischer Methoden zugänglich gemacht, wie beispielsweise *in vitro* Transkription oder Sequenzierung. Diese Anwendungsmöglichkeiten beruhen auf Promoteransatzstellen für RNA Polymerasen oder Primeransatzstellen für verschiedene Sequenzierungsprimer im Vektor [Jansohn et al., 2007; Mülhardt, 2002].

Die Grundlage des Klonierens besteht im Verdau und einer Dephosphorylierung (alkalische Phosphatase) des Vektors (um eine unerwünschte Selbstligation des Vektors zu vermeiden) mit anschließender Aufreinigung, einer sogenannten Phenol Chloroform Extraktion. Dazu wird dem Reaktionsansatz ½ Volumen Phenol und ½ Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1, v/v) zugesetzt, durch Schütteln gemischt und 10 min bei 20.000 g zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die DNA mit 1 Volumen Isopropanol und 0,1 Volumen Natriumacetat gefällt und zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird mit 70% EtOH gewaschen und in geeignetem Puffer oder dH<sub>2</sub>O rückgelöst.

Das DNA-Fragment wird mittels einer Kinase (T4-Polynukleotid-Kinase, Fermentas; eingesetzt nach Angaben des Herstellers) phosphoryliert und ebenfalls aufgereinigt. Anschließend werden Vektor und Fragmente miteinander ligiert und in Bakterien zur Vermehrung transformiert. Zur Ligation von DNA werden T4-DNA-Ligase und Puffer nach Angaben des Herstellers verwendet und mindestens 4 h bei 16°C inkubiert. Für die anschließende Transformation wird zunächst eine Übernachtskultur (LB-Medium) des gewünschten Bakterienstammes angesetzt. Am nächsten Tag wird aus dieser Übernachtskultur eine neue Kultur in 50 ml SOB-Medium abgeimpft und etwa 3-4 h bis zu einer Dichte von 0,4-0,7 (OD<sub>600</sub>) inkubiert. Die Bakterien werden vorsichtig zentrifugiert (5 min bei 3.500 rpm, HETTICH® Rotina). Das Pellet in 4-5 ml TFB (100 mM KCl, 45 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K-MES, pH 6,3) resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 2-4 ml TFB aufgenommen. Nach 20 min Inkubation auf Eis werden zwei Mal 35

$\mu\text{l}$  DnD (90% DMSO, 1 M DTT, 10 mM KOAc, pH 7,5) pro ml TFB zugegeben, gemischt und jeweils weitere 20 min auf Eis inkubiert. Zur Transformation werden 200  $\mu\text{l}$  der nun sehr empfindlichen Bakterien vorsichtig mit der zu transformierenden DNA gemischt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzeschock-Behandlung bei 42°C für 90 sec werden sie nochmals 2 min auf Eis gekühlt, dann mit 800  $\mu\text{l}$  SOB-Medium (20 g/l Trypton, 5,5 g/l Hefeextrakt; 10 mM NaCl, 10 mM KCl) oder LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 10mM NaCl) versetzt und zur Regeneration unter sehr vorsichtigem Schütteln für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Kulturen auf selektiven Agar-Platten (LB-Medium, 15 g/l Agar) ausplattiert.

Anhand des  $\alpha$ -Komplementationstestes lassen sich die Kolonien, die kein rekombinantes Plasmid enthalten aufgrund der Blaufärbung (in Gegensatz zu rekombinaten Klonen, die keine Färbung aufweisen) leicht unterscheidbar. Die Blau-Weiß-Selektion beruht auf einer Unterbrechung des lacZ'-Gens [Ullmann und Perrin, 1970; Mühlrath, 2002; Jansohn et al., 2007]

5ml Übernachtskultur (LB-Medium) werden mit weißen Bakterienkolonien, die rekombinante Plasmide enthalten, angeimpft. Am nächsten Tag werden die Plasmide mittels der Biofeedbackmethode (siehe Kapitel 1.1.2.1) isoliert. Mit Hilfe eines Kontrollverdaus kann die Größe der Inserts getestet werden.

### 1.3.1 Klonierung von PCR Produkten

Bei der Klonierung von PCR-Produkten wird der Vektor mit stumpf schneidenden Restriktionsenzymen aufgeschnitten. Die überhängenden Enden des PCR-Produktes werden mit Klenow-Polymerase am 5'Ende aufgebaut und am 3'Ende abgebaut, um stumpfe Enden zu erhalten. Anschließend werden PCR-Produkt und Vektor miteinander ligiert (siehe oben Abschnitt C1.3).

### 1.3.2. Klonierung zufällig zerkleinerter DNA-Fragmente verschiedener BAC (artifizielles Bakterienchromosom) –Klone (Schrotschuss-Methode)

Diese Methode erlaubt eine zufällige Sequenzierung der verwendeten Ursprungs-DNA. Ziel ist die Erzeugung von überlappenden Sequenzen.

Die zur Schrotschuss („shot gun“-Methode ausgewählten Klone werden mittels der Restriktionsenzyme *HindIII* und *PstI* zunächst verdaut, aufgereinigt und anschließend in den Vektor pBluescript kloniert. Eine andere Strategie, die sogenannte Topo-Methode



(one shot TA-cloning, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Durchführung nach Angaben des Herstellers) beruht auf der physikalischen Scherung der DNA mittels Luftdruck. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Methode sind die entstehenden DNA-Fragmente unabhängig von der Nukleotidzusammensetzung und entsprechen daher eher einer proportionalen Verteilung. Die Fragmente werden in den Topo-Vektor (pCR®II-TOPO Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe) kloniert.

Durch die Primeransatzstelle des Vektors können die Fragmente des rekombinanten Vektors von beiden Seiten her sequenziert werden (siehe Kapitel C1.3.4). Alle Sequenzen wurden zu verschiedenen Online-Datenbanken (siehe Kapitel B8.) gesendet und mit den dort gespeicherten Sequenzen verglichen.

### 1.3.3. Transposon-Mutagenese

Das Transposon-Mutagenese-Verfahren ist eine schnelle und effiziente Methode, um große DNA-Fragmente vollständig zu sequenzieren. Die Methode beruht auf dem zufälligen Einspringen eines Transposons in das zu sequenzierende DNA-Fragment, das in einem rekombinanten Vektor kloniert wurde. Aufgrund der Primeransatzstelle im Transposon kann das DNA-Fragment, ausgehend von der Insertionsstelle, sequenziert werden.

Die zu sequenzierenden Fragmente werden zwischen zwei gegensätzlich angeordneten *res*-sites (Ansatzstelle für die Resolvase, die die homologe Rekombination zwischen den *res*-sites katalysiert) in den Vektor pJOE2114 [Fischer et al., 1996] kloniert. Der rekombinante Vektor wird in einen F'-Plasmid enthaltenen *E. coli*-Stamm transformiert, dessen F-Plasmid ein modifiziertes Transposon TnSeq2 trägt. Dieses Transposon enthält außer Genen für Transposase und Resolvase eine Primeransatzstelle. Innerhalb des Bakteriums kommt es zur Bildung eines Cointegrates aus Transposon und Vektor, katalysiert von der Transposase. Integriert das Transposon in das zu sequenzierende DNA-Fragment, löst sich aufgrund der Rekombination zwischen den *res*-sites des Vektors und des Transposons das Cointegrat auf. Katalysiert wird der Vorgang durch die Resolvase. Sequenzen, die zwischen dem *res*-sites liegen werden deletiert. Im Vektor verbleibt ein verkürztes DNA-Fragment und Primeransatzstelle und Restriktionsschnittstellen des Transposons. Mittels der Primeransatzstelle wird eine Sequenzierung von der Integrationsstelle mit nur einem Primer ermöglicht.

**Durchführung:** Das zu sequenzierende Fragment wird in den Vektor pJOE2114 kloniert und in den *E. coli*-Stamm JM108F' [Fischer et al., 1996], der das F-Plasmid mit



Tetracyclinresistenz und dem Transposon TnSeq2 enthält, transformiert und anschließend auf Ampicillin-Platten (LB-Platten mit 15g/l Agar mit Ampicillin 50 µg/ml) ausplattiert. Aufgrund der Ampicillinresistenz des rekombinanten Vektors können nur die Bakterien Kolonien bilden, die den rekombinanten Vektor aufgenommen haben. Inkubation erfolgt über Nacht und einer Temperatur von 30°C, die die Bildung des Cointegrates zwischen dem Vektor und Tnseq2 begünstigt. Parallel dazu wird eine Übernachtskultur des *E.coli*-Bakterienstammes HB101 [Fischer et al., 1996] angesetzt. Am nächsten Tag wird der Bakterienrasen mit 5ml LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 10mM NaCl) abgeschwemmt und eine Gesamtmenge von 100µl einer Übernachtskultur *E. coli* HB101 als Konjugations-Rezipient im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Konjugation von JM108F' und HB101 findet bei 30°C ohne Zugabe von Antibiotikum statt. Dabei wird das Fusionsprodukt wie oben beschrieben aufgelöst. Anschließend wird die Bakterienkultur auf Streptomycin-Ampicillin-Platten ausplattiert. Nur streptomycinresistente HB101 Bakterien, die ein Fusionsprodukt mit Ampicillinresistenz enthalten, können Bakterienkulturen ausbilden. Am nächsten Tag wird eine Übernachtskultur (5 ml LB-Medium) mit Bakterienkolonien angeimpft. Das Plasmid wird am darauf folgenden Tag mittels der Biofeedbackmethode (Kapitel C1.1.2.1) isoliert und mittels zweier Kontrollverdau kann die Größe (*EcoRV*-Verdau) und die Orientierung (*ScaI*-Verdau) der Primeransatzstelle ermittelt werden [Fischer et al., 1996].

#### 1.3.4 Sequenzanalysen

Die DNA-Sequenzierung nach der Didesoxy- oder Kettenabbruchmethode [Sanger, 1981] ist trotz vielfältiger Weiterentwicklungen prinzipiell unverändert geblieben. Nach der Denaturierung der DNA und der Anlagerung eines Oligonukleotids verlängert eine thermostabile Polymerase die DNA-Sequenz, bis es durch den Einbau eines speziell veränderten Nukleotids zum Kettenabbruch kommt. Im Gegensatz zur PCR wird hierbei nur einzelsträngige DNA gebildet und die Vermehrung läuft nur linear, weshalb als Matrize reaktiv viel DNA benötigt wird (bis zu 1 µg Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkt). Dazu wird die zu sequenzierende DNA mittels PCR oder nach Klonierung in Bakterien vermehrt. Plasmide bieten hierbei den Vorteil, dass immer die gleichen Oligonukleotide mit standardisierten Methoden verwendet werden können.

Die Bestimmung der Nukleotid-Sequenz erfolgt in denaturierenden Gelen, in automatisierten Verfahren werden Fluoreszenzfarbstoffe, die an die Sequenzierprimer

oder Nucleotide gekoppelt sind, durch Laserstrahlen angeregt und die gemessene Fluoreszenz elektronisch gespeichert und ausgewertet.

**Durchführung:** Plasmid-DNA und PCR-Produkte werden mit unmarkierten Oligonukleotiden und dem CEQ™ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick-Start Kit (BECKMAN COULTER™) sequenziert. Abweichend vom Herstellerprotokoll werden zur Sequenzierung von Plasmiden nur 3 µl DTCS Vormix pro Reaktion eingesetzt. Primer werden mit einer Konzentration von 5 bis 10 pmol/µl eingesetzt. Folgendes Standardprogramm wird eingesetzt: 98°C, 40 sec; 30 Zyklen: 96°C 20 sec, 50°C 20 sec; zum Abschluß 65°C 4 min.

Anschließend werden die Proben gefällt. Zum Sequenzierungsansatz werden 2µl EDTA (100mM, pH8), 2µl Natriumacetat (3M, pH 5,2), 1µl Glycogen (20mg/ml ist im CEQ™ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit enthalten) 10µl Wasser und 60 µl Ethanol (100%, -20°C) hinzugefügt. Der Ansatz wird mit dem Vortexer gut gemischt und bei 14.000 Upm (Umdrehungen pro Minute) und 4°C (Microfuge 22R BECKMAN COULTER™) 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgezogen und verworfen und das Pellet mit 200 µl Ethanol (70%, Raumtemperatur) gewaschen. Anschließend wird die Probe bei 4°C und 14.000 Upm 5 min abzentrifugiert. Das getrocknete Pellet wird in 30µl Sample Loading Solution (CEQ™ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick-Start Kit, BECKMAN COULTER™) rückgelöst. Die Sequenzierung erfolgt mit CEQ™ 2000 XL nach Angaben des Herstellers. Die Auswertung wurde mittels der Software des CEQ™ 2000XL durchgeführt.

#### 1.4 DNA-Hybridisierung nach Southern-Blotting

Unter Hybridisierung versteht man die Reassoziaton von einer einzelsträngigen zu einer doppelsträngigen Nukleinsäure. Bei der Schmelztemperatur  $T_m$  liegt die Hälfte der Nukleinsäure als Doppelstrang vor und stellt daher ein thermodynamisches Gleichgewicht dar. Verschiedene Faktoren, wie Salzkonzentration oder Temperatur, können die Schmelztemperatur beeinflussen und damit auch die Hybridisierungsreaktion. Dazu zählt auch Formamid, das die Schmelztemperatur verringert.

Als Hybridisierungsprobe können einzelsträngige, radioaktiv markierte DNA und RNA Nukleotidsequenzen verwendet werden. Die Sonden hybridisieren mit der komplementären Zielsequenz. Das radioaktive Signal kann mittels Röntgenfilmen detektiert werden [Jansohn et al., 2007; Mülhardt 2002].

**Durchführung:** Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Membran erfolgt eine Vorhybridisierung in Hybridisierungspuffer (35-50% Formamid, 5 x Denhardt's solution, 5 x SSC, 1% SDS, 0,1% Na-Pyrophosphat, 50 mM Tris-Cl, pH 8, 0,1 µg/ml denaturierte Kalbsthymus-DNA) Ü/N (über Nacht) bei 42°C in einem rotierenden Gefäß. Die Hybridisierung erfolgt in 5-10 ml frischem Hybridisierungspuffer nach Zugabe der durch Kochen denaturierten Sonde (siehe Kapitel. C1.5) ebenfalls Ü/N.

Die Spezifität der Hybridisierung wird durch verschiedene Waschschrte analysiert: Nach der Entfernung des Hybridisierungspuffers mit 10 ml 2 x SSC/ 1% SDS für 15 min im rotierenden Gefäß folgen Waschschrte mit steigender Stringenz, beginnend mit 50-55°C mit 2 x SSC/ 1% SDS für heterologe Sonden bzw. 55-65°C in 1 x SSC/ 1% SDS für homologe Sonden. Nach jedem Waschschrte wird die Hybridisierung mit einem Röntgenfilm und einer das Signal verstärkenden Folie detektiert.

Zur Entfernung der Sonde wird die Membran in 0,1 x SSC/ 1% SDS bei 68-72°C für 30 min gewaschen. Gelingt dies nicht, wird die Membran bis zum Abklingen der Strahlung gelagert.

## 1.5 Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden

Als Sonden werden DNA-Fragmente unterschiedlicher Herkunft verwendet, die durch Gelelektrophorese isoliert und aufgereinigt werden. PCR (Polymerasekettenreaktion, siehe Kapitel C1.6)-Produkte werden mittels Linker-PCR (siehe Kapitel C1.6.2.2) generiert oder nach Sequenzanalyse mit spezifischen Oligonukleotiden zu einer Zielsequenz amplifiziert. Klonierte Fragmente werden mittels geeigneter Restriktionsenzyme aus dem Vektor geschnitten, um die Vektoranteile in der Sonde zu minimieren.

### 1.5.1 Markierung von DNA-Fragmenten durch random-priming mittels Hexanukleotiden

Nach der modifizierten Methode von Feinberg und Vogelstein [1984] können DNA-Fragmente einer Größe von 100-1000 bp radioaktiv markiert werden. Dazu wird der DNA-Doppelstrang denaturiert und anschließend mit verschiedenen Reaktionspartnern und Zufallshexanukleotiden als Primer hybridisiert. Die Markierung erfolgt mittels des Klenow-Fragments. Dabei wird ein radioaktiv markierter Gegenstrang synthetisiert [Jansohn et al., 2007; Mülhardt 2002].

**Durchführung:** 50-100 ng DNA-Sonde werden in einem Gesamtvolumen von 33 µl 10 min bei 95°C denaturiert. Nach Zugabe von 10 µl OLB-Mix [1 M Hepes, 250 mM Tris-Cl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,35% Mercaptoethanol, 100 µM dATP, 100 µM dGTP, 100 µM dTTP, OD 27/ml Hexanukleotide (pd(N)<sub>6</sub>, AMERSHAM™)] wird die Probe zur Anlagerung der zufällig synthetisierten Hexanukleotide auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl BSA (5 mg/ml), 3 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (Nominalaktivität 30 µCi, HARTMANN ANALYTIC™) und 4 U Klenow-Polymerase wird 2 h bei 37°C inkubiert.

Zur Kontrolle des radioaktiven Einbaus werden nicht eingebaute Nukleotide durch Zentrifugation über eine Sephadex-G50 Spin-Säule abgetrennt und die Probe im Szintillationszähler (MR 300, KONTRON) vermessen. Danach kann die Probe direkt zur Hybridisierung eingesetzt werden oder einige Tage bei -20°C gelagert werden.

### 1.5.2 Markierung von DNA-Fragmenten durch PCR

Zur Markierung kleinerer DNA-Fragmente unter 100 bp wird eine PCR (Polymerasekettenreaktion siehe Kapitel 1.6) durchgeführt. Dazu werden 2-10 ng des DNA-Fragments als Matrize eingesetzt. Zum Ansatz werden drei nicht radioaktiv markierte dNTP und ein radioaktiv markiertes [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (10 mCi/ml, sp act. 3000 Ci/mmol, HARTMANN ANALYTIC™) neben Taq-Polymerase (7,5 U) und Primern (je 20 µM) hinzugefügt und eine PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 30 Zyklen (39 sec 94°C; 30 sec 55-60°C; 1-2 min 72°C). Zum Abschluss 4°C. Das radioaktiv markierte PCR-Produkt wird über Säule aufgereinigt, um von nicht eingebauten dNTPs und störenden Puffern getrennt zu werden.

## 1.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der PCR (Polymerasen-Kettenreaktion) wurde 1987 von K Mullis entwickelt und ermöglicht die enzymatische Amplifikation von bestimmten Nukleotidsequenzen [Saiki et al., 1988].

### 1.6.1 Standard-PCR

Als Matrize dienen 100 ng genomische DNA, 2,5 ng Plasmid-DNA oder 5 ng BAC-DNA. Die DNA-Matrize wird in einem 50 µl Ansatz in 1 x PCR-Puffer (20 mM Tris-Cl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Triton X-100, 2 mg/ml BSA), 5% DMSO, 10 pmol jedes Primers, 10 mmol jedes Nukleotids, und 1 U Taq-Polymerase (von Prof. Dr.

Manfred Gessler zur Verfügung gestellt) auf Eis gemischt und unmittelbar danach in der vorgeheizten PCR-Maschine inkubiert.

Ein meist erfolgreiches Programm ist 1\* [3'00'' x 95°C], 35\* [0'45'' x 95°C/ 0'45'' x 55°C/ 1'30'' x 72°C], 1\* [5'00'' x 72°C], 4°C.

## 1.6.2 Anwendungen der PCR:

### 1.6.2.1 Amplifizierung von 5'- und 3'-cDNA-Enden (RACE; Rapid amplification of cDNA ends)

Steht nur eine begrenzte Sequenzinformation zur Verfügung und/oder zur Bestätigung zusammengesetzter cDNA-Sequenzen aus Datenbankanalysen kann eine spezielle PCR-Methode angewandt werden. Die Methode der „rapid amplification of cDNA end“ (RACE-PCR [Frohman et al., 1988]) ermöglicht die vollständige Sequenzierung von cDNA-Sequenzen. Sie kann zur Amplifikation sowohl des 3'- als auch des 5'-Endes durchgeführt werden. Die Amplifizierung des 3' Endes beginnt mit der Synthese eines cDNA-Erststranges mit einem Oligo(dT)nukleotidprimer. Der Primer hybridisiert am Poly-A-Schwanz des mRNA-Moleküls. Anschließend wird eine PCR mit einem sequenzspezifischen Primer und einem Primer, der komplementär zum Poly-A-Schwanz ist, durchgeführt. Durch Sequenzierung des PCR-Produkts kann das unbekannte Ende des cDNA-Fragments entschlüsselt werden.

Um die unbekannte 5'-Region eines cDNA-Fragments zu entschlüsseln wird ein sequenzspezifischer Primer zur Synthese des Erststranges verwendet an dessen Ende ein 20-100 bp Sequenzstück ligiert wird. Dieses künstliche Ende dient in einer zweiten PCR als Primeransatzstelle.

**Durchführung:** Die Durchführung erfolgt nach dem Protokoll 5'- bzw. 3'- RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version 2.0 von Invitrogen Life Technologies.

### 1.6.2.2 Amplifizierung von BAC-Enden (Linker-PCR nach Riley, 1990)

Diese Methode dient zur Amplifikation unbekannter, an der Klonierungsstelle von Cosmiden bzw. BACs anschließender Sequenzen und wird verändert nach Riley [1990] durchgeführt. Solche sogenannten Endproben stellen aufgrund ihrer Lage am äußersten Rand eines Klons die für das „Genom-Walking“ interessantesten Hybridisierungssonden dar und können ohne weitere Analyse ihrer Sequenz direkt aus der DNA eines Klons hergestellt werden.

**Durchführung:** Die DNA des Klons wird mit mehreren stumpf schneidenden Restriktionsenzymen in parallelen Ansätzen verdaut, mit Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Anschließend wird ein partiell doppelsträngiger Linker-Mix (1 µM LIS1 + 1 µM LIS2, zum Annealing auf 68°C erwärmt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, gelagert bei -20°C) (Tabelle C1) ligiert. Die anschließende PCR wird mit einem Vektor-spezifischen Oligonukleotid und LIS1, dem längeren Oligonukleotid des Linker-Mixes, durchgeführt, was zur bevorzugten Amplifikation von Fragmenten mit Vektoranteil führt. Meistens werden die neun folgenden Enzyme verwendet: *DraI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HincII*, *PvuII*, *RsaI*, *ScaI*, *SmaI*, und *StuI*.

Die PCR wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt 1 Zyklus [3'00'' x 95°C], 35 Zyklen [0'30'' x 95°C/ 0'30'' x 60 °C/ 1'00'' x 72°C], 1 Zyklus [5'00'' x 72°C], 4°C.

**Tabelle C1:** Oligonukleotide (INVITROGEN), die für die Linker-PCR eingesetzt wurden. Die letzte Zeile veranschaulicht die Struktur des Linker-Mixes (siehe Text).

Name	Sequenz	Verwendung
SP6	5'-CGA TTT AGG TGA CAC TAT AGA-3'	Primer für Vektor Lawrist 7
T8	5'-CGG AAG CTG CGG CCG CGG TA-3'	Primer für Vektor Lawrist 7
LIS 1	5'-GCG GTG ACC CGG GAG ATC TGA ATT C-3'	Primer für Linker-PCR
LIS 2	5'-GAA TTC AGA TC-3'	Oligonukleotid für Linker-Mix
LIS1::LIS 2	5'-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-3' 3'-CTAGACTTAAG-5'	Linker-Mix

### 1.6.2.3 Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Methode beruht auf der Herstellung von cDNA (komplementäre DNA) aus RNA, die später als Matrize für eine PCR genutzt wird. Auf diese Weise kann die Transkription eines Gens in verschiedenen Geweben oder Embryonalstadien nachgewiesen werden.

2 µg RNA wurden mit Reverser Transkriptase (Superscript™ II RT, INVITROGEN) nach Angaben des Herstellers in cDNA transkribiert. Dazu wurden Hexanukleotide (pd(N)<sub>6</sub>, AMERSHAM™) als Primer verwendet.

Zur Kontrolle der Reaktion wird eine 1:10 Verdünnung der cDNA hergestellt und die Expression von Aktin mittels PCR analysiert (Oligonukleotide Act1 + Act2; 1 Zyklus [3'00'' x 95°C], 25 Zyklen [0'45'' x 95°C/ 0'45'' x 55 °C/ 1'30'' x 72°C], 1 Zyklus [5'00'' x 72°C], 4°C). Die Verdünnung und die geringe Anzahl von Zyklen sollen nach der optischen Analyse eines Agarose-Gels zeigen, ob gleich viel cDNA in den verschiedenen Ansätzen ist.

#### 1.6.2.4 Hot-PCR

siehe Markierung von DNA-Fragmenten durch PCR.

### 1.7 Synthese und Verarbeitung von RNA

#### 1.7.1 cDNA Synthese durch Reverse Transkription von RNA

2 µg RNA werden mit Reverser Transkriptase (Superscript™ II RT, INVITROGEN) nach Angaben des Herstellers in cDNA transkribiert. Dazu werden Hexanukleotide (pd(N)<sub>6</sub>, AMERSHAM™) als Primer verwendet.

#### 1.7.2 *In-vitro*-Transkription (RNA-Synthese)

Die in dieser Arbeit durchgeführte *in vitro*-Transkription dient zur Herstellung einer markierten RNA-Sonde für verschiedene *in situ*-Hybridisierungsverfahren. Dazu wird 1 µl linearisierte Matrizen-DNA in einem 20 µl Ansatz mit 20 µl DIG (Digoxigenin) RNA labelling Mix, 2 µl Transkriptionspuffer-Puffer und 1 µl Polymerase (T7/Sp6 Polymerase, Roche, Mannheim) zusammengemischt und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl DNase (Roche, Mannheim), die die Matrize zerstört, und weiterer Inkubation von 30 min wird das Transkript über Säule (Nucleon Spin® RNA-Clean-up von Macherey und Nagel nach Angaben des Herstellers) aufgereinigt.

### 1.8 Untersuchung der Genexpression durch *In-situ*-Hybridisierung

#### 1.8.1 *In-situ*-Hybridisierung (in Geweben sowie auf Parafinschnitten)

Mittels dieser Methode kann RNA im Gewebe nachgewiesen werden, um die gewebsspezifische Expression eines Gens sichtbar zu machen. Dazu wird ein zur Ziel-RNA markierter Gegenstrang synthetisiert (siehe *in vitro*-Transkription) und als Sonde im Gewebe oder auf Gewebeschnitten eingesetzt [Jansohn et al., 2007; Mülhardt, 2002].

#### 1.8.2 *In situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten

**Durchführung:** Zur Fixierung werden die Gewebe in einer 4% PFA/0,85 x PBS-Lösung (10x PBS-Stock: 80 g/l NaCl, 2 g/l KCl, 14,4 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,4 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in Wasser, pH 7,4) bei 4°C über Nacht inkubiert. Durch eine aufsteigende Ethanolreihe (jeweils 10 min in 25% EtOH/PBS, 50% EtOH/PBS, 75% EtOH/PBS, 75%EtOH-DEPC-H<sub>2</sub>O, 100%



EtOH) werden die Gewebe am nächsten Tag dehydriert und können in 100% Ethanol mehrere Monate bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Vor der Einbettung in Parafin werden die Gewebe 2 x 20 min in Xylol gesäubert. Die in Parafin eingebetteten Gewebe werden mit einem Mikrotom (Mikrotom 1400, Leitz/Leica GmbH, Wetzlar) geschnitten und auf einem Polysine<sup>TM</sup>-Objektträger (Menzel-Gläser, Mentzel GmbH und Co KG, Braunschweig) fixiert. Die Objektträger können bei  $4^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Vor Hybridisierung der Sonde müssen die Objektträger mehrmals in Xylol gewaschen werden und in einer aufsteigenden PBS-Reihe rehydriert werden (je 5 min: 100% EtOH, 75% EtOH/DEPC H<sub>2</sub>O, 50% EtOH/PBS, 25% EtOH/PBS, 100% PBS, 100% PBS). Vor der Hybridisierung werden die Objektträger zunächst in 4%PFA/0,85 PBS und anschließend in PBT gewaschen, gefolgt von einem Proteinase K Verdau. Nach 15 Minuten werden die Schnitte wieder in PBT gewaschen und 15 min mit 250 $\mu\text{l}$  Acetic-Anhydrid [Acetat-Anhydrid in 100ml 0,1M TEA (Triethanolamin)] acetyliert. Danach werden die Schnitte wieder in PBT (2 x 5 min) gewaschen und eine halbe Stunde an der Luft getrocknet. Danach werden 200  $\mu\text{l}$  der Vorhybridierungslösung (Hybmix: 1,3x SSC, 50% deionisiertes Formamid, 10% Dextran Sulfat, 1x Denhardt's Solution, 1mg/ml Torula RNA) auf jeden Objektträger gegeben, mit einem Deckgläschen verschlossen und in einer feuchten Kammer 1-2 Stunden bei  $65^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wird die Vorhybridierungslösung durch die Sonde (Riboprobe mit Hybmix auf 0,1-1 $\mu\text{g/ml}$  verdünnt) ersetzt und über Nacht bei  $65^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Der Hybridisierung schließen sich am nächsten Tag verschiedene Waschschrte in 5 x SSC (20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Natrium-Citrat x 2H<sub>2</sub>O, pH5,0) und ein 30 minütiges Waschen in 1 x SSC/50% Formamid bei  $65^{\circ}\text{C}$  gefolgt von 15 minütigem Waschen in TNE (1M Tris pH 7,5; 500mM NaCl, 1mM EDTA) bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wird ein RNase (20 $\mu\text{g/ml}$ ) Verdau durchgeführt (30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  in TNE). Danach werden die Schnitte wieder in SSC gewaschen (jeweils 20 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  mit 2xSSC, 0,2xSSC, 0,2xSSC) und für die Antikörperinkubation vorbereitet. Dazu werden die Schnitte zunächst in zweimal bei Raumtemperatur in MABT [1x MAB + 0,1% Tween-20 (2x MAB: 23,2 g Maleinsäure, 17,5g NaCl ad 800 ml H<sub>2</sub>O, pH7,5)] gewaschen. Nach dem Trocken wird die Blocking-Lösung (600 $\mu\text{l}$  MABT, 200 $\mu\text{l}$  Schafserum, 200 $\mu\text{l}$  10% Blocking Reagent (BM 1096176, Boehringer Ingelheim) in 1x MABT gelöst), auf die Objektträger pipettiert und 1h inkubiert. Anschließend wird die Lösung vom Objektträger wieder abgetropft und durch 900 $\mu\text{l}$  Antikörperlösung (Anti-DIG-Alkaline Phosphatase in Blocking-Lösung; Verdünnung: 1:1000, vor Gebrauch 1h bei  $4^{\circ}\text{C}$  schütteln) ersetzt und



über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Objektträger mit MABT abgespült und 3- bis 4-mal für 20 min mit MABT bei Raumtemperatur gewaschen. Danach werden die Objektträger 2 mal 10 Minuten in NTT 5M (Alkaline-Phosphatase staining buffer NaCl; 1M Tris HCl, pH 9,5; 20% Tween-20) mit 2 mM Levamisol auf einem Schüttler bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wird das Gemisch aus 20µl Antikörperfärbelösung NBT/BCIP (Roche) mit 1ml NTT auf jeden Objektträger pipettiert und für mindestens eine Stunde bis zu drei Tagen im Dunkeln in einer feuchten Box inkubiert. Die NBT/BCIP Lösung wird bei längeren Inkubationszeiten gewechselt. Zum Abstoppen der Färbereaktion werden die Objektträger 2 mal in PBT gewaschen gefolgt von 30 minütigem Waschen in 4% PFA/0,85% PBS danach werden die Objektträger mit Wasser abgespült und in 65°C warmem Gelvatol fixiert.

### 1.8.3 *In situ*-Hybridisierung in Gewebe und Embryonen

Die fixierten Gewebe oder Embryonen werden in einer absteigenden Methanolreihe rehydriert (je 5 min 75% Methanol/PBST [PBST: 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in Wasser, pH 7,4] 50% Methanol/PBST, 25% Methanol/PBST) und in PBST gewaschen. Dem Proteinase K-Verdau (10x Proteinase K-Lösung: 0,5M Tris-HCl pH 7,5; 0,05M EDTA; 10µg/ml Proteinase K erst kurz vor Gebrauch hinzufügen) schließt sich zweimaliges Waschen in PBST und Fixierung in 4% Paraformaldehyd mit anschließendem erneutem Waschen in PBST an. Für die Hybridisierung werden 500 µl der Vor-Hybridisierungspuffer (Hybmix: 50% deionisiertes Formamid, 12,5 ml 20x SSC, 10% Tween-20, 150 µg/ml Heparin, 5 mg/ml Torula RNA in H<sub>2</sub>O) auf die Probe gegeben und 1-8 h bei 55°C inkubiert, diese wird dann durch die erhitzte (500µl, 80°C) Hybridisierungslösung mit Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht. Am nächsten Tag schließen sich eine Reihe von Waschschritten in SSCT (alle Waschschrritte werden bei 65°C je 30 min durchgeführt: 2x SSCT/50% deionisiertes Formamid; 2x SSCT; zweimal in 0,2x SSCT) und eine Blockierung mit Schaf-Serum (5% Schaf-Serum in PBST) an, bevor der Antikörper (anti-DIG-Antikörperlösung) zur Probe hinzugefügt wird und über Nacht bei 4°C inkubiert wird. Am nächsten Tag werden die Proben mehrmals in PBST (6x 20 min) und 3 x 15 min in SB (5M NaCl, 1M MgCl<sub>2</sub>, 1M Tris-HCl, pH 9,2; 0,5% Tween-20 (10% w/v)) gewaschen und mit der Färbelösung (1 Tablette NBT/BCIP (Roche), 5M NaCl, 1M Tris-HCl, pH9,5, 0,5% Tween-20 (10% w/v) bei Raumtemperatur mehrere Stunden inkubiert.

Anschließend wird die Färberaktion durch 3 mal 2 minütiges Waschen in PBST abgestoppt.

## 2. Cytogenetische Methoden

### 2.1 Chromosomen-Präparation und Fixierung

Methode zur Präparation von Chromosomen aus Fibroblasten.

**Durchführung:** Durch Zugabe von 0,5% Colchizin (ca. 4h) arretieren die Chromosomen in der Metaphase. Zum Ernten der Zellen wird 1 ml Trypsin auf die Zellsuspension gegeben und sofort wieder abgegossen. Das Ablösen der Zellen vom Gefäßboden kann unter dem Mikroskop beobachtet werden. Sind die Zellen vollständig gelöst, werden diese in ein Falcon überführt, abzentrifugiert und das Pellet in KCl (0,075M) rückgelöst. Diese hypotonische KCl-Lösung lässt die Zellen zerplatzen. Sind die Zellen dieser Lösung zu lange ausgesetzt können die Chromosomen beschädigt werden, da die intrazelluläre gelartige Struktur, die die Chromosomen umgeben, zerstört wird. Bei zu kurzer Einwirkzeit bleiben die Chromosomen übereinander gelagert und eine Auswertung der FISH-Analyse ist nur schwer möglich. Die Einwirkzeit ist von dem Zelltyp abhängig. Für die *Xiphophorus* Fibroblasten-Zellkultur reicht eine Einwirkzeit von 20 min aus. Die Reaktion wird mittels Zugabe 1,5 ml Fixierungslösung, bestehend aus 3 Teilen eiskaltem Methanol und 1 Teil Essigsäure, nach ca. 20 min abgestoppt und anschließend bei 1500 Upm und Raumtemperatur für 10 min abzentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und das Pellet im verbleibenden Überstand ca. 1 ml vorsichtig rückgelöst. Anschließend wird die Probe mit Fixierungslösung auf 6 ml aufgefüllen, ca. 5 min auf Eis gestellt und 7 min bei 2000 Upm und 4°C abzentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und das Pellet in frischer Fixierungslösung rückgelöst. Die Chromosomen werden unter dem Mikroskop kontrolliert. Evtl. kann eine zweite Fixierung angeschlossen werden, bei der die Suspension länger auf Eis gelassen werden kann.

### 2.2 C-Banding

C-Banding ist eine Methode zum Anfärben von Heterochromatin. Dazu wird die DNA degradiert und vom euchromatischen Teil der Chromosomen gelöst, das Heterochromatin bleibt weiterhin Bestandteil der Chromosomen und wird durch Giemsa angefärbt.

**Durchführung:** Chromosomenpräparationen auf Objektträgern werden für 3 min in 1N HCl-Lösung gestellt und anschließend unter fließendem Wasser abgespült und mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend werden die Objektträger gut getrocknet lassen. Nach dem Trocknen werden die Objektträger bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich lange in Ba(OH<sub>2</sub>) (5%) inkubiert. Anschließend werden die Objektträger 3 x kurz in HCl eingetaucht, unter fließendem Wasser gewaschen, mit destilliertem Wasser abgespült und wieder gut getrocknet. Die Chromosomenpräparate werden bei 65°C in 2 x SSC inkubiert. Nach 2h wird das 2 x SSC abgegossen und in ein Gefäß mit Wasser eingetaucht, dann unter fließendem Wasser und mit destilliertem Wasser abgespült und gut getrocknet. In der Zwischenzeit wird eine 5%ige Giemsa-Lösung angesetzt (Giemsa-Lösung muss immer frisch angesetzt werden, um eine Oxidation mit der Luft zu vermeiden: 5% in 0,025M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Die vollständig getrockneten Objektträger werden 30 min in Giemsa-Lösung gebadet (abgedunkelte Wanne verwenden), anschließend mit destilliertem Wasser gut abgespült. Die Chromosomenpräparate können nun unter dem Mikroskop angesehen werden.

### 2.3 Herstellung von FISH-Sonden (Random Priming)

Zur Herstellung der FISH-Sonden werden die Random Priming Methoden angewandt. Dabei wird ein nicht-radioaktiv markierter Gegenstrang unter Verwendung von Zufallshexanukleotiden als Primer synthetisiert. Durchführung laut des Protokolls DIG-High Prime oder Biotin-High Prime von Roche.

### 2.4 FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit zwei Markern) auf Metaphasechromosomen (Protokoll C. Ozouf Costaz unveröffentlicht)

Ansetzen der Hybridisierungslösung: Die markierte Sonde [16 ng/μl] wird mit 1 μl kompetitiver DNA [8μg/μl] und 4 μl Träger DNA [10μg/μl] mit Hybridisol (50% Formaid 10% Dextran Sulfat, 50mM NatriumSulfat in 2x SSC) auf 7,5 μl Gesamtvolumen aufgefüllt, kurz gevortext, runterzentrifugiert und 5 min bei 75°C denaturiert. Abgestoppt wird die Reaktion auf Eis und anschließend 1-2 h bei 37°C inkubiert. In der Zwischenzeit werden die Metaphasechromosomen auf den Objektträgern 20 sec bis 2 min bei 72°C in 70% Formamid/2 x SSC (pH 7) denaturiert. Die Denaturierung ist von der Größe der Chromosomen abhängig. Je größer die Chromosomen sind, desto länger die Denaturierung. Anschließend werden die

Chromosomenpräparate in eiskaltem 70% Ethanol und anschließend bei Raumtemperatur in 80% und 100% Ethanol je zwei Minuten dehydriert.

Danach werden 15 µl des Hybridisierungsmixes (siehe oben) auf jeden Objektträger gegeben und mit einem Deckglas verschlossen. Dabei ist auf blasenfreie Auflage der Deckgläschen zu achten. Inkubation erfolgt zwischen 2 und 4 Tagen in einer feuchten Kammer.

Nach 2-4 Tagen werden die Deckgläschen entfernt und die Objektträger in 50% Formamid/2 x SSC bei 43°C 15 min unter leichtem Schütteln gewaschen, gefolgt von einem zweiten 15 minütigen Waschriff in 0.1 x SSC bei 60°C, ebenfalls leicht schüttelnd. Danach werden die Objektträger in 1 x PBD überführt.

Zur Detektion der Sonde werden 40µl FITC-Avidin (Antikörper gegen Biotin) bzw. Rhodamin anti-DIG je nach Markierungsart der Sonde auf die Objektträger getropft, mit einem Deckgläschen blasenfrei verschlossen und 5 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend werden die Objektträger verschiedenen Waschschriffen unterzogen. 3 x 2 min in 1 x PBD bei Raumtemperatur und 20 µl DAPI/antifade werden auf die Chromosomenpräparate gegeben und mit einem Deckgläschen verschlossen. Die Chromosomen können nun unter dem Mikroskop beobachtet werden.

## D. Ergebnisse:

### 1 Abdeckung der geschlechtsbestimmenden Region mit BAC-Klonen

#### 1.1 Aufbau der Contigs der geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus*

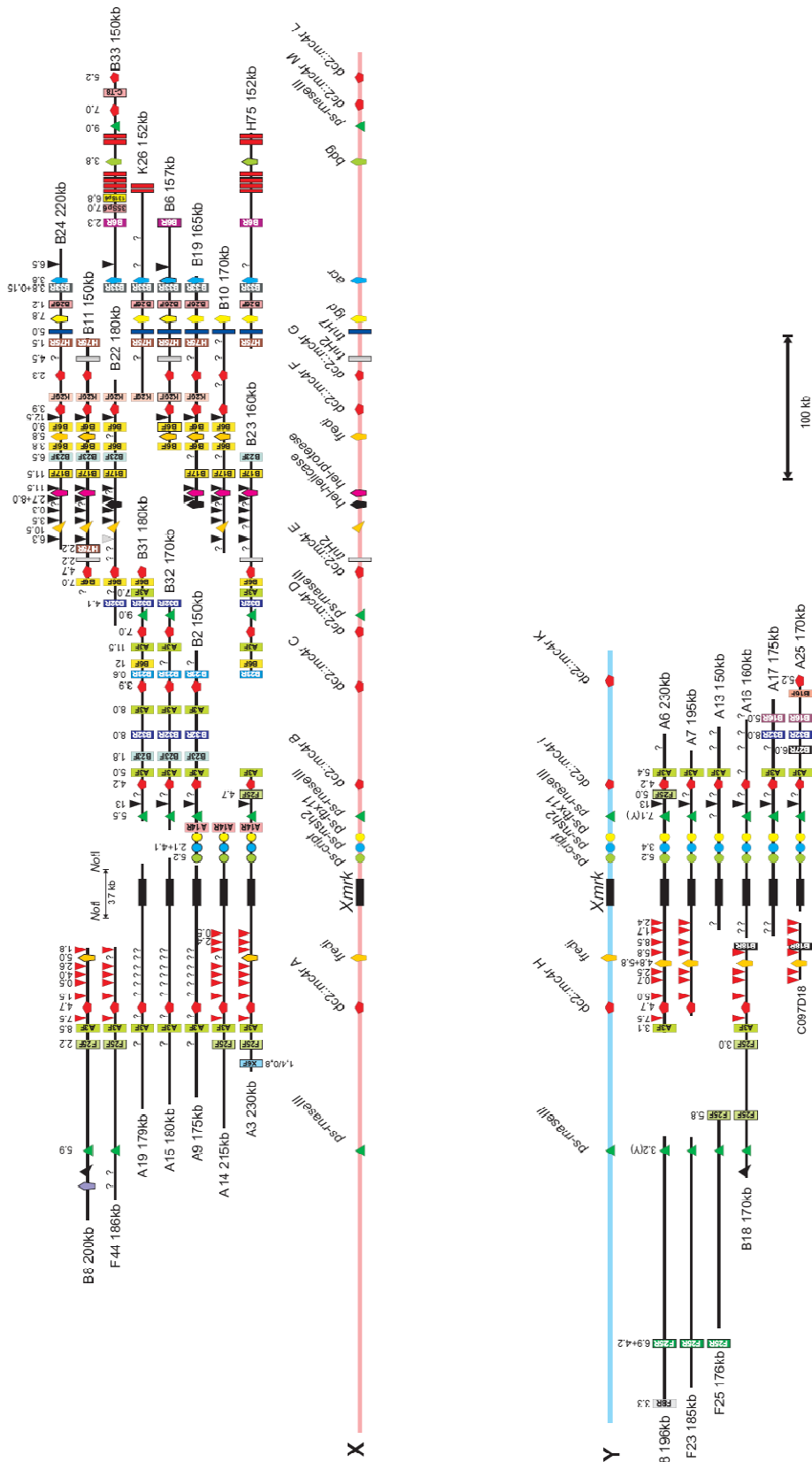
Die geschlechtsbestimmende (SD, für „sex-determining“) Region des Platyfishes *Xiphophorus maculatus* (Rio Jamapa, Stamm WLC1274) befindet sich in der Subtelomerregion auf den Geschlechtschromosomen X und Y [Nanda et al., 2000a]. Flankiert wird die SD-Region von zwei Genen: *Xmrk* und *egfrb*. Beide Gene codieren für epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehören.

Zur Untersuchung der geschlechtsbestimmenden Region wurde eine BAC (artifizielle Bakterienchromosomen)-Bibliothek von *Xiphophorus maculatus* (Rio Jamapa, Stamm WLC1274) angelegt: Das gesamte Genom von 10 Männchen wurde partiell *HindIII* verdaut. Die Fragmente der Größe 150-250 kb wurden in den Vektor pBAC-*lac* [Asakawa et al., 1997] ligiert und in *E.coli* transformiert und kloniert. Die Bibliothek deckt das 10fache haploide Genom von *Xiphophorus maculatus* ab. Da männliche Individuen zur Erstellung verwendet wurden, werden die Gonosomen 5-fach abgedeckt [Froschauer et al., 2002].

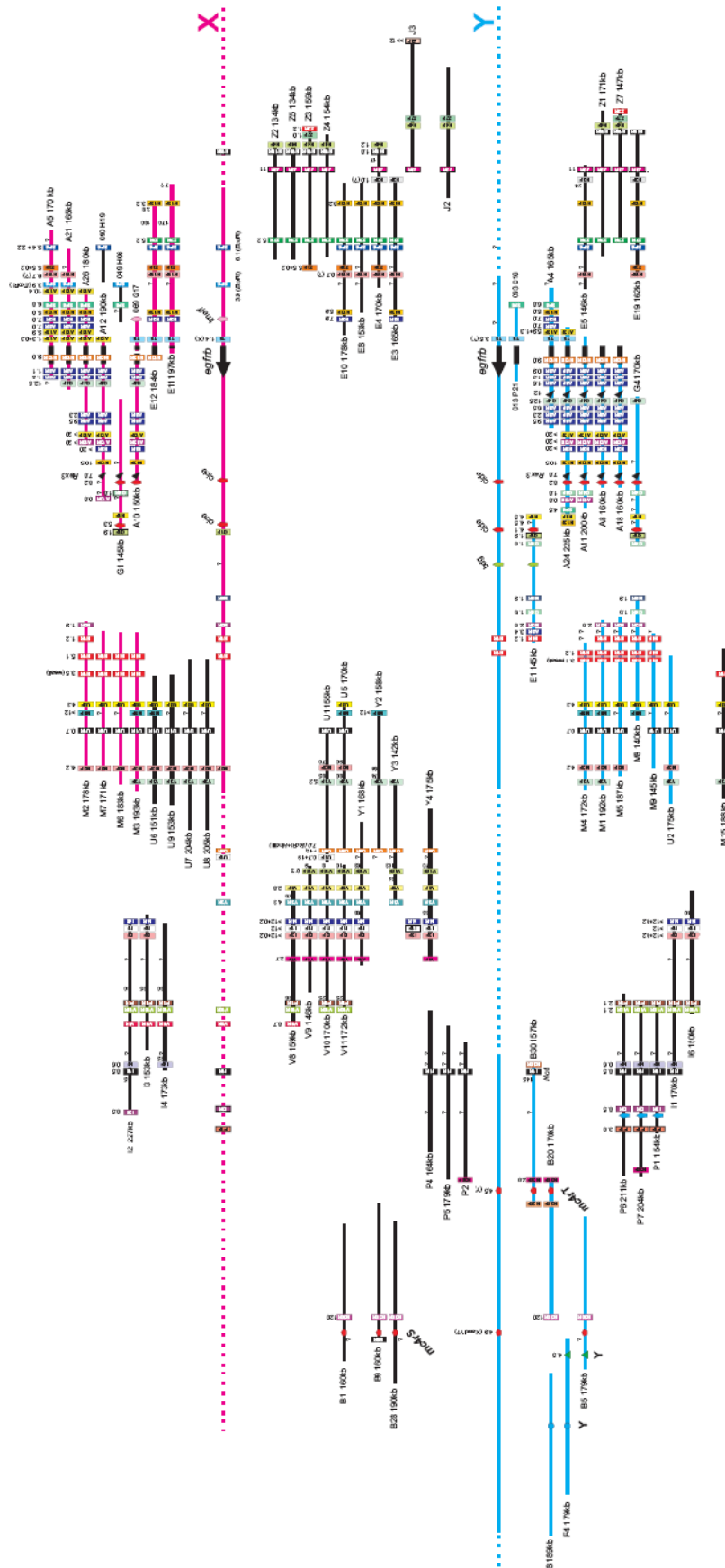
Die Gene *egfrb* und *Xmrk* wurden zur Durchmusterung der BAC-Bibliothek genutzt und stellen den Startpunkt der X- und Y-chromosomalen Contigs („Contiguous sets of clones“ – aneinandergesetzte Reihe von Klonen) der SD-Region dar (Froschauer et al., 2002). Verschieden genomische Marker, wie beispielsweise Endfragmente (hergestellt nach Riley et al., 1990) oder Genkandidaten wurden zur Erweiterung der Contigs herangezogen. Neben den X- und Y-chromosomalen *Xmrk*- und *egfrb*-Contigs existiert noch ein weiteres Y-spezifisches Contig. Dieses Contig wurde, ausgehend von einer Y-spezifischen Kopie des Pseudogens *cript* (Y-*cript*), erstellt [Zhou, 2005]. Das funktionelle *cript*-Gen codiert ein postsynaptisches Protein, das in excitatorischen Synapsen des Menschen das PSD-95-Protein mit dem Cytoskeltett vernetzt [Niethammer et al., 1998].

Forschungsziel ist die komplette Abdeckung der geschlechtsbestimmenden Region auf dem X und Y Chromosom mit BAC-Klonen. Abb. D1-3 zeigen die verschiedenen X- und Y-chromosomalen Contigs der geschlechtsbestimmenden Region, wie sie zu Beginn der Doktorarbeit vorlagen. Bisher konnten die einzelnen Contigs nicht miteinander verbunden

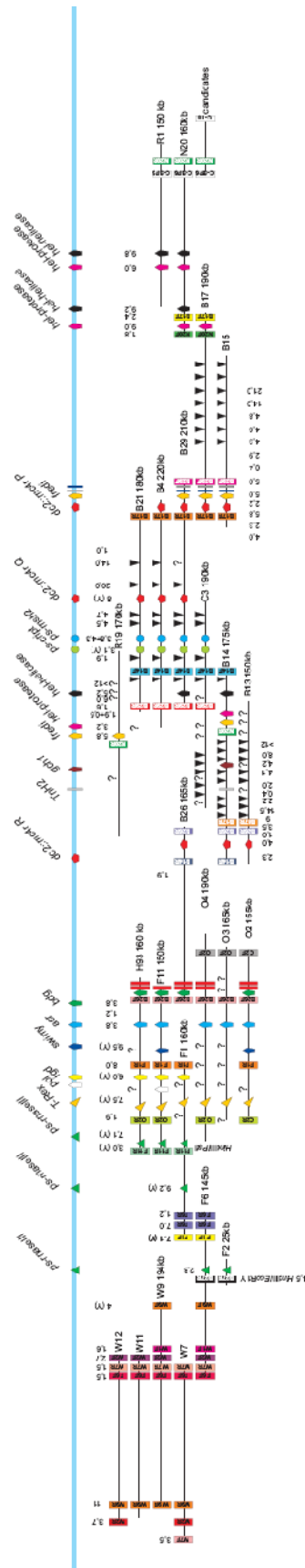
werden. Eine Aufgabe der Doktorarbeit bestand in der Erweiterung und Zusammenführung der einzelnen Contigs.



**Abb. D1:** Schematische Darstellung des X- und Y-chromosomalen *Xmrk*-Contigs. Schwarze Linien symbolisieren die BAC- und Cosmid-Klone mit verschiedenen genomischen Markern, die durch Southern-Blot-Analysen getestet wurden: Verschiedenfarbige Kästchen stellen Endfragmente dar, andere geometrische Formen symbolisieren Genkandidaten, transponierbare Elemente oder sich wiederholende Sequenzen (Erstellt von A. Froschauer, C. Schultheis).



**Abb. D2:** Schematische Darstellung des X- und Y-chromosomalen *egfrb*-Contigs. Schwarze, rote und blaue Linien symbolisieren die BAC- und Cosmid-Klone mit verschiedenen genomischen Markern, die durch Southern-Blot-Analysen getestet wurden: Verschiedenfarbige Kästchen stellen Endfragmente dar, andere geometrische Formen symbolisieren Genkandidaten, transponierbare Elemente oder sich wiederholende Sequenzen (erstellt von A. Froschauer). Schwarze Linien symbolisieren Klone, die bisher nicht eindeutig einem Chromosom zugeordnet werden konnten. Blaue und rote Linien symbolisieren Klone, die dem Y- bzw. X Chromosom zugeordnet wurden.



**Abb. D3:** Schematische Darstellung des Y-chromosomal Y-cript-Contigs. Schwarze Linien symbolisieren die BAC- und Cosmid-Klone mit verschiedenen genomischen Markern, die durch Southern-Blot-Analysen getestet wurden: Verschiedenfarbige Kästchen stellen Endfragmente dar, andere geometrische Formen symbolisieren Genkandidaten, transponierbare Elemente oder sich wiederholende Sequenzen (erstellt von A. Froschauer und Q. Zhou).



## 1.2 Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Diplomarbeit

Im Rahmen meiner Diplomarbeit (Schultheis, 2003) konnte das X-chromosomale *Xmrk*-Contig um etwa 200 kb erweitert werden: Die Klone H75 sowie K26 (Tabelle im Anhang, Abb. D1) konnten mittels Endfragment-Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse dem X-chromosomalen *Xmrk*-Contig zugeordnet werden. Der Klon B33, ursprünglich dem Y Chromosom zugeordnet, wurde an das X-chromosomale *Xmrk*-Contig angefügt. Das Endfragment B33-For stellte das 3'-Ende des X-chromosomalen *Xmrk*-Contigs dar. Dieses Endfragment enthält Sequenzen des Gens *mc4r* (Erklärung siehe Kapitel 1.3.1). Bei zwei Durchmusterungen der BAC-Bibliothek mit *mc4r* als Sonde (erste Durchmusterung durchgeführt von A. Froschauer) konnte neben B33 kein weiterer Klon mit dieser *mc4r*-Kopie identifiziert werden. Somit war eine Erweiterung des X-chromosomalen *Xmrk*-Contigs zunächst nicht möglich.

## 1.3 Abdeckung des Y Chromosoms mit BAC-Klonen

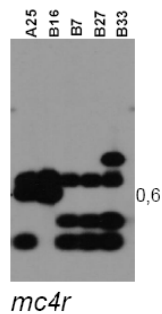
### 1.3.1 Erweiterung des Y-chromosomales *Xmrk*-Contigs

Abb. D1 zeigt das *Xmrk*-Contig auf dem X und Y Chromosom. A25 (Tabelle im Anhang) ist der dem Centromer zugewandte Klon des Y-chromosomalen *Xmrk*-Contigs. Das externe Endfragment von A25-For enthält Sequenzen des amplifizierten Gens *mc4r*.

*Mcr4* codiert für den Melanocortinrezeptor-Typ 4, einen G-Protein gekoppelten Sieben-Helix-Rezeptor. Fünf Klassen von Melanocortin-Rezeptoren (*mcr1-5*) sind bekannt, die bei verschiedenen physiologischen Prozessen eine Rolle spielen: bei der Pigmentierung (*mc1r*), Regulation des Energiehaushaltes (*mc3r*), Regulation des Körpergewichtes bzw. Sättigungsgefühls in Säugetieren (*mc4r*) und bei der Sekretion von exokrinen Drüsen (*mc5r*) [Jordan und Jackson 1998].

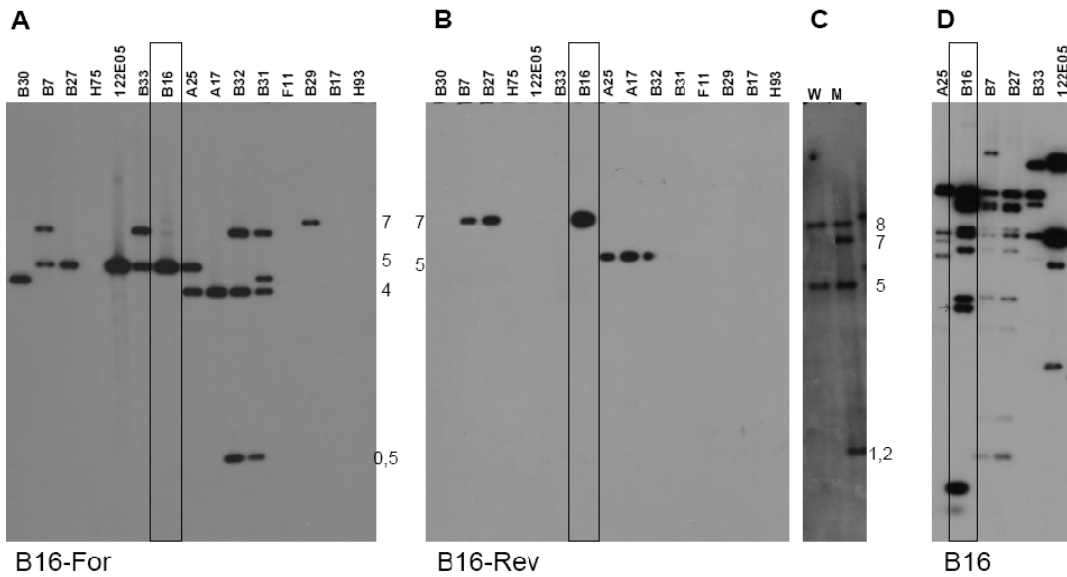
*Mc4r* liegt bei den meisten Fischarten sowie Säugetieren als Einzelgen vor, während bei *Xiphophorus maculatus* multiple Kopien, allein um die 20 Kopien in der geschlechtsbestimmenden Region (*mc4rA* bis *T* siehe Abb. D1-D3), identifiziert wurden. Diese Kopien stellen das Ergebnis von tandemartigen Duplikationen dar, die evolutiv gesehen noch recht jung sind, da kaum Sequenzunterschiede identifiziert wurden, anhand derer die *mc4r*-Kopien unterschieden werden können. Darüber hinaus können die Kopien durch RFLPs (Restriktionsfragment Längenpolymorphismen) charakterisiert werden: Die *mc4r*-Kopie auf A25 (*mc4rK*) ist durch eine zusätzliche 600 bp große Bande im *HindIII/RsaI* Doppelverdau gekennzeichnet. Bei verschiedenen Durchmusterungen der BAC-Bibliothek mit *mc4r* als

Sonde wurden etwa 30 *mc4r*-Klone identifiziert. Neben A25 weist ein weiterer dieser *mc4r*-Klone, B16, in Southern-Blot-Hybridisierungs-Analysen die zusätzliche 600 bp Bande auf. Somit enthält B16 die gleiche *mc4r* Kopie (*mc4rK*) wie A25 (Abb. D4). Durch Nukleotidsequenzvergleich der - mittels PCR amplifizierten und anschließend sequenzierten - *mc4r* Kopien von A25 und B16 wurde das Ergebnis zusätzlich bestätigt. Eine Überlappung der Klone A25 und B16 konnte durch Endfragment-Hybridisierungsanalyse mit B16-For als Sonde nachgewiesen werden (Abb. D5).

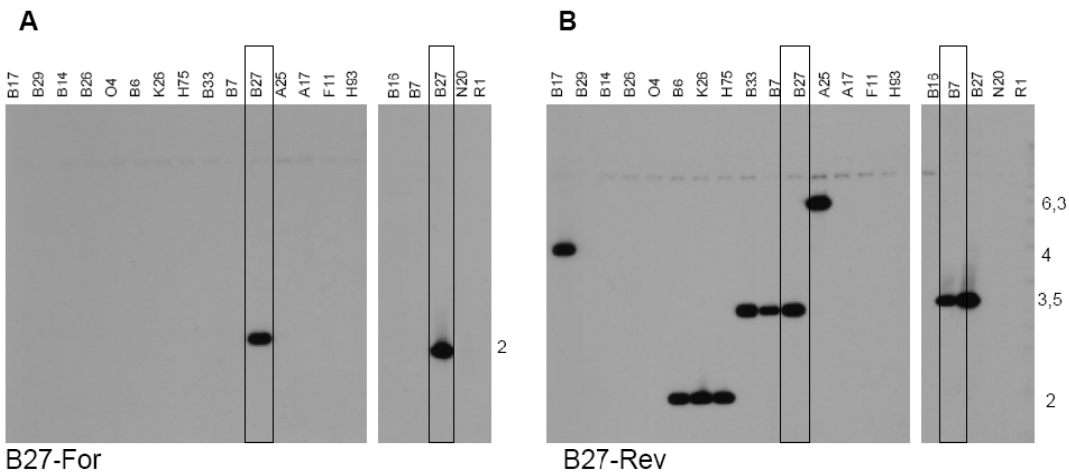


**Abb. D4:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse auf *Hind*III verdauten BAC-Klonen der Geschlechtsbestimmenden Region mit *mc4r* (pROST 53) als Sonde. Die Klone A25 und B16 zeigen bei 0,6 kb ein Hybridisierungssignal.

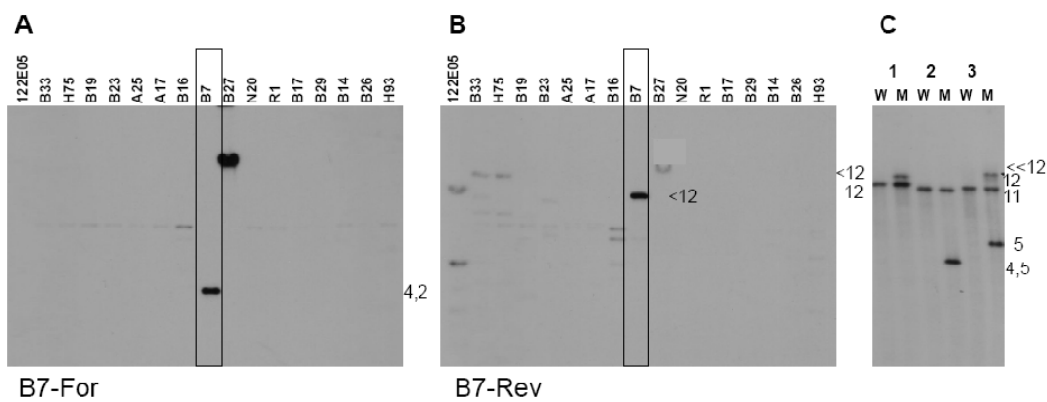
Wie anhand von Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen gezeigt werden konnte, weisen die Klone B7 und B27 (Tabelle im Anhang) Ähnlichkeiten zu Klonen des X-chromosomalen *Xmrk*-Contigs 3' von *Xmrk* (genauer zu den Klonen B31 und B23). Anhand von Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen, die Y-spezifischen RFLP-Banden aufwiesen (*RNase*III, durchgeführt von A. Froschauer), wurden die Klone B7 und B27 jedoch dem Y Chromosom zugeordnet. B7 und B27 konnten bisher nicht an das Y-chromosomale *Xmrk*-Contig angefügt werden, stellen aber potentielle Klone dar, die mit B16 überlappen könnten. Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen einerseits mit den Endfragmenten B16-Rev bzw. B16-For als Sonde sowie mit dem kompletten Klon B16 als Sonde wiesen eine Überlappung zwischen B16, B7 und B27 auf der 3'-Seite (B16-Rev, 7 kb Bande) und mit A25 auf der 5'- Seite (B16-For, 5 kb Bande) nach (Abb. D5). Entsprechend dazu wurden Endfragment-Hybridisierungen von B7 und B27 durchgeführt (Abb. D6).



**Abb. D5:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klonen, *Hind*III verdaut [A, B, C] sowie auf genomischer DNA (Männchen M und Weibchen W) *Hind*III verdaut [D]. Eingesetzte Sonden: B16-For [A], B16-Rev [B, C] und der gesamte Klon B16 [C].



**Abb. D6:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klonen, *Hind*III verdaut [A, B] Eingesetzte Sonden: B27-For [A], B27-Rev [B].



**Abb. D7:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC- und Cosmid-Klonen, *Hind*III verdaut [A, B], sowie auf genomischer DNA (Männchen M, Weibchen W) [C] *Hind*III verdaut [1], *Hind*III/*Eco*RV verdaut [2] und *Eco*RV verdaut [3]. Eingesetzte Sonden: B7-For [A], B7-Rev [B, C]. BAC B27 ist nur partiell verdaut [A, B].

Wie in Abb. D6, D7 zu sehen, konnte eine Überlappung zwischen B7 und B27 (B27-Rev, B7-For) nachgewiesen werden, nicht jedoch mit B16. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Southern-Hybridisierungsanalysen von B16-Rev und B16, die eine Überlappung zwischen B16, B7 und B27 nachweisen. Wodurch ist dieser Unterschied zu erklären?

B16 mit einer Größe von 50 kb repräsentiert einen vergleichsweise kleinen Klon. Die Durchschnittsgröße der Klone der BAC-Bibliothek beträgt etwa 200 kb. Sehr große bzw. wesentlich kleinere Fragmente kommen in der Bibliothek nur selten vor. Mutmaßlich handelt es sich bei B16 um einen rekombinanten Klon, der Teile der Sequenz verloren hat. Daher zeigten die Endfragment-Southern-Hybridisierungsanalysen von B7-Rev und B27-Rev kein Signal auf B16, während das Endfragment B16-Rev auf B7 bzw. B27 hybridisiert. Somit entsteht eine Lücke von schätzungsweise 50-100 kb in dem Y-chromosomalen *Xmrk*-Contig. Neben B16 und A25 konnten bei den Durchmusterungen mit *mc4r* als Sonde keine weiteren Klone mit *mc4rK*-Kopie identifiziert werden, die die Lücke schließen könnten.

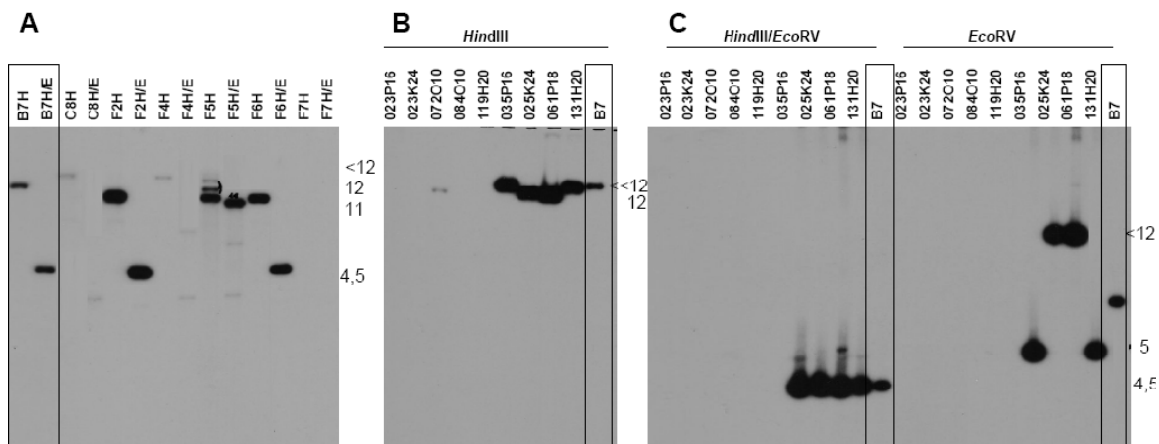
Um auszuschließen, dass bei der Durchmusterung mit *mc4r* als Sonde kein Klon dieser Region unentdeckt blieb, wurde eine weitere Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit dem Endfragment B7-Rev als Sonde durchgeführt. Dazu wurde die Sonde auf genomischer DNA zunächst getestet.

Die B7-Rev Endfragment-Sonde (Abb. D7 C) zeigt auf genomischer DNA im *Hind*III, *Eco*RV sowie im *Hind*III/*Eco*RV Doppelverdau ein RFLP zwischen männlichen und weiblichen Individuen. Im *Hind*III Verdau kann eine >12 kb, im *Eco*RI Verdau kann >>12 kb und 5 kb, im *Hind*III/*Eco*RV Doppelverdau kann eine 4,5 kb große Y-spezifische Bande(n) nachgewiesen werden. Der Klon B7 zeigt im *Hind*III Verdau die >12 kb Bande sowie im *Hind*III/*Eco*RV die 4,5 kb Bande. Somit können mit B7-Rev Sonde identifizierte Klone eindeutig dem Y Chromosom und der spezifischen Region um den Klon B7 zugeordnet werden.

Die BAC-Bibliothek wurde mit B7-Rev Sonde durchmustert. In Tabelle D1 sind die identifizierten Klone aufgeführt. In einer Testhybridisierung (Abb. D8 A) wiesen C8, F4 und F7 keine Bande auf, lediglich Kreuzhybridisierungen konnten festgestellt werden. Die Klone F2, F5, F6 zeigten eine 12 kb große Bande, die jedoch nicht der Y-spezifischen Bande >12 kb aus B7 entspricht. Daher kann eine Überlappung der Klone F2, F5, F6 mit B7 ausgeschlossen werden. Die Klone F2 und F6 wurden in das *Y-cript*-Contig eingeordnet (siehe Abb. D3). Der Klon F5 konnte keinem Contig zugeordnet werden. Fraglich ist, ob der Klon den Geschlechtschromosomen angehört oder ob es sich um einen autosomalen Klon handelt (siehe Kapitel 1.6)

**Tabelle D1:** Identifizierte Klone durch B7-Rev Durchmusterung der BAC-Bibliothek

B7-Rev Durchmusterung BAC-Bibliothek			
identifizierten Klone	Testhybridisierung	identifiziert durch Sonde	Chromosom
B7	positiv	<i>mc4r</i>	Y Chromosom
C8	negativ	<i>cript</i>	Y Chromosom
F2	positiv	<i>RNaseIII</i>	Y Chromosom
F4	negativ	<i>RNaseIII</i>	Y Chromosom
F5	positiv	<i>RNaseIII</i>	X, Y oder Autosom
F6	positiv	<i>RNaseIII</i>	Y Chromosom
F7	negativ	<i>RNaseIII</i>	X, Y oder Autosom



B7-Rev

**Abb. D8:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC- und Cosmid-Klonen, *HindIII* verdaut [A, B], sowie auf Cosmid-Klonen *HindIII/EcoRV* und *EcoRV* verdaut [C]. Eingesetzte Sonden: B7-Rev.

Es konnte kein Klon identifiziert werden, der mit B7 überlappt. Somit wurde in früheren Durchmusterungen der BAC-Bibliothek kein Klon übersehen und die Bibliothek weist eine Lücke in dieser Region auf. Wie kann es zu Lücken in der Bibliothek kommen?

Zur Erstellung der BAC-Bibliothek wurde das gesamte *Xiphophorus maculatus* Genom partiell mit *HindIII* verdaut. Fragmente mit der durchschnittlichen Größe von 200 kb wurden kloniert. Deutlich kleinere bzw. extrem große Fragmente wurden kaum berücksichtigt.

Sind an einer Stelle im Genom überproportional viele *HindIII*-Schnittstellen, führt dies zu kleinen Fragmenten, während, analog dazu, durch verhältnismäßig wenige *HindIII*-Schnittstellen große Fragmente entstehen. Somit kann ein genomischer Bereich mit übermäßig vielen oder wenigen *HindIII*-Schnittstellen von der BAC-Bibliothek nicht abgedeckt werden und führt zu einer Lücke im Contig. Wie kann die Lücke auf dem Y Chromosom zwischen B16 und B7 dennoch geschlossen werden?

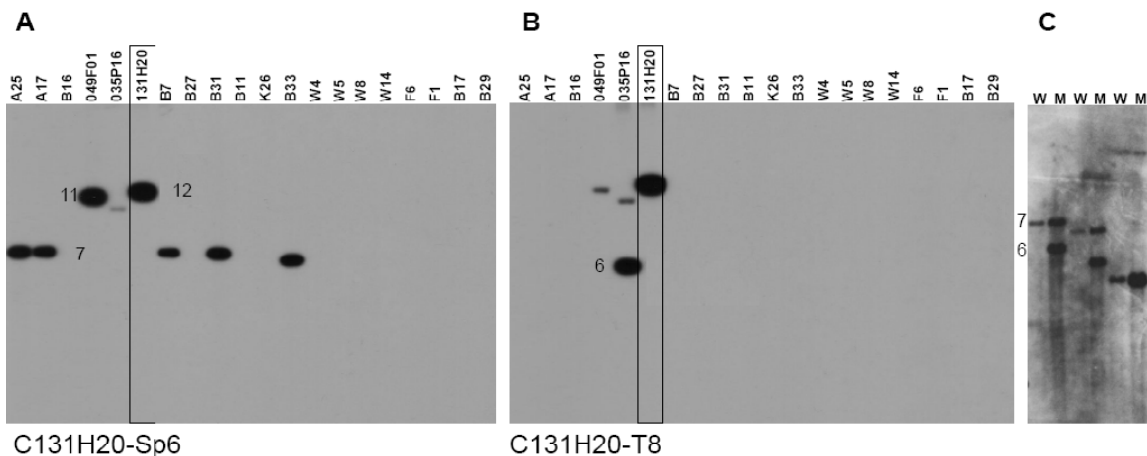
### 1.3.2 Schließen der Lücke auf dem Y-chromosomalen *Xmrk*-Contig mittels Cosmid-Bibliothek Klone

Ist es nicht möglich, einen genomischen Bereich durch Klone der BAC-Bibliothek abzudecken, kann alternativ auf die genomische Cosmid-Bibliothek zurückgegriffen werden: Erstellt wurde die Cosmid-Bibliothek durch *Mbo*I Partialverdau des *Xiphophorus maculatus* Genoms. Die daraus resultierenden Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe von 36-44 kb, wurden in den Vektor Lawrist 7 ligiert [Burgtorf et al., 1998].

Das Endfragment B7-Rev wurde als Sonde zur Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek genutzt. Tabelle D2 zeigt die identifizierten Klone. In der Testhybridisierungsanalyse wiesen alle positiven Klone im *Hind*III/*Eco*RV-Verdau die 4,5 kb große, Y-spezifische Bande auf (Abb. D7). Lediglich die Klone C035P16, C131H20 zeigten im *Hind*III-Verdau die >>12 kb Y-spezifische Bande, die in B7 nachweisbar ist. Durch Endfragment-Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen der Klone CO35P16 und C131H20 konnte eine Überlappung der Klone untereinander (Endfragment C131H20 T8 und C035P16 Sp6; Abb. D9, D10) sowie mit B7 (Endfragment C035P16 Sp6 und C131H20 Sp6; Abb. D9, D10) nachgewiesen werden.

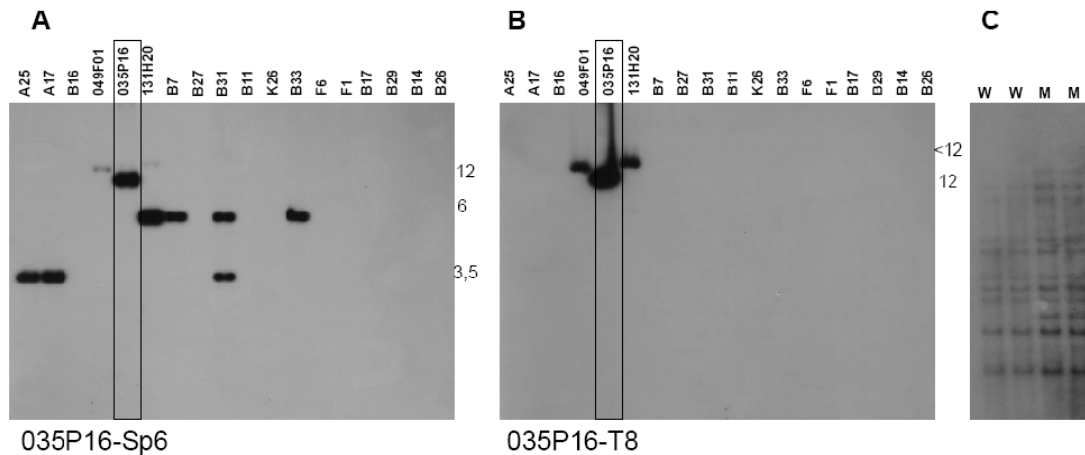
**Tabelle D2:** Identifizierte Klone bei der Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek mit B7-Rev

B7-Rev Durchmusterung Cosmid-Bibliothek			
identifizierten Klone	Testhybridisierung	identifiziert durch Sonde	Chromosom
C023P16	negativ	<i>mc4r</i>	Y Chromosom
C023K24	negativ	<i>mc4r</i>	Y Chromosom
C072O10	negativ	<i>mc4r</i>	Y Chromosom
C084O10	negativ	<i>mc4r</i>	Y Chromosom
C119H20	negativ	<i>mc4r</i>	Y Chromosom
C035P16	positiv	<i>mc4r</i>	Y Chromosom
C035K24	positiv	<i>mc4r</i>	Y Chromosom
C061P18	positiv	<i>mc4r</i>	Y Chromosom
C131H20	positiv	<i>mc4r</i>	Y Chromosom



**Abb. D9:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC- und Cosmid-Klonen, *Hind*III verdaut [A, B], sowie auf genomischer DNA (Männchen M, Weibchen W) *Hind*III verdaut [C]. Eingesetzte Sonden: C131H20-Sp6 [A] und C131H29-T8 [B, C].





**Abb. D10:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC- und Cosmid-Klonen, *Hind*III verdaut [A, B], sowie auf genomischer DNA (Männchen M, Weibchen W) *Hind*III verdaut [C]. Eingesetzte Sonden: C035P16-Sp6 [A] und C035P16-T8 [B, C].

Wie in Abb. D10 A zu sehen, weisen die Klone C131H20, B7 in der Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse mit C035P16 Sp6 als Sonde die gleiche Bande von 6 kb auf, während in C035P16 eine  $\gg 12$  kb Bande vorzufinden ist. Weshalb kann dennoch von einer Überlappung dieser Klone ausgegangen werden?

Wie schon beschrieben, entstanden die Klone der Cosmid-Bibliothek durch partiellen *Mbo*I-Verdau. Um in einer Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse das genomische *Xiphophorus maculatus* Fragment vollständig vom Vektor Lawrist-7 zu trennen, müsste der Klon *Mbo*I (für den Verdau wurde das Isoschizomer *Sau*3AI verwendet) verdaut werden. Wird ein Klon der Cosmid-Bibliothek, wie bei der Analyse durchgeführt, *Hind*III verdaut, hängen an dem Restriktionsfragment, das unmittelbar an den Vektor grenzt, neben genomischer *Xiphophorus maculatus* DNA auch Bruchstücke des Vektors. Daher wurde bei der Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse mit dem Endfragment C035P16 Sp6 als Sonde bei dem Klon C035P16 eine deutlich größere Bande identifiziert als bei B7 und C131H20, die auf den Vektoranteil zurückgeführt werden kann.

Das Endfragment C035P16 T8 stellt das A25 zugewandte Endfragment dar und ragt weiter in 5'-Richtung als das Endfragment T8 des Klons C131H20. Dieses Endfragment stellt einen Kandidaten für die Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek dar. C035P16 T8 wurde als Sonde auf genomischer DNA hybridisiert. Wie in Abb. D10 C zu sehen, enthält das Endfragment jedoch Teile einer repetitiven Sequenz und konnte daher nicht zur Durchmusterung verwendet werden. Würde ein solcher Marker für die Durchmusterung der Bibliothek eingesetzt, erhielte man sehr viele Klone, die falls überhaupt nur unter großem Aufwand den Geschlechtschromosomen oder der SD-Region zugeordnet werden könnten.

Zum Schließen der Lücke wurde das Endfragment C131H20-T8 auf genomischer DNA getestet. In weiblichen und männlichen Individuen wurde im *Hind*III-Verdau eine 7 kb Bande

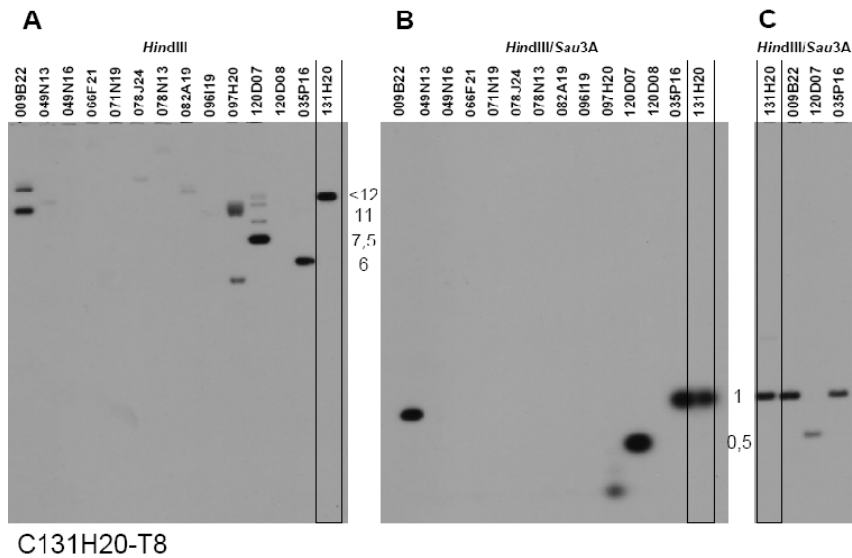
festgestellt (Abb. D9 C), sowie eine Y-spezifische 6 kb Bande. Somit konnte der Marker zur Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek verwendet werden (Tabelle D3). Wie die Testhybridisierung (Abb. D11) zeigte, waren nur 2 (C009B22 sowie C120D07) der 12 neu identifizierten Klone positiv. Lediglich 009B22 wies in der Testhybridisierung die gleiche Bandengröße wie 131H20 und 035P16 auf. Endfragment-Hybridisierungsanalysen mit C009B22-Sp6 als Sonde wiesen eine Überlappung des Klons C009B22 mit den C131H20 und C035P16 nach (Abb. D12). Die Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse mit C009B22-Sp6 (Abb. D9 A) als Sonde zeigt bei allen drei Klonen Banden unterschiedlicher Größe. Wie zuvor erläutert sind die Banden der Klone C009B22 und C131H20 größer, da sie Teile der Vektorsequenz tragen.

Das Endfragment C009B22-T8 ist dem Klon A25 zugewandt. Hybridisiert auf genomischer DNA zeigt diese Sonde lediglich zwei Banden und stellt somit einen idealen Marker zur Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek dar. Dieser Versuch konnte bis zum Abschluss der Doktorarbeit nicht durchgeführt werden.

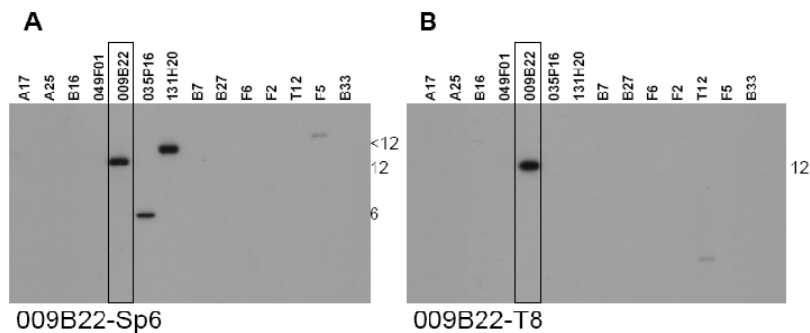
**Tabelle D3:** Identifizierte Klone bei der Durchmusterung der BAC- und Cosmid-Bibliothek mit 131H20-T8 als Sonde

131H20-T8 Durchmusterung der BAC Bibliothek			
identifizierten Klone	Testhybridisierung	wenn bekannt, identifiziert durch Sonde	Chromosom
T12	positiv	F1-För	X Chromosom
131H20-T8 Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek			
identifizierten Klone	Testhybridisierung	wenn bekannt, identifiziert durch Sonde	Chromosom
009B22	positiv		Y Chromosom
049N13	negativ		X, Y oder Autosom
049N16	negativ		X, Y oder Autosom
066F21	negativ		X, Y oder Autosom
071N19	negativ		X, Y oder Autosom
078J24	negativ		X, Y oder Autosom
078N13	negativ		X, Y oder Autosom
002A19	negativ		X, Y oder Autosom
096I19	negativ		X, Y oder Autosom
097H20	negativ		X, Y oder Autosom
120D07	negativ		X, Y oder Autosom
120D08	positiv		X, Y oder Autosom
035P16	positiv		Y Chromosom
131H20	positiv		Y Chromosom



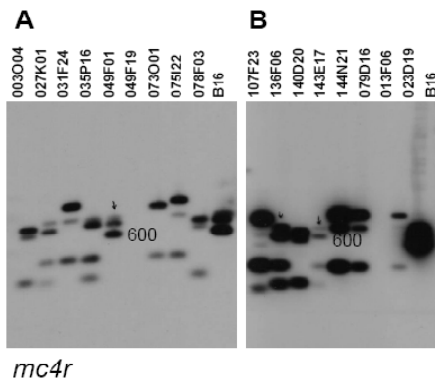


**Abb. D11:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen Cosmid-Klonen, *HindIII* verdaut [A] und *HindIII/Sau3A* verdaut [B, C]. Eingesetzte Sonden: C131H20-T8 [A, B, C].



**Abb. D12:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC- und Cosmid-Klonen, *HindIII* verdaut [A, B]. Eingesetzte Sonden: 009B22-Sp6 [A] und 009B22-T8 [B].

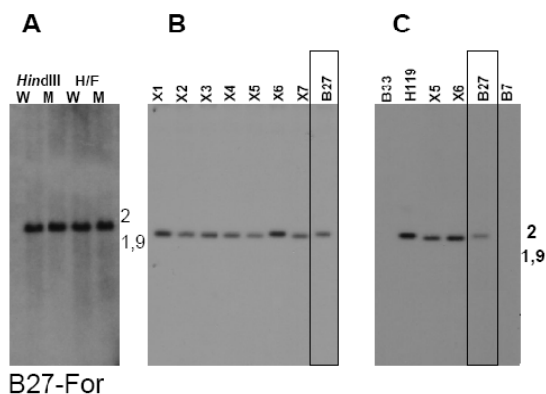
Eine weitere Strategie zum Schließen der Lücke zielte darauf ab, Klone der Cosmid-Bibliothek zu identifizieren, die mit dem BAC-Klon A25 überlappen. Wie schon in Kapitel 1.3.1 dargelegt, enthält A25 eine charakteristische *mc4r* Kopie (*mc4rK*). Verschiedene *mc4r* Klone der Cosmid-Bibliothek wurden mittels Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse mit *mc4r* als Sonde untersucht (Abb. D13): Der Klon C049F01 weist die zusätzliche 600bp Bande auf, die kennzeichnend für die *mc4rK* Kopie von A25 und B16 ist. Auch die Identifizierung dieses Klons konnte die Lücke auf dem Y-Chromosom nicht schließen, wie die Endfragment-Hybridisierungsanalysen mit C009B22-T8 (Abb. D12 A) und C035P16-T8 (Abb. D10 B) belegen (die identifizierte Bande in C049F01 beruht auf Vektoranteilen). Beide Endfragmente hybridisieren weder auf A25 oder B16, noch auf C049F01.



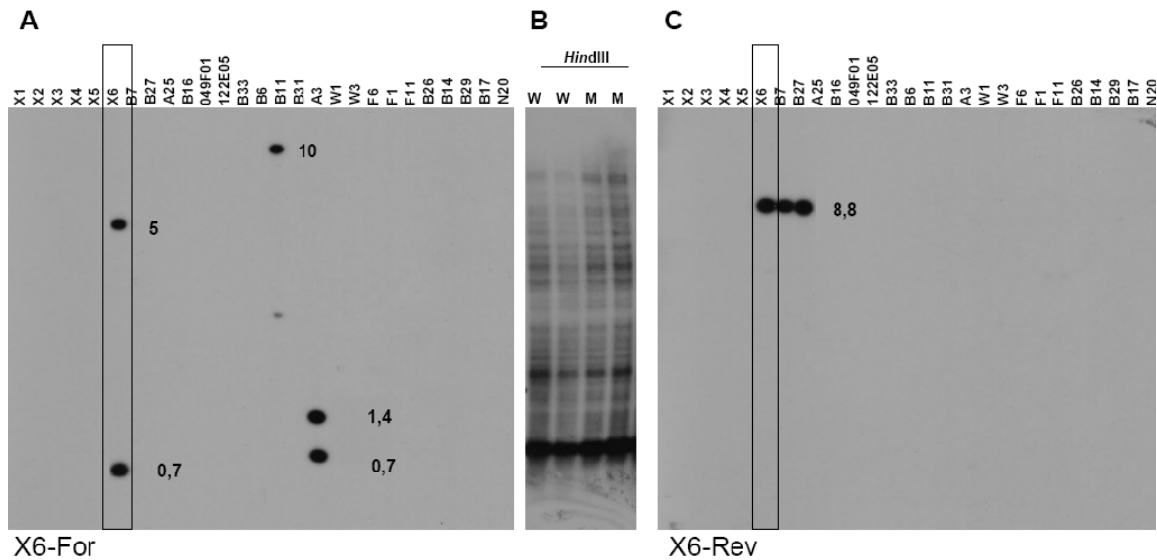
**Abb. D13:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC- und Cosmid-Klonen, *Hind*III verdaut [A, B]. Eingesetzte Sonden: *mc4r* aus pROST 53 (partieller ORF).

### 1.3.3 Erweiterung des Y-chromosomalen *Xmrk*-Contigs in 3'-Richtung

Die Klone B7 und B27 konnten, trotz Lücke im Contig, eindeutig dem Y-chromosomalen *Xmrk*-Contig zugeordnet werden (Kapitel 1.3.1). Wie Endfragment-Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen (Abb. D6 A) zeigten, stellte B27-For das am weitesten 3'-liegende Endfragment dar (Abb. D30). Hybridisiert auf genomischer DNA konnte ein RFLP identifiziert werden (Abb. D14 A). Neben der 1,9 kb Bande konnte eine zusätzliche Y-spezifische 2 kb Bande nachgewiesen werden. Bei der Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit B27-For als Sonde konnten 7 neue Klone (X-BACs) identifiziert werden. Lediglich der Klon X6 wies in der Testhybridisierung die Y-spezifische Bande auf (Abb. D14 B). Eine Überlappung von X6 mit B7 und B27 konnte mit Endfragment-Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse (X6-Rev, 8,8 kb Bande) (Abb. D15 C) bestätigt werden und das Y-chromosomale *Xmrk*-Contig konnte um den Klon X6 erweitert werden. Das Endfragment X6-For stellte das 3' liegende Endfragment des Contigs dar und somit ein Kandidat zur Durchmusterung der BAC-Bibliothek. Hybridisiert auf genomischer DNA wurden multiple Kopien im *Xiphophorus maculatus* Genom nachgewiesen (Abb. D15 B). Unterschiede zwischen Männlichen und Weiblichen Individuen konnten nicht festgestellt werden. Das Endfragment war somit für eine Durchmusterung der BAC-Bibliothek nicht brauchbar.



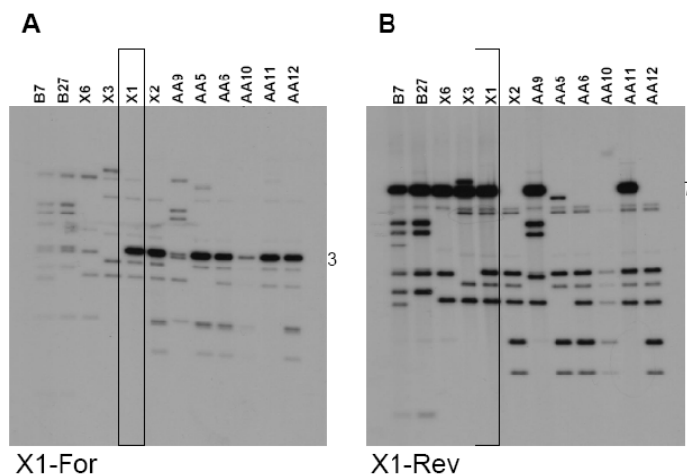
**Abb. D14:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf genomischer DNA (Männchen M, Weibchen W) *Hind*III und *Hind*III/*Eco*RV verdaut [A], sowie auf verschiedenen BAC-Klonen *Hind*III verdaut [B, C]. Eingesetzte Sonde B27-For



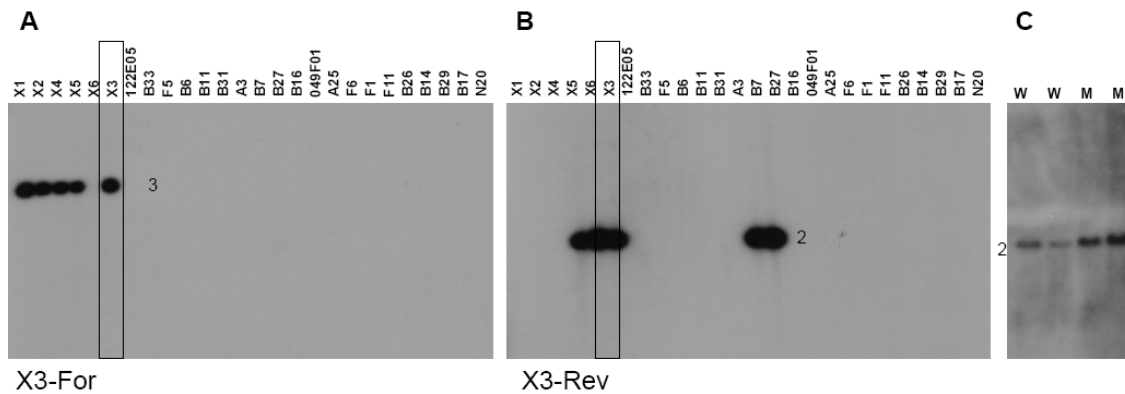
**Abb. D15:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC- und Cosmid-Klonen, *HindIII* verdaut [A, C], sowie auf genomischer DNA (Männchen M, Weibchen W) *HindIII* verdaut [B]. Eingesetzte Sonden: X6-For [A, B] und X6-Rev [C].

Das Endfragment X6-For konnte nicht auf anderen X-BACs nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wiesen Endfragment-Southern-Hybridisierungsanalysen mit X1 (X1-Rev, 7 kb Bande; Abb. D16 B) und X3 (X3-Rev, 2kb Bande; Abb. D17B) eine Bande auf X6 nach. Wie spätere Sequenzierungsanalysen zeigten, handelt es sich bei dem Endfragment X6-For um Stücke eines LTR („long terminal repeat“) des endogenen Retrovirus *foamy* (siehe Kapitel 2.2.5.1). Interessanterweise konnte die *foamy* Kopie auf X6 nur auf dem Y Chromosom nachgewiesen werden. Daher konnte das Endfragment X6-For nicht auf anderen X-BACs identifiziert werden. Dies bestätigt nochmals die Testhybridisierung mit Endfragment B27-For, die nur in X6 die Y-spezifische Bande aufwies.

X6-For als 3'-Ende war für eine Durchmusterung der BAC-Bibliothek unbrauchbar. Sequenzanalysen (Kapitel D1.3.4) wurden für weitere Analysen herangezogen.



**Abb. D16:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klonen *HindIII* verdaut. Eingesetzte Sonden: X1-For [A] und X1-Rev [B].



**Abb. D17:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC- und Cosmid-Klonen *Hind*III verdaut [A, B] und auf genomischer DNA (Männchen M, Weibchen W) *Hind*III verdaut [C]. Eingesetzte Sonden: X3-For [A], X3-Rev [B, C].

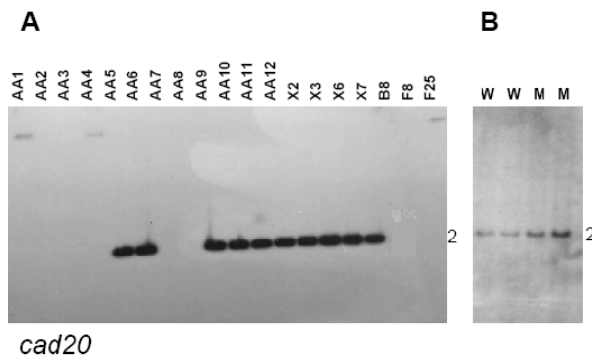
### 1.3.4 Erweiterung des Y-chromosomalen *Xmrk*-Contigs mit Hilfe verschiedener Genkandidaten

#### 1.3.4.1 *Cad20* als Marker zur Erweiterung des Y-chromosomalen *Xmrk*-Contigs

Klone der verschiedenen X und Y chromosomalen Contigs wurden partiell sequenziert, um neue Erkenntnisse über die Gene der geschlechtsbestimmenden Region zu erlangen. Dazu wurden die Klone mittels Restriktionsenzymen oder Luftdruck fragmentiert und anschließend in einen Vektor ligiert und kloniert (siehe „Schrotschuss“-Methode C 1.4.1). Mit Hilfe der Primer-Ansatzstellen im Vektor können die Fragmente von beiden Seiten sequenziert werden. Sequenzen eines „Schrotschuss“-Klons aus X6 sind ortholog zu dem Gen *Cadherin 20* (durchgeführt von C. Schmidt). Der Genkandidat wurde *cad20* abgekürzt (siehe Kapitel 2.2.5.1). Cadherine sind calciumabhängige Zell-Adhäsionsproteine, die für das Aneinanderheften gleichartiger Zellen verantwortlich sind [Römpp, 2000]. Mittels PCR wurden Teile der codierenden Sequenz von *cad20* amplifiziert und als Sonde auf genomischer DNA hybridisiert (Abb. D18 B). Eine Bande (2 kb) konnte in weiblichen und männlichen Individuen identifiziert werden. Bei der Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit *cad20* als Sonde konnten 12 neue Klone identifiziert werden (AA1-12, siehe Tabelle D4). Die Klone AA1 und AA4 wiesen Kreuzhybridisierungen auf. Spätere Sequenzanalysen wiesen in diesen Klonen ein weiteres *Cadherin*-Gen, *Cadherin 6* nach. Diese Klone konnten 5' von *Xmrk* in das Contig eingeordnet werden. Die 2 kb große Bande konnte in AA5, AA6, AA9, AA10, AA11 und AA12 nachgewiesen werden (Abb. D18 A). Keiner der Klone konnte dem Y Chromosom zugeordnet werden, da Southern-Hybridisierungs-Analysen keinen Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Individuen zeigten.

**Tabelle D4:** Identifizierte Klone durch *cad*-Durchmusterung der BAC-Bibliothek

cad-Durchmusterung der BAC-Bibliothek			
identifizierten Klone	Testhybridisierung	identifiziert durch Sonde	Chromosom
AA1	positiv	<i>cad</i>	X, Y oder Autosom
AA2	negativ	<i>cad</i>	X, Y oder Autosom
AA3	negativ	<i>cad</i>	X, Y oder Autosom
AA4	positiv	<i>cad</i>	X, Y oder Autosom
AA5	positiv	<i>cad</i>	X Chromosom
AA6	positiv	<i>cad</i>	X, Y oder Autosom
AA7	negativ	<i>cad</i>	X, Y oder Autosom
AA8	negativ	<i>cad</i>	X, Y oder Autosom
AA9	positiv	<i>cad</i>	X, Y oder Autosom
AA10	positiv	<i>cad</i>	X, Y oder Autosom
AA11	positiv	<i>cad</i>	X, Y oder Autosom
AA12	positiv	<i>cad</i>	X Chromosom
X6	positiv	B27-For	Y Chromosom
X2	positiv	B27-For	X Chromosom
X3	positiv	B27-For	X Chromosom
X7	positiv	B27-For	X Chromosom
B8	negativ	<i>mc4r</i>	X, Y oder Autosom
F8	negativ	<i>RNAseIII</i>	X, Y oder Autosom
F25	negativ	<i>RNAseIII</i>	X, Y oder Autosom

**Abb. D18:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klonen *Hind*III verdaut [A] und auf genomischer DNA (Männchen M, Weibchen W) *Hind*III verdaut [B]. Eingesetzte Sonden: *cad20* (PCR-Produkt) [A, B].

Mittels der Y-spezifischen Sonde X6-Rev (siehe Kapitel D1.3.3) sowie weiterer Endfragment-Hybridisierungs- und FISH-Analysen konnte später gezeigt werden, dass AA12 sowie AA5 in der Geschlechtsbestimmenden Region dem X Chromosom angehören (siehe Kapitel D1.5.2)

#### 1.3.4.2 *Fah* als Marker zur Erweiterung des Y-chromosomalen *Xmrk*-Contigs

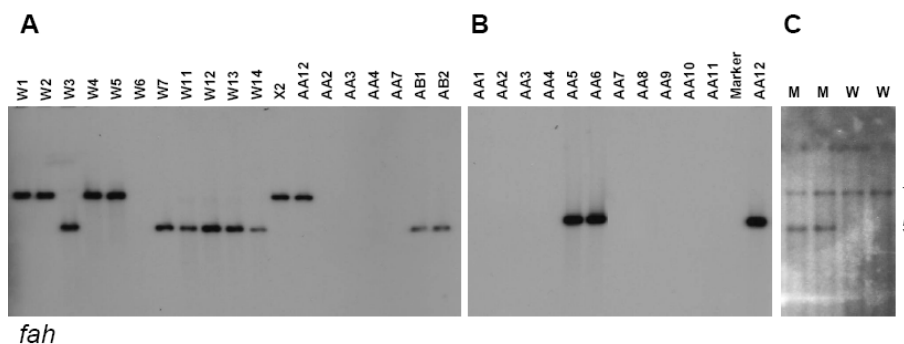
Auch der Klon AA12 wurde partiell sequenziert (in Zusammenarbeit mit Immanuel Rode). Der Unterklon AA12-4m (T3) zeigt Orthologie zu dem *Xenopus* Gen *Xvelo* (siehe Kapitel D2.2.1). *Xvelo* codiert für ein Proteinprodukt mit noch unbekannter Funktion. Eine Proteindomäne konnte in *Xvelo* nicht identifiziert werden. *Xvelo* wurde in der vegetativen Hemisphäre der *Xenopus* Oozyten nachgewiesen (*Xvelo*, steht für *Xenopus* vegetativ lokalisiert).

Der Genkandidat wurde *fah* (*fahrrad*, Übersetzung aus dem Französischen für *velo*, dem *Xenopus* Gen, zum dem *fah* ortholog ist) genannt. Mittels PCR wurden Teile von Exon 2

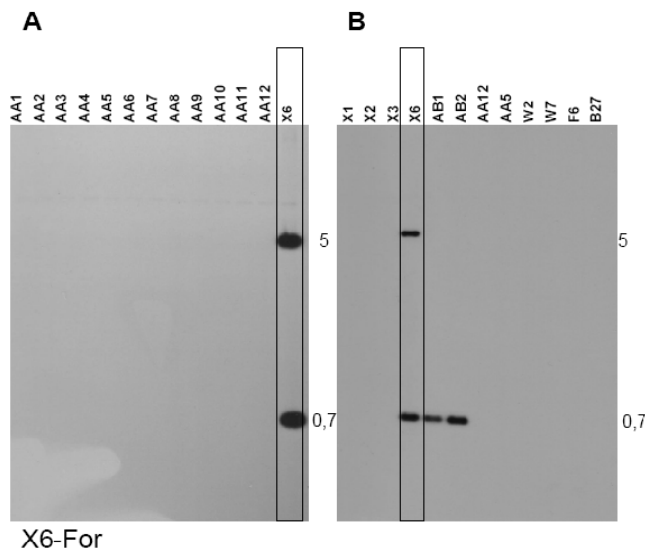
amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde als Sonde auf genomischer DNA eingesetzt (Abb. D19 C). Neben der 7kb großen Bande in männlichen und weiblichen Individuen, konnte eine Y-spezifische 5kb Bande identifiziert werden. Mittels *fah*, hybridisiert auf HD („High-Density“-)Filtern der BAC-Bibliothek, wurden zwei neue Klone (AB1 und AB2, Tabelle D5) identifiziert. Weitere identifizierte Klone sind die W-BACs (Tabelle im Anhang). Einige W-Klone gehören dem *Ycript*-Contig an (Analysen Q. Zhou). In einer Testhybridisierung (Abb. D19 A, B) wiesen die neu identifizierten Klone AB1 und AB2 sowie die Klone W3, W7, W11, W12, W13 und W14 die 5 kb große Y-spezifische Bande auf. Auf W1, W2, W4, W5 sowie X2 und AA12 konnte die 7 kb Bande nachgewiesen werden.

**Tabelle D5:** Identifizierte Klone bei der Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit *fah*

fah-Durchmusterung der BAC-Bibliothek			
identifizierten Klone	Testhybridisierung	identifiziert durch Sonde	Chromosom
AA3	negativ	<i>cad</i>	X, Y oder Autosom
AA4	negativ	<i>cad</i>	X, Y oder Autosom
AA7	negativ	<i>cad</i>	X, Y oder Autosom
AA12	positiv	<i>cad</i>	X Chromosom
AB1	positiv	<i>fah</i>	Y Chromosom
AB2	positiv	<i>fah</i>	Y Chromosom
W01	positiv	F6-For	X Chromosom
W02	positiv	F6-For	X Chromosom
W03	positiv	F6-For	Y Chromosom
W04	positiv	F6-For	X Chromosom
W05	positiv	F6-For	X Chromosom
W06	negativ	F6-For	X Chromosom
W07	positiv	F6-For	Y Chromosom
W11	positiv	F6-For	Y Chromosom
W12	positiv	F6-For	Y Chromosom
W13	positiv	F6-For	Y Chromosom
W14	positiv	F6-For	Y Chromosom
X02	positiv	B27-For	X Chromosom



**Abb. D19:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klonen *Hind*III verdaut [A, B] und auf genomischer DNA (Männchen M, Weibchen W) *Hind*III verdaut. Eingesetzte Sonde: *fah* (PCR-Produkt).



**Abb D20:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klonen *Hind*III verdaut [A, B]. Eingesetzte Sonde: X6-For [A, B]

Bisher konnte das Y-chromosomale *Xmrk*-Contig und *Y-cript* Contig nicht zusammengeführt werden. Stellen die neu identifizierten Klone AB1 und AB2 ein Verbindungsglied zwischen beiden Contigs dar?

#### 1.4 Zusammenführung des Y-chromosomalen *Xmrk*-Contigs mit dem *Y-cript*-Contig

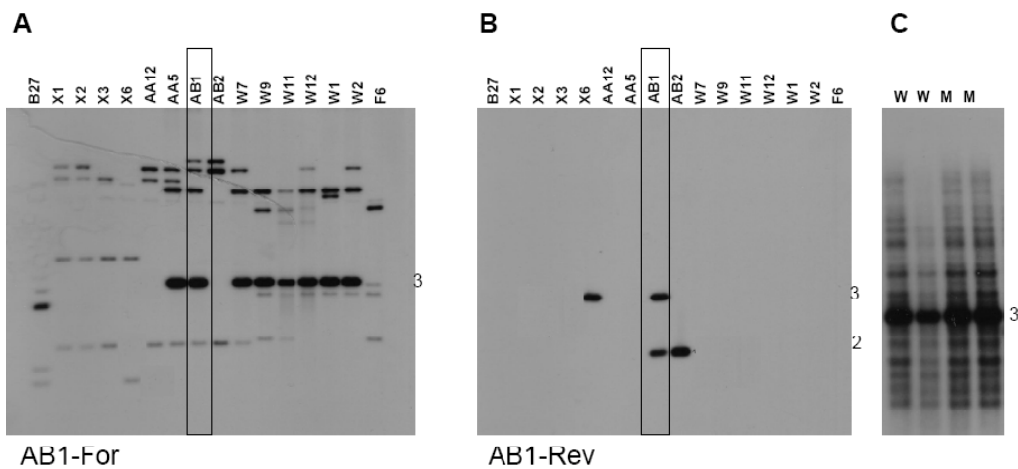
Wie schon dargelegt gibt es verschiedene Contigs, die unterschiedliche Bereiche der geschlechtsbestimmenden Region abdecken (Abb. D1-D3). Ziel ist, eine komplette Abdeckung der geschlechtsbestimmenden Region auf dem X und Y Chromosom mit Klonen zu erreichen. Daher müssen die Bruchstücke (unterschiedlichen Contigs) aneinander gereiht werden. Abb. D3 zeigt das *Y-cript*-Contig (Erstellt von A. Froschauer, Erweiterung durch Q. Zhou).

Der Genkandidat *fah* konnte sowohl auf Klonen des X-chromosomalen *Xmrk*-Contigs als auch auf Klonen des *Y-cript*-Contigs nachgewiesen werden. Weder Endfragment-Hybridisierungsanalysen mit dem Endfragment X6-For noch die Endfragment-Hybridisierungsanalysen der W-Klone konnten eine Überlappung der Contigs nachweisen. Bei der Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit *fah* als Sonde konnten zwei neue Klone (AB1 und AB2) identifiziert werden. Beide Klone besitzen eine Y-spezifische 5 kb große Bande.

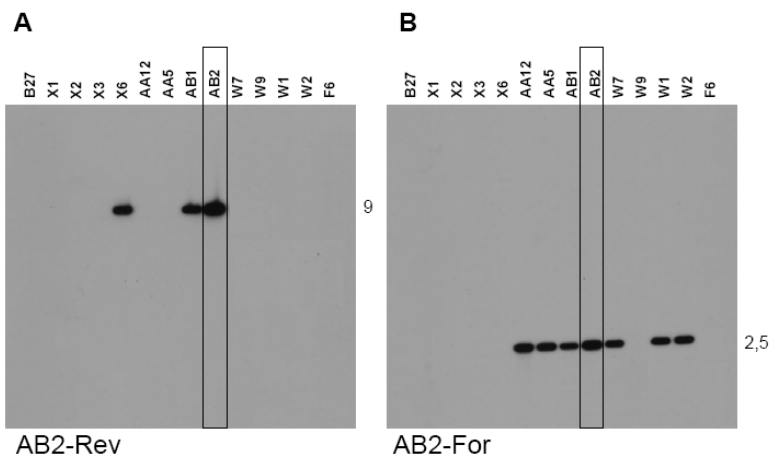
Endfragment-Hybridisierungsanalysen mit den Endfragmenten von AB1 und AB2 (Abb. D21, D22; AB1-Rev, 3 kb Bande; AB2-Rev, 3 kb Bande) wiesen eine Überlappung mit dem Klon X6 des Y-chromosomalen *Xmrk*-Contigs und mit W-Klonen des *Y-cript*-Contigs nach (AB1-For, 3 kb Bande; AB2-For, 2,5 kb Bande). Somit konnten die beiden Contigs miteinander



verknüpft werden. Das zusammengefügte Y-chromosomale *Xmrk-/Y-cript*-Contig, bestehend aus 42 überlappenden Klonen, deckt etwa 2 Mb des Y Chromosoms ab.



**Abb. D21:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klonen *Hind*III verdaut [A, B] und auf genomischer DNA (Männchen M, Weibchen W) *Hind*III verdaut [C], Eingesetzte Sonden: AB1-For [A] und AB1-Rev [B, C].



**Abb. D22:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klonen *Hind*III verdaut [A, B]. Eingesetzte Sonden: AB2-For [A] und AB2-Rev [B].

Der Klon N20 (Abb. D30, Tabelle im Anhang) stellt nun den am weitesten von *Xmrk* entfernten Klon des *Xmrk-/Y-cript*-Contigs dar. Endfragment-Hybridisierungsanalysen konnten bisher keine Überlappung mit dem Y-chromosomalen *egfrb*-Contig nachweisen. Mit dem Endfragment N20-Rev konnten keine Klone identifiziert werden, die das *Xmrk-/Y-cript*-Contig erweitern (Ergebnisse Q. Zhou). Daher wurde eine Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek mit dem Endfragment N20 durchgeführt (Ergebnisse Q. Zhou). Einige Cosmid-Klone konnten identifiziert werden (Ergebnisse Q. Zhou). Eine Überlappung der Cosmide mit N20 konnte jedoch bis zum Ende der Doktorarbeit nicht nachgewiesen werden.

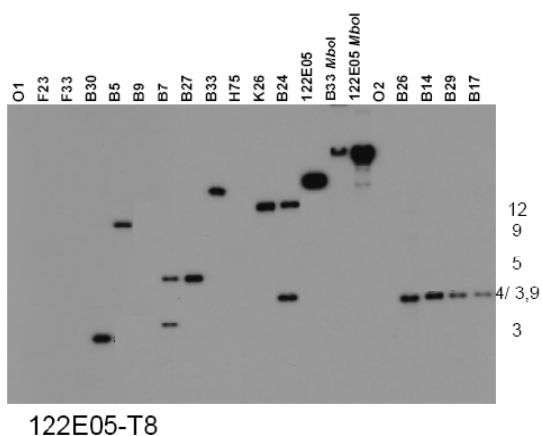


## 1.5 Abdeckung des X Chromosoms mit BAC-Klonen

### 1.5.1 Erweiterung des X-chromosomalen *Xmrk*-Contigs

Der Klon B33 ist das dem Centromer zugewandte Ende des X-chromosomalen *Xmrk*-Contigs (Abb. D30). B33-For stellt das 3'-Endfragment dieses Klons dar. Es enthält Sequenzanteile des Gens *mc4r*. Wie schon dargelegt (Kapitel D1.3.1), konnten verschiedene *mc4r*-Kopien in der Geschlechtsbestimmenden Region identifiziert werden. Diese Kopien können anhand von RFLPs oder Sequenzdatenvergleich voneinander unterschieden werden. In verschiedenen Durchmusterungen der BAC-Bibliothek mit *mc4r* als Sonde wurden 30 Klone identifiziert, die den verschiedenen *mc4r*-Kopien *mc4rA* bis *mc4rT* zugeordnet werden konnten. Die *mc4rL*-Kopie von B33 war in keinem weiteren *mc4r*-Klon nachweisbar. Somit konnte kein Klon identifiziert werden, der das Contig erweitern würde. Der Bereich um B33 auf dem X Chromosom wird von der BAC-Bibliothek nicht abgedeckt und führt zu einer Lücke im Contig. Dies wurde schon in Kapitel D1.3.1 für die Y-chromosomale Region um den Klon A25 beschrieben. Interessanterweise sind die Regionen auf dem X und Y Chromosom, die von der BAC-Bibliothek nicht abgedeckt werden, sehr ähnlich.

Eine andere Strategie zur Abdeckung der X-chromosomalen Region bestand in der Untersuchung der *mc4r*-Klone der Cosmid-Bibliothek (siehe Kapitel D1.3.2). Sequenzdatenvergleiche zwischen den *mc4r*-Kopien der Cosmid-Klone mit der *mc4r-L* Kopie von B33 zeigte, dass der Cosmid-Klon C122E05 die identische *mc4r*-Kopie wie B33 besitzt. (*mc4r*-Kopie von C122E05 sequenziert von W. Bernhardt). Endfragment-Hybridisierungsanalysen mit den Endfragmenten von B33-For und C122E05-T8 als Sonden bestätigten eine Überlappung zwischen B33 und C122E05. Somit stellt C122E05-Sp6 das dem Centromer zugewandte Ende des X-chromosomalen *Xmrk*-Contigs dar (Abb. D23).



**Abb. D23:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen verschiedener BAC- und Cosmid-Klone *HindIII* und *Mbol* verdaut. Eingesetzte Sonde: 122E05-T8.

Sequenzierungsanalysen des Endfragmentes C122E05-Sp6 direkt aus dem Cosmid zeigten eine 100%ige Übereinstimmung zu genomischer *E. coli*-DNA. Auch ungefähr die Hälfte der sequenzierten C122E05-Subklone (Schrotschuss-Sequenzierungsanalyse) wiesen 100%ige Identität zu *E. coli* DNA auf. Daher handelt es sich mutmaßlich um einen rekombinanten Klon. Das in den Vektor ligierte Fragment besteht zu einem gewissen Anteil aus genomischer *E. coli*-DNA und zu einem anderen Anteil aus genomischer *Xiphophorus maculatus* DNA. Wodurch entsteht ein rekombinanter Klon?

Einerseits könnten bei der Erstellung der Cosmid-Bibliothek *Xiphophorus maculatus* und *E. coli* DNA-Fragmente miteinander ligiert haben. Andererseits könnte ein Austausch (homologe oder nichthomologe Rekombination) zwischen *Xiphophorus maculatus* DNA-Fragment und genomischer *E. coli*-DNA innerhalb des Bakteriums stattgefunden haben. Was in diesem Fall ausgeschlossen werden kann, da die *E. coli*-DNA genau bis zur Klonierungsstelle des Cosmid-Vektors reicht und daher mutmaßlich die *E. coli*-DNA bei Erstellung der Cosmid-Bibliothek in den Vektor ligiert wurde.

Die sequenzierten C122E05-Subklone, bestehend aus *Xiphophorus maculatus* DNA, wiesen keinen neuen Marker zur Erweiterung des X-chromosomalen *Xmrk*-Contigs auf.

Auch B33 wurde mittels Schrotschuss-Sequenzierungsmethode partiell sequenziert. Wie schon für die C122E05-Subklasse beschrieben, konnte auch in dem B33-Subklon kein brauchbarer Marker zur Erweiterung des X-chromosomalen *Xmrk*-Contigs identifiziert werden. Somit konnte das X-chromosomale *Xmrk*-Contig lediglich um B33 und C122E05 erweitert werden. Wie Sequenzvergleiche zwischen Subklonen von B33 und C122E05 bestätigten, verlängert das Cosmid C122E05 das Contig nicht. Welche weiteren Möglichkeiten der Contigerweiterung bestehen also?

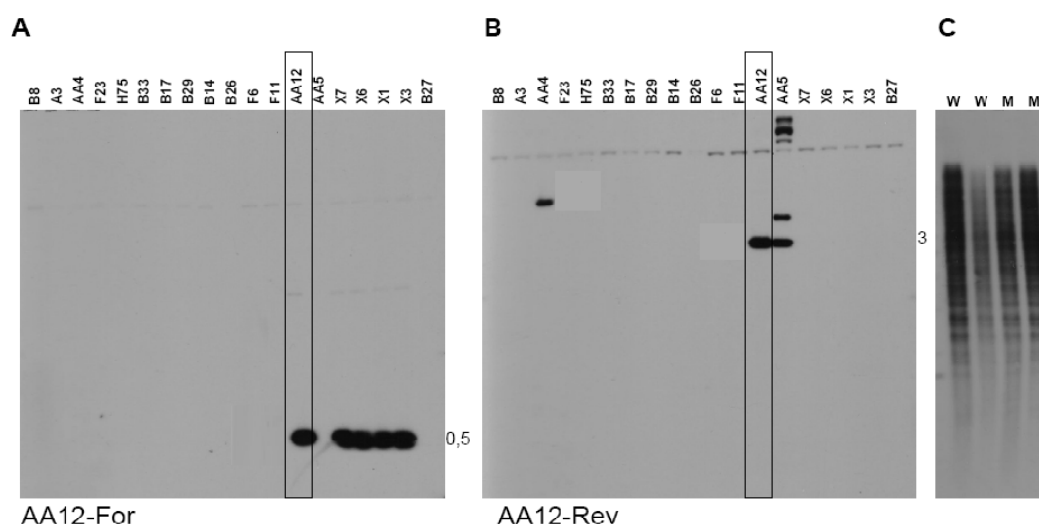
### **1.5.2 Erweiterung des X-chromosomalen *Xmrk*-Contigs durch Klone, identifiziert bei der Erweiterung des Y chromosomalen *Xmrk*-Contigs und FISH Analyse**

Die X und Y Chromosomen von *Xiphophorus maculatus* sind weitgehend homolog. Rekombinationen können über die gesamte Länge der Geschlechtschromosomen beobachtet werden, scheinen aber in der Geschlechtsbestimmenden Region seltener vorzukommen [Gutbrod und Scharl, 1999; Traut und Winking 2001]. Alle Marker der X-chromosomalen Contigs konnten auch auf den Contigs des Y Chromosoms nachgewiesen werden. Umgedreht wurden die Mehrzahl der Y-chromosomalen Marker auch auf den X Chromosom identifiziert, mit Ausnahme von Y-spezifischen Markern wie beispielsweise dem Pseudogen *Y-crypt*,

einem Cluster der Wiederholungssequenz *XIR*. In Kapitel D2.3 werden die molekularen Unterschiede zwischen X und Y Chromosom zusammengefasst.

Aufgrund der Homologie zwischen X und Y Chromosom stellten einige Klone, die bei der Erweiterung des Y-chromosomalen Contigs identifiziert wurden und nicht dem Y Chromosom zugeordnet wurden, Kandidaten zur Erweiterung des X-chromosomalen *Xmrk*-Contigs dar. Bei der Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit dem Endfragment B27-For als Sonde konnten verschiedene Klone (X1-X7 Klone) neu identifiziert werden. Lediglich X6 wies im RFLP die 2 kb große Y-spezifische Bande auf, die übrigen Klone X1-X5 und X7 wiesen keine Y-spezifische Bande auf (Kapitel D1.3.3).

Bei der Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit *cad20* als Sonde wurden die AA-Klone identifiziert (siehe Kapitel D1.3.4.1). Keiner der Klone wies eine Y-spezifische Bande auf und konnte folglich nicht dem Y Chromosom zugeordnet werden. Endfragment-Hybridisierungsanalysen wiesen eine Überlappung von X1 und X3 mit AA5 und AA12 nach: Mit X3-For als Sonde konnte eine 3 kb Bande in AA5, AA6, AA10, AA11, AA12 (Abb. D17 A); mit X1-For als Sonde konnte eine 3 kb Bande in X2, AA5, AA6, AA11, AA12 nachgewiesen werden (Abb. D16 A). AA12-For, hybridisiert auf Klonen des X- und Y-chromosomaln *Xmrk*-Contigs, zeigte ein 500 bp Bande bei X6, X7, X1 und X3 (Abb. D24 A).



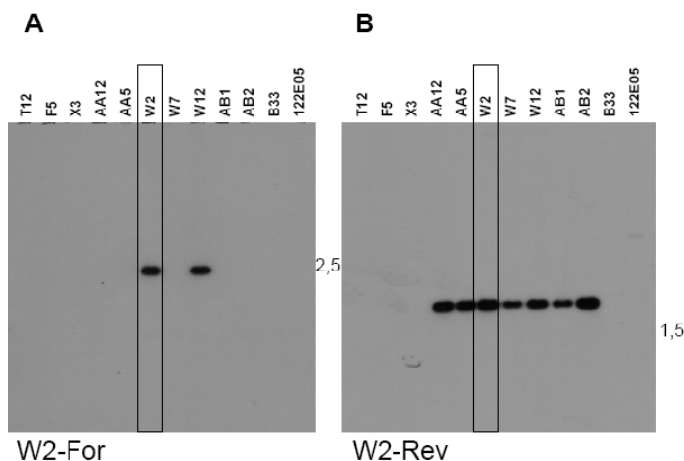
**Abb. D24:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klone *Hind*III verdaut [A, B] und auf genomischer DNA (Männchen M, Weibchen W) *Hind*III verdaut [C]. Eingesetzte Sonden: AA12-For [A] und AA12-Rev [B].

Mit den Klonen X1, X3, AA10, AA11 und AA12 wurde ein neues Contig erstellt, das sogenannte *cad20*-Contig. Dieses Contig konnte keinem bestehenden Contig angeschlossen werden. Fraglich war auch, ob dieses Contig den Geschlechtschromosomen angehört oder ob

es sich um autosomale Klone handelt. Die folgenden Analysen bestanden in der Zuordnung des *cad20*-Contigs zu einem bestimmten Chromosom sowie der Erweiterung des Contigs (Abb. D24 C).

AA12-Rev stellt das 3'-Endfragment des *cad20*-Contigs dar. Hybridisiert auf genomischer DNA wurden multiple Kopien im *Xiphophorus maculatus* Genom festgestellt. Daher ist der Marker ungeeignet für eine Durchmusterung der BAC-Bibliothek.

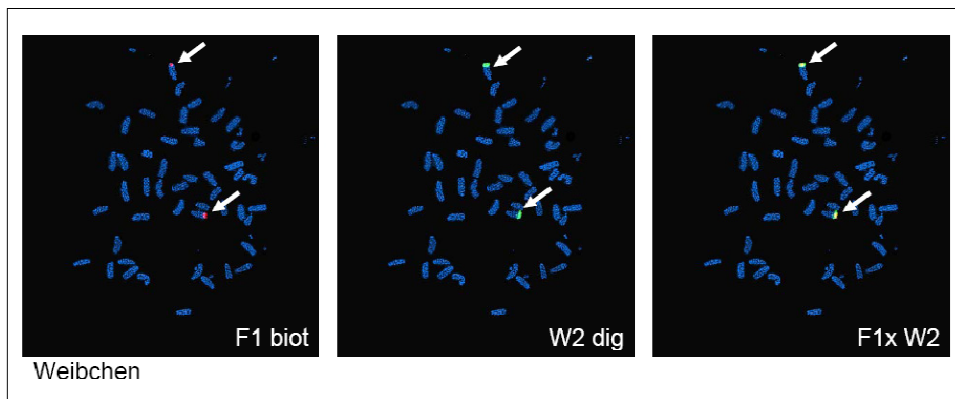
Erweitert werden konnte das Contig durch Endfragment-Hybridisierungsanalysen mit W2, einem Klon, der bei der Erweiterung des Y-chromosomal *Ycript*-Contigs identifiziert wurde (durchgeführt von Q. Zhou), aber keine Y-spezifische Bande aufwies. W2-Rev (Abb. D25 B) hybridisiert auf X und Y chromosomal Klonen der *Xmrk*-Contigs und wies eine 1,5 kb Bande in AA12, AA5, W7, W12, AB1 und AB2 nach. Eine Anfügung an das X-chromosomale *Xmrk*-Contig war jedoch auch durch die Erweiterung des *cad20*-Contig durch W2 nicht möglich. Gehören die Klone dem X Chromosom an oder handelt es sich um autosomale Klone?



**Abb. D25:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC- und Cosmid-Klone *Hind*III verdaut [A, B]. Eingesetzte Sonden: W2-For [A] und W2-

Die chromosomale Zuordnung wurde mittels FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung) untersucht (die Analysen wurden von mir im Labor von Dr. Catherine Ozouf Costaz, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris mit finanzieller Unterstützung von SYNTHESYS durchgeführt.) Dazu wurden F1 (Klon des *Xmrk/Ycript*-Contigs) und W2 als Sonden auf Metaphasechromosomen hybridisiert (double FISH). Abb. D26 zeigt das Ergebnis der FISH Hybridisierung. Sowohl W2 als auch F1 als Sonden weisen Signale auf zwei Chromosomen nach. Die Einblendung beider Signale konnte eine Überlagerung der Signale mit den Sonden F1 und W2 nachweisen. Die Klone X1, X3, AA5, AA12 und W2, die zusammen ein Contig bilden, liegen demnach auf den gleichen Chromosomen wie der Klon F1 (Klon des *Xmrk/Ycript*-Contigs). Anhand der Ergebnisse der FISH Hybridisierung und der Endfragment-Hybridisierungsanalysen konnten das Contig dem X Chromosom in der Geschlechtsbestimmenden Region zugeordnet werden. Dieses Contig deckt einen Teil des X

Chromosoms ab, konnte aber weder an das X-chromosomale *Xmrk*- noch an das *egfrb*-Contig angefügt werden.



**Abb. D26:** FISH-Analysen auf weiblichen Metaphasechromosomen. Eingesetzte Sonden F1, Biotin-markiert und W2, DIG-markiert. Die Pfeile weisen auf das Signal von F1 (rot), W2 (grün). Bei Überlagerung beider Signale erscheint ein gelbes Signal (F1 x W2).

### 1.5.3 Strategie zur Anfügung des X-chromosomalen *cad20*-Contigs an das X-chromosomale *egfrb*- oder *Xmrk*- Contig

Das Endfragment X3-Rev stellt das 5'-Ende des *cad20*-Contigs dar. X3-Rev hybridisiert auf genomischer DNA wies bei männlichen und weiblichen Individuen eine 2,5 kb Bande auf. Bei der Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit X3-Rev (durchgeführt von A. Böhne) konnte kein neuer BAC identifiziert werden. In einer Testhybridisierung waren die identifizierten Klone X6, B27 H119 positiv. H119, der bei der Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit *RNaseIII*-Sonde identifiziert wurde (Durchführung: A. Froschauer), konnte bisher keinem Contig zugefügt werden und stellte einen Kandidaten zur Erweiterung des X-chromosomalen *cad20*-Contigs dar. Die X3-Rev (Abb. D17 C) Sonde hybridisiert auf genomischer DNA wies weder im *HindIII*-Verdau, noch im *HindIII/EcoRV*- und *HindIII/SstI*-Doppelverdau einen RFLP auf. Daher wurde das Endfragment B27-For als Sonde eingesetzt. B27-For, hybridisiert auf genomischer DNA, zeigt im *HindIII*-Verdau eine 2kb große, Y-spezifische Bande (Abb. D14 B, C). Endfragment-Hybridisierungsanalysen mit B27-For als Sonde wies in H119 die 2 kb große, Y-spezifische Bande auf (Abb. D14 B, C). H119 ist folglich ein Klon des Y Chromosoms und kann nicht an das X-chromosomale *cad20*-Contig angefügt werden. Wie schon zuvor für die Region um B33 beschrieben, wird der genomische Bereich 5' von X3 nicht von der BAC-Bibliothek abgedeckt. Eine Strategie zur Problemlösung könnte die Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek mit dem Endfragment X3-Rev als Sonde sein.

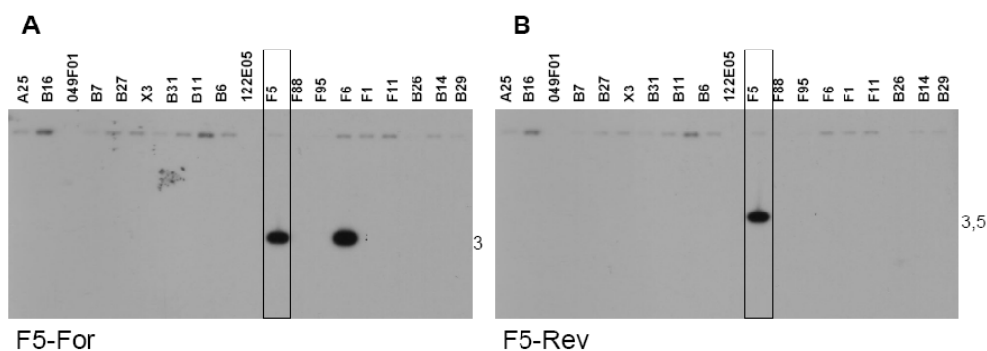
Das 3'-Ende des X-chromosomalen Contigs stellt W1-For dar (Endfragment-Hybridisierungsanalysen durchgeführt von Q. Zhou). W1 überlappt mit W2, ragt aber weiter

in 3'-Richtung als W2. W1-For, hybridisiert auf genomischer DNA, wies eine Bande in männlichen und weiblichen Individuen nach (durchgeführt von A. Böhne). Somit stellte W1-For einen geeigneten Marker zur Durchmusterung der BAC-Bibliothek dar, bei der allerdings kein neuer Klon identifiziert werden konnte. Die identifizierten Klone W1, W8, W9, W13, W14 gehören bereits verschiedenen Contigs an (Tabelle im Anhang). Auch in diesem Fall wird eine Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek mit dem Endfragment W1-For zur Erweiterung des *cad20*-Contigs notwendig sein.

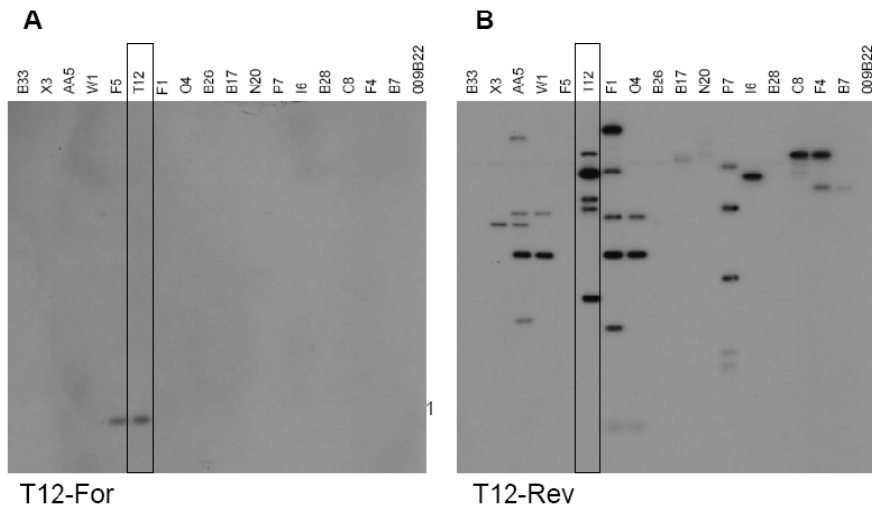
## 1.6 Chromosomale Zuordnung verschiedener Klone

Bei der Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit B7-Rev (Kapitel D1.3.1) wurde die Klone F2, F5 sowie F6 identifiziert. F2 und F6 konnten dem *Xmrk/Ycript*-Contig zugeordnet werden (Analysen Q. Zhou). F5 hingegen konnte in kein Contig eingegliedert werden und wies auch keine Y-spezifische Bande auf. Das Ergebnis beruht auf Endfragment-Hybridisierungen mit F5-For und F5-Rev, hybridisiert auf verschiedenen Klonen des *Xmrk*- und *egfrb*-Contigs. Somit wurde F5 vom Y Chromosom ausgeschlossen. Aufgrund der Homologie zum Y Chromosom stellte F5 einen Kandidaten zur Abdeckung des X Chromosoms dar.

Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, befindet sich zwischen den Klonen A25 und B7 eine Lücke in dem Y-chromosomalen *Xmrk/Ycript*-Contig. Zur Abdeckung dieser Region wurden Klone der Cosmid-Bibliothek herangezogen. C131H20 und C035P16 fügen sich in die Lücke ein und überlappen mit B7. Bei der Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit dem Endfragment C131H20-T8 wurde der BAC-Klon T12 identifiziert (Tabelle D3). Auch dieser Klon konnte nicht dem Y Chromosom zugeordnet werden. Endfragment-Hybridisierungsanalysen mit T12-For (1 kb) und F5-Rev wiesen eine Überlappung von T12 und F5 nach (Abb. D27, D28). Offen blieb, ob die Klone T12 und F5 dem X Chromosom oder den Autosomen angehören.



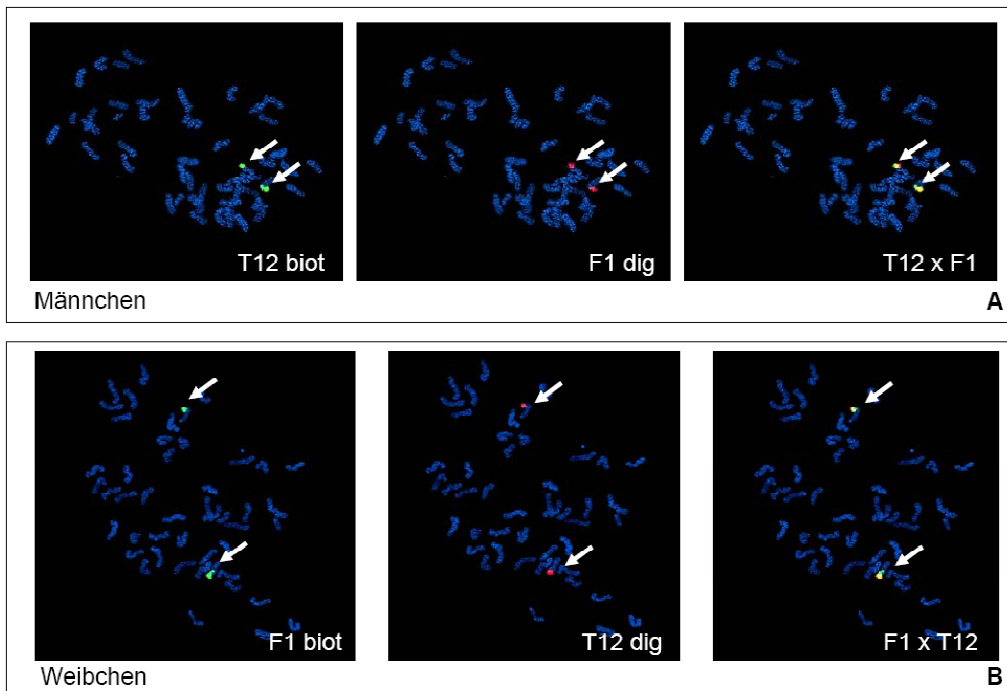
**Abb. D27:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC- und Cosmid-Klone *HindIII* verdaut [A, B]. Eingesetzte Sonden: F5-For [A] und F5-Rev [B].



**Abb. D28:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC- und Cosmid-Klone *Hind*III verdaut [A, B]. Eingesetzte Sonden: T12-For [A] und T12-Rev [B].

Die chromosomale Zuordnung wurde mittels FISH (die Analysen wurde von mir im Labor von Dr. Catherine Ozouf Costaz, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris mit finanzieller Unterstützung von SYNTHESYS durchgeführt.) analysiert. Dazu wurden T12 und F1 als Sonde auf männlichen und weiblichen Metaphasechromosomen hybridisiert. Wie in Abbildung D29 zu erkennen, wiesen beide Sonden Signale in zwei Chromosomen nach. Da F1 ein Klon des Y-chromosomalen *Xmrk/Ycrypt*-Contigs darstellt, zeigt das Signal die Geschlechtsbestimmende Region auf den Geschlechtschromosomen auf. Die Einblendung der Signale von F1 und T12 wies eine Überlappung beider Sonden nach. Somit gehören die Klone T12 und F5 den Geschlechtschromosomen an. Endfragment-Hybridisierungsanalysen schlossen eine Zugehörigkeit zum Y Chromosom aus. Auch konnten sie keinem X chromosomalen Contig angefügt werden. Folglich stellen F5 und T2 Klone des X Chromosoms dar, die bisher keinem X chromosomalen Contig zugeordnet werden konnten.

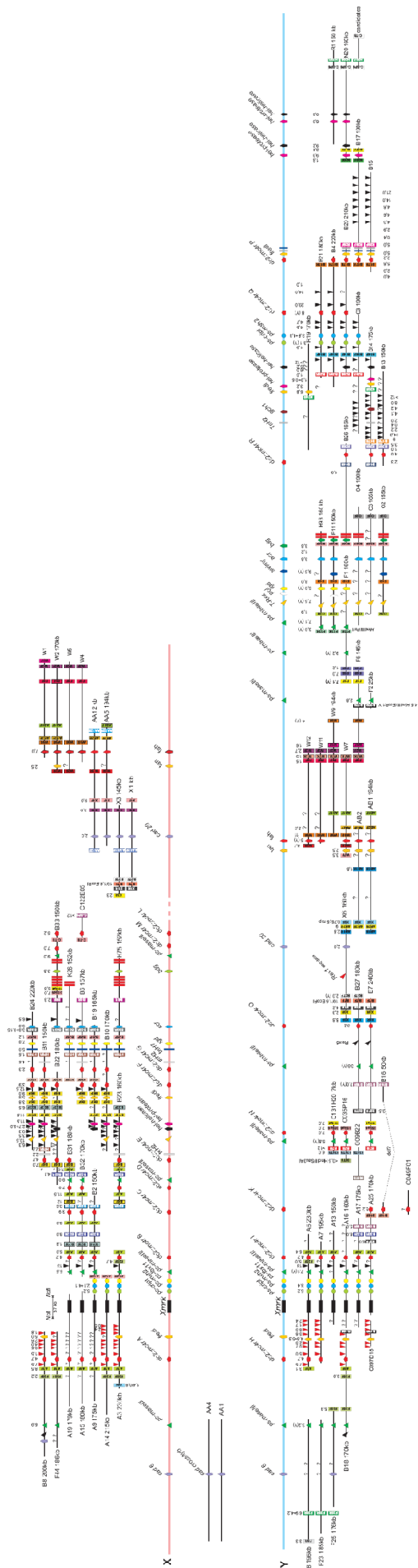




**Abb. D29:** FISH-Analysen auf männlichen [A] und weiblichen [B] Metaphasechromosomen. Eingesetzte Sonden: T12, Biotin-markiert [A] bzw. DIG-markiert [B] und F1, Biotin-markiert [B] bzw. DIG markiert [A]. Die Pfeile markieren die Signale von T12 (grün [A] bzw. rot [B]) und F1 (rot [A] bzw. grün [B]). Bei Überlagerung beider Signale (T12 x F1) fluoreszieren die Signale gelb.

Weitere Analysen zielten darauf ab, F5 und T12 in die bestehenden Contigs zu integrieren. Das Endfragment F5-For (Abb. D27 A) stellt einen aussichtsreichen Kandidaten zur Durchmusterung der BAC-Bibliothek dar. Hybridisiert auf genomischer DNA konnte nur eine Bande in männlichen und weiblichen Individuen identifiziert werden. Im Gegensatz dazu besitzt das Endfragment T12-Rev Sequenzanteile einer repetitiven Sequenz und kann daher nicht zur Durchmusterung der BAC-Bibliothek genutzt werden.





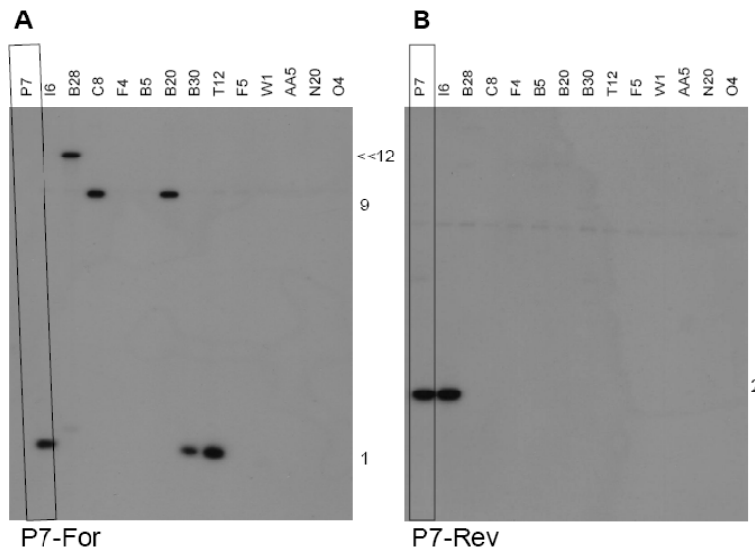
**Abb. D30:** Schematische Darstellung des X- und Y-chromosomalen *Xmrk*-Contigs mit den in dieser Arbeit getesteten Markern und neu angefügten Klonen. Schwarze Linien symbolisieren die BAC- und Cosmid-Klone mit verschiedenen genomischen Markern, die durch Southern-Blot-Analysen getestet wurden: Verschiedenfarbige Kästchen stellen Endfragmente dar, andere geometrische Formen symbolisieren Genkandidaten, transponierbare Elemente oder sich wiederholende Sequenzen.

### 1.7 Das X- und Y-chromosomale *egfrb*-Contig

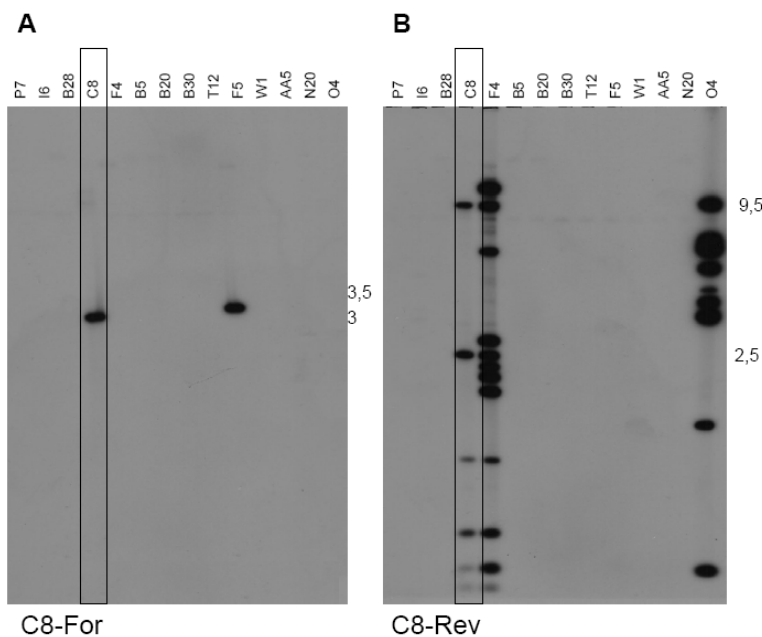
Die geschlechtsbestimmende Region auf dem X und Y Chromosom wird von den Genen *Xmrk* und *egfrb* flankiert. Beide Gene codieren für Rezeptor-Tyrosin-Kinasen des Typs epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Forschungsziel ist die komplette Abdeckung der Geschlechtsbestimmenden Region auf dem X und Y Chromosom. Ausgehend von *Xmrk* und *egfrb* wurden X- und Y- chromosomale BAC-Contigs erstellt (Abb. D2 und D30). Mit der Erweiterung der X- und Y-chromosomalen *Xmrk*-Contigs befassen sich Kapitel D1.3-1.6. In diesem Kapitel wird auf die X und Y chromosomalen *egfrb*-Contigs eingegangen (initiiert wurde das Contig von A. Froschauer.).

Abbildung D2 zeigt das X- und Y- chromosomale *egfrb*-Contig. Die Anordnung der Klone beruht auf Southern-Hybridisierungsanalysen verschiedener Marker, wie Genkandidaten oder Endfragmente (durchgeführt von A. Froschauer und in dieser Arbeit). Klone, die sich zwischen dem X- oder Y-chromosomalen *egfrb*-Contig befinden, beispielsweise B28, B1 und B9, konnten bisher nicht eindeutig einem Chromosom zugeordnet werden. In anderen Klonen konnten Y-spezifische RFLP-Banden nachgewiesen werden. Sie decken daher Teile des Y Chromosoms ab, wie C8 und F4 durch die Identifizierung einer Y-spezifischen RFLP-Bande des Markers *msh2* (codiert für ein Zink-Finger Protein; durchgeführt von A. Froschauer). Darüber hinaus besitzt F4 eine Y-spezifische RFLP-Bande des Markers *RNaseIII* (codiert für eine Ribonuklease; durchgeführt von A. Froschauer), die auch in B5 nachgewiesen wurde. Die Y-spezifische RFLP-Bande des Markers *igd* (codiert für eine Immunglobulin-Domäne) fügt die Klone B20 und B30 dem Y Chromosom zu (durchgeführt im Rahmen der Diplomarbeit).

Endfragment-Hybridisierungsanalysen bestätigten die Anordnung einiger Klone im *egfrb*-Contig. Der Klon P7 überlappt 3' mit I6 (Endfragment P7-Rev, 2 kb Bande; Abb. D31 B) und auf der 5'Seite mit B20 und B30 (Endfragment P7-For, 1 kb Bande; Abb. D31 A). Das Endfragment C8-Rev überlappt mit dem Klon F4 (Abb. D32 B). C8-For stellt das externe 5'-Endfragment des Y-chromosomalen *egfrb*-Contigs dar. Eine Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse des Endfragments auf genomischer DNA wird Aufschluss darüber geben, ob dieses Endfragment einen Kandidaten durch Durchmusterung der BAC-Bibliothek darstellt.



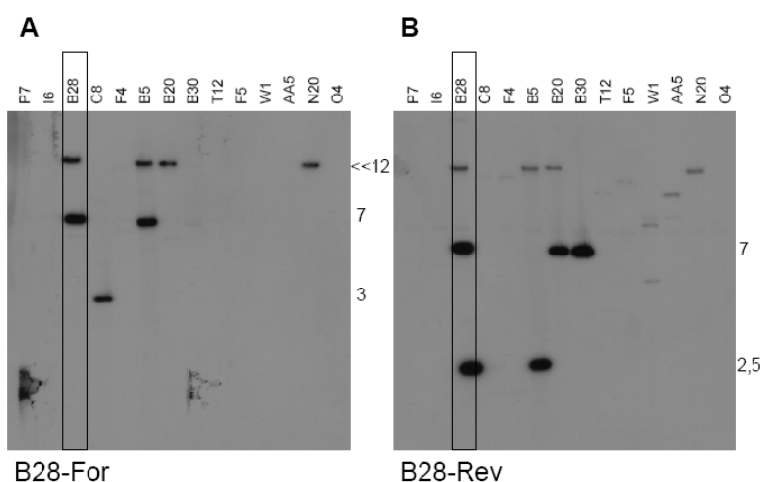
**Abb. D31:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klonen *Hind*III verdaut. Eingesetzte Sonden: P7-For [A] und P7-Rev [B].



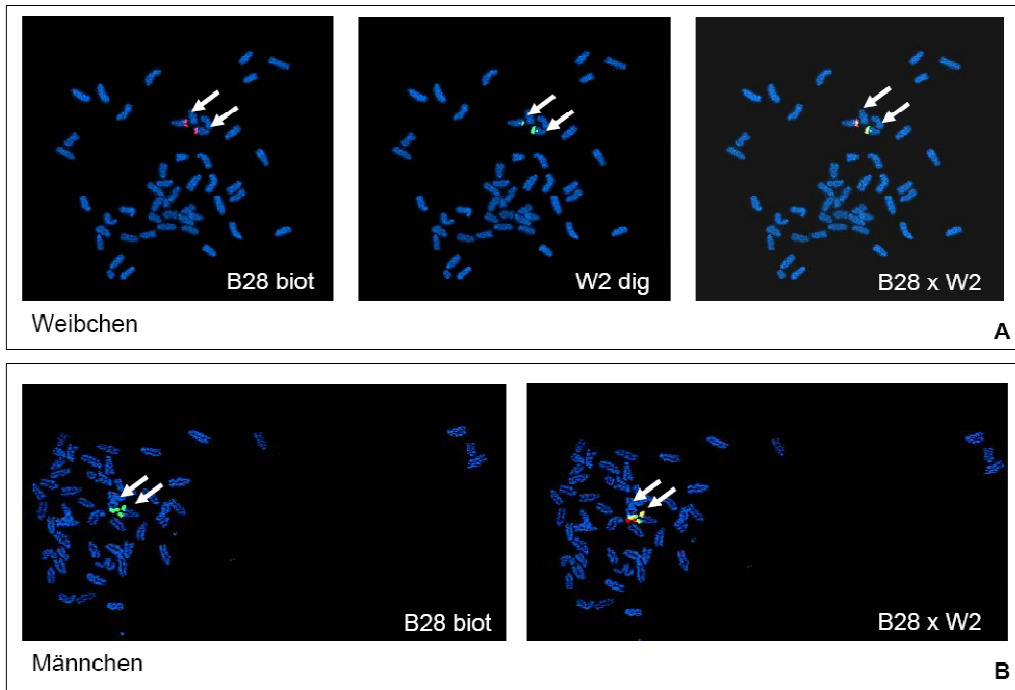
**Abb. D32:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klonen *Hind*III verdaut. Eingesetzte Sonden: C8-For [A] und C8-Rev [B].

Die Klone B1, B5, B9 sowie B28 wurden bei der Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit *mc4r* als Sonde identifiziert. *Mc4r* codiert für den Melanocortin-Rezeptor Typ 4 (siehe Kapitel D1.3.1). Fraglich ist, ob alle diese multiplen Kopien funktionell sind und an welchen physiologischen Prozessen sie beteiligt sein könnten. Im Rahmen ihrer Doktorarbeit untersuchte Yvonne Selz die Funktionalität der verschiedenen *mc4r*-Kopien der Geschlechtsbestimmenden Region. Dabei konnte Yvonne Selz mittels Cyclase-Assay zeigen, dass die *mc4rS*-Kopie für einen Rezeptor codiert, der durch  $\alpha$ -MSH, ACTH und dNTP-MSH

sowie einem modifizierten multipotenten synthetischen Liganden induziert werden kann. Diese *mc4r*-Kopie stellt einen Kandidaten für den *Mdl* und/oder *P*-Locus dar. Die Klone B1, B5, B9 und B28 besitzen diese *mc4rS*-Kopie. Während B5 aufgrund einer Y-spezifischen RFLP-Bande (*RNaseIII*-Marker) dem Y Chromosom angehört, ist die chromosomale Zuordnung der Klone B1, B9 und B28 nicht klar. Sollte es sich bei *mc4rS*-Kopie um den *Mdl*- oder *P*-Locus handeln, müsste auch eine Kopie auf dem X Chromosom zu finden sein. Endfragment-Hybridisierungsanalysen von B28 sowie B20 weisen auf eine Homologie zwischen B1, B9, B28 und dem Y Chromosom hin. B28-For hybridisiert auf B5 (7 kb Bande, Abb. D33 A), während B28-Rev auf B20 und B30 hybridisiert (7 kb Bande; Abb. D33 B). Ob die Klone B1, B9 und B28 die homologe Region auf den X Chromosom abdecken oder ob es sich um autosomale Klone handelt, wurde mittels FISH analysiert (die Analysen wurde im Labor von Dr. Catherine Ozouf Costaz, Muséum national d'Histoire naturelle, Paris mit finanzieller Unterstützung von SYNTHESYS durchgeführt). Dazu wurde B28 und W2 (X-chromosomaler Klon, siehe Kapitel D1.5.2) auf männlichen und weiblichen Metaphasechromosomen hybridisiert (Abb. D34). Beide Sonden weisen Signale auf zwei Chromosomen in männlichen und weiblichen Individuen auf. Die Einblendung beider Sonden zeigt eine Überlagerung der Signale. Beide Klone befinden sich auf denselben Chromosomen. Da W2 ein X-chromosomaler Klon der Geschlechtsbestimmenden Region ist, gehört B28 ebenfalls den Geschlechtschromosomen an. Mittels Endfragment-Hybridisierungsanalysen konnte eine Homologie zum Y-chromosomalen *egfrb*-Contig nachgewiesen werden (Abb. D33, D31). Somit wurde B28 und die in B28 enthaltenen *mc4rS*-Kopie dem X-chromosomalen *egfrb*-Contigs zugeordnet. *Mc4rS* bleibt daher ein viel versprechender Kandidat für den *Mdl* oder *P*-Locus.



**Abb. D33:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen mit verschiedenen BAC-Klonen *HindIII* verdaut. Eingesetzte Sonden: B28-For [A] und B28-Rev [B].



**Abb. D34:** FISH-Analysen auf weiblichen [A] und männlichen [B] Metaphasechromosomen. Eingesetzte Sonden: B28, Biotin-markiert und W2, DIG-markiert. Die Pfeile markieren Signale von B28 (grün) und W2 (rot). Bei Überlagerung fluoreszieren die Signale gelb (B28 x W2).



## 1.8 Zusammenfassung Kapitel 1:

Die vorigen Kapitel beschäftigten sich mit der Erweiterung und der physikalischen Verknüpfung verschiedener X- und Y- chromosomaler Contigs der geschlechtsbestimmenden Region des Platyfisches *Xiphophorus maculatus* mittels molekularbiologischer und cytogenetischer Methoden. Ziel ist die komplette Abdeckung der Geschlechtsbestimmenden Region. Bis zum jetzigen Zeitpunkt decken die Contigs 3,5 Mb auf dem Y Chromosom und 2,5 Mb auf dem X Chromosom ab. Einige Lücken konnten bisher noch nicht geschlossen werden.

## 2 Molekulare Analyse der Geschlechtsbestimmenden Region

Der Aufbau der Contigs stellt die Grundlage für molekulargenetische Untersuchungen der geschlechtsbestimmenden Region dar. Dazu werden verschiedene X- und Y-chromosomale Klone mittels „Schrotschuss“-Methode komplett oder teilweise sequenziert. Seit 2006 werden die X- und Y-chromosomalen Contigs in Zusammenarbeit mit dem Sequenzierungszentrum GENOSCOPE, Paris, Frankreich und dem Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, Frankreich komplett durchsequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden bioinformatisch analysiert.

### 2.1 Transponierbare Elemente, endogene Retroviren und sich wiederholende Sequenzen in der Geschlechtsbestimmenden Region

In der geschlechtsbestimmenden Region konnten eine Vielzahl von transponierbaren Elementen, endogenen Retroviren sowie sich wiederholenden Sequenzen identifiziert werden (siehe Kapitel A 4.2.1, Tabelle D6). Diese Elemente erschwerten den Aufbau der Contigs maßgeblich (Kapitel D1) und könnten eine Rolle bei den chromosomalen Umordnungen spielen, die in der Geschlechtsbestimmenden Region beobachtet wurden. Transponierbare Elemente und endogene Retroviren sind auch an der Pseudogen-Entstehung beteiligt (siehe Kapitel E2.1).

Die meisten in der geschlechtsbestimmenden Region identifizierten transponierbaren Elemente gehören zur Klasse I, den Retroelementen (Tabelle D6, Kapitel A4.2.1). Es konnten aber auch DNA-Transposons, ebenfalls als Klasse II bezeichnete transponierbare Elemente, beispielweise *Helitron* (Zhou et al. 2006) und *MITE*, identifiziert werden. *Helitrons* stellen eine neue Klasse von DNA-Transposons dar, die durch einen als „Rollenden Kreis“

bezeichneten Mechanismus transponieren (Kapitel A4.2.1). *MITE* wird im folgenden Kapitel näher erläutert.

**Tabelle D6:** Transponierbare Elemente in der Geschlechtsbestimmenden Region

Transponierbare Elemente	Typ	Referenzen
<i>rex1</i>	nicht-LTR Retrotransposon	J.-N. Voff et al., 2000
<i>rex2</i>	nicht-LTR Retrotransposon	J.-N. Voff et al., 2003
<i>rex3</i>	nicht-LTR Retrotransposon	J.-N. Voff et al., 1999
<i>rex5</i>	nicht-LTR Retrotransposon	J.-N. Voff et al., 2003
<i>rex6</i>	nicht-LTR Retrotransposon	J.-N. Voff et al., 2001
<i>rex7</i>	Ty3/gypsy-ähnliches LTR Retrotransposon	J.-N. Voff et al., 2003
<i>rex8</i>	Ty3/gypsy-ähnliches LTR Retrotransposon	J.-N. Voff et al., 2003
<i>jule</i>	Ty3/gypsy-ähnliches LTR Retrotransposon	R. Poulter et al., 1998
<i>TX-1</i>	LTR Retrotransposon	Schartl et al., 1999
<i>rex4</i>	Endogener Retrovirus	J.-N. Voff et al., 2003
<i>fishmy</i>	Endogener Retrovirus	diese Arbeit
<i>xir</i>	LTR ähnliche Wiederholungssequenz	I. Nanda et al., 2000
<i>T-Rex</i>	LTR Retrotransposon	C. Schultheis et al., 2006
<i>MIToy</i>	MITE Transposon	diese Arbeit
<i>helitron</i>	DNA Transposon	Q. Zhou et al., 2006

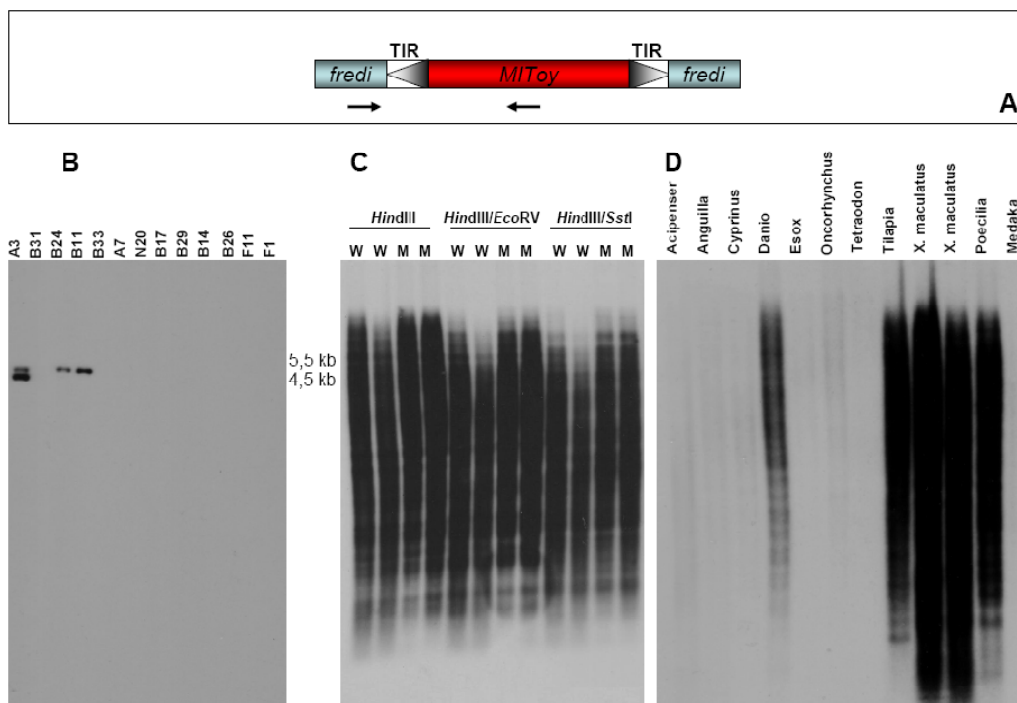
### 2.1.1 *MIToy*, Identifizierung eines MITE („miniatur inverted repeat transposable element“) Transposons in der Geschlechtsbestimmenden Region

In der Geschlechtsbestimmenden Region konnten auf dem X und Y Chromosom verschiedene Kopien des Genkandidaten *fredi* identifiziert werden (siehe Kapitel D2.2.1). *Fredi* codiert für einen putativen Transkriptionsfaktor mit Helix-Turn-Helix Motiv. Die X- und Y-chromosomalen *fredi* Kopien wurden sequenziert (Transposon-Mutagenese-Sequenzierung, durchgeführt in Zusammenarbeit mit C. Schmidt). Sequenzanalysen wiesen eine 220 bp große, palindromische Sequenz im Exon I von *fredi* auf, die lediglich in X-chromosomalen *fredi*-Kopien identifiziert wurde. Dabei handelt es sich um das Transposon MITE („miniature inverted repeat transposable Element“- kleine invertierte Wiederholungssequenz transponierbares Element).

MITEs sind kleine (meist unter 500 bp) und aufgrund fehlenden Codierungspotentials nicht-autonome Transposons. Sie konnten bisher in vielen Tier- und Pflanzenarten identifiziert werden. Im Zebrafisch wurde ein MITE namens *Angel* beschrieben (Izsvak et al. 1999). Aufgrund der hohen Kopienzahl wurden MITEs irrtümlich als SINE-Elemente (nicht autonome Typ I transponierbare Elemente) angesehen. Die TIR („terminal inverted repeats“, – invertierte sich wiederholende Abschlussequenzen) und die TSD („target site duplication“, – verdoppelte Integrationssequenz), die MITEs aufweisen, stellen Kennzeichen von DNA-Transposons (Typ II transponierbare Elemente) dar (siehe Kapitel A4.2.1). Seit Entdeckung

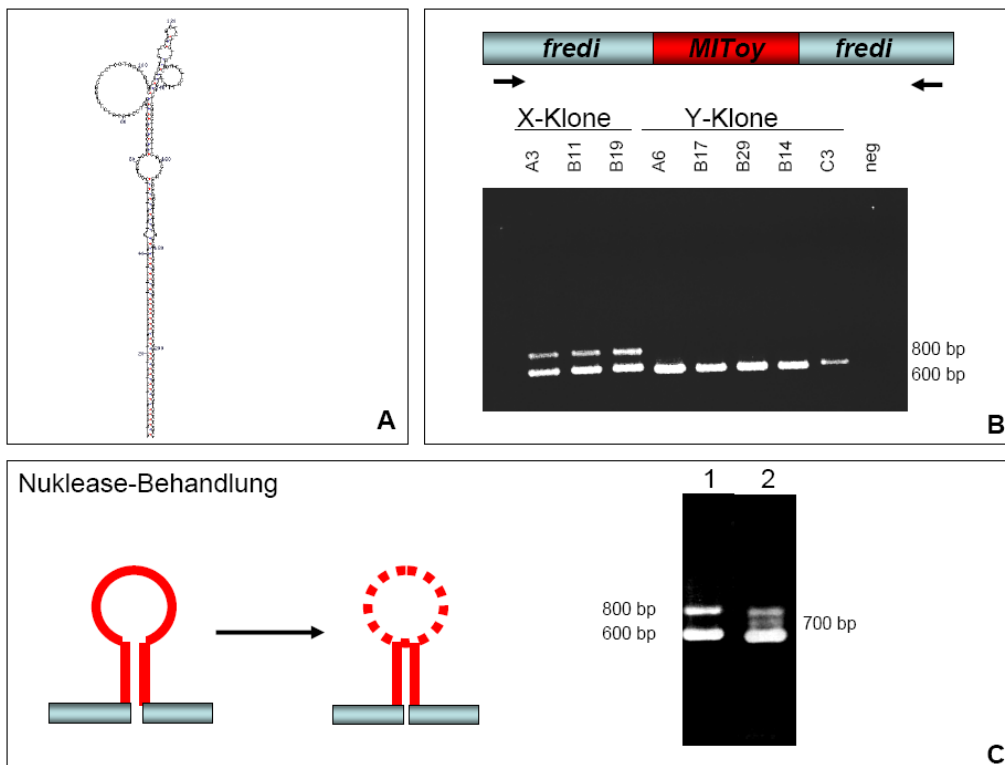


der MITEs im Mais vor etwa 15 Jahren konnte eine Reihe von MITE-Familien identifiziert werden, die untereinander keinerlei Sequenzähnlichkeiten aufweisen. Da MITEs keine Codierungssequenz besitzen, basiert die Klassifizierung auf den TIR- und TSD-Sequenzen. MITEs entstanden aus autonomen Transposons, mit deren Hilfe die Elemente innerhalb des Genoms transponieren können. Im Gegensatz zu anderen Transposons weisen MITEs eine hohe Kopienzahl im Genom auf. Wie die Elemente im Genom solch hohe Kopienzahl erlangten, ist bisher noch nicht geklärt. Vermutlich ist die geringe Größe der Elemente 100-500 bp ein Faktor für die große Kopienzahl, da kleinere Elemente eher dem Evolutionsdruck standhalten können als große Elemente. Für diese Theorie spräche auch die Tatsache, dass in einigen Arten kein Vorfahr-Element gefunden werden konnte und möglicherweise die großen autonomen Vorfahr-Elemente verloren gegangen sind, während die kleinen Elemente erhalten blieben. Darüber hinaus können einem autonomen Vorfahren mehrere MITE-Familien entstammen (siehe Review Feschotte et al. 2002). Nach einer Theorie von Izsvak et al. 1999, könnte die Sekundärstruktur (eine Stammschleife), die MITEs aufgrund ihrer palindromischen Sequenz bilden können, eine Rolle bei dem Duplikationsvorgang solcher Elemente spielen und daher für die große Kopienzahl verantwortlich sein.



**Abb. D36:** Schematische Darstellung der genomischen Struktur von *MIToy*. Pfeile zeigen die Primeransatzstelle für PCR-Analysen [A]. Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klonen *HindIII* verdaut [B], genomischer *Xiphophorus maculatus* DNA (Männchen M, Weibchen W) *HindIII*, *HindIII/EcoRV* und *HindIII/SstI* verdaut [C] und verschiedenen Fischarten *HindIII* verdaut [D]. Eingesetzte Sonde *MIToy* (PCR-Produkt) [B, C, D].

Das in der Geschlechtsbestimmenden Region identifizierte MITE, *MIToy* (Abb. D36 A), konnte in den Klonen A3, B11 und B24 des X-chromosomalen *Xmrk*-Contigs nachgewiesen werden (Abb. D36 B). *MIToy* weist die charakteristische palindromische Sequenz auf, die zur Stammschleifenbildung führt. Abb. D37 A zeigt die bioinformatisch abgeleitete Stammschleife (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>), die auch *in vitro* bestätigt werden konnte. *MIToy*, amplifiziert durch PCR, wies in der Gelanalyse zwei Banden auf (600 bp und 800 bp; Abb. D37 B). Das PCR-Produkt wurde mit einem Enzym behandelt (Mung-Bean-Nuclease), das einzelsträngige DNA verdaut. Abb. D37 C zeigt das Ergebnis nach der Enzymbehandlung. Eine dritte 700 bp Bande konnte im Gel identifiziert werden, während die 800 bp Bande schwächer wurde. Die obere 800 bp Bande stellt das stammschleifenbildende PCR-Produkt dar.



**Abb. D37:** Bioinformatisch abgeleitete Stammschleife von *MIToy* [A]. PCR-Analyse mit X und Y chromosomalen Klonen der Geschlechtsbestimmenden Region. Primeransatzstelle mit Pfeilen auf schematischer Darstellung der genomischen Struktur von *fredi* und *MIToy* markiert [B]. Schematische Darstellung der Funktionsweise der Nuklease-Behandlung und behandeltes und unbehandeltes PCR-Produkt. Vor der Behandlung (1) und nach der Behandlung (2) [C]

Worum handelt es sich bei dem 600 bp PCR-Produkt? Die für die PCR verwendeten Primer liegen im Exon I von *fredi*. Die Größe des PCR-Produkts entspricht dem *fredi*-Anteil ohne *MIToy* (Abb. D37 B). Wie schon beschrieben, besitzt *MIToy* die Fähigkeit zur

Stammschleifenbildung. Bildet ein Teil der DNA-Matrize eine Stammschleife, liest die Taq-Polymerase über den Bereich und es entsteht ein PCR-Produkt ohne *MIToy*.

Wie viele Kopien weist *MIToy* im Genom von *Xiphophorus maculatus* auf? Die Schwierigkeit bestand darin eine geeignete Sonde herzustellen, die lediglich Sequenzanteile von *MIToy* aufweist. Das zuvor beschriebene PCR-Produkt erwies sich als ungeeignet, da *MIToy* lediglich als Stammschleife amplifiziert werden konnte. Daher wurden Primer konstruiert, die den Bereich vor dem TIR und einen Teil der Stammschleife amplifizieren (Abb. D36 A). Zunächst wurde die Sonde auf X- und Y-chromosomalen Klonen des *Xmrk*-Contigs auf ihre Spezifität getestet. Lediglich in den X-chromosomalen *MIToy*-Klonen konnte ein Signal identifiziert werden (Abb. D37 B). Das PCR-Produkt wurde als Sonde auf genomischer *Xiphophorus maculatus* DNA männlicher und weiblicher Individuen hybridisiert. Wie in Abb D37 C zu sehen, weist *MIToy* im Genom mehrere hundert Banden auf. Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Individuen konnten aufgrund der hohen Kopienanzahl nicht identifiziert werden. Das Ergebnis konnte mittels PCR zusätzlich bestätigt werden. Dazu wurden Primer gewählt, die an die TIR binden und *MIToy* zwischen beiden TIRs amplifiziert wird. Das PCR-Produkt wies in der Gelanalyse viele Banden unterschiedlicher Größen auf. Somit wurden neben *MIToy* noch andere Elemente identifiziert, die ebenfalls diese TIRs aufweisen. Wie schon dargelegt stammen die MITEs von autonomen Transposons ab. Das autonome Transposon und das daraus abgeleitete MITE besitzen die gleiche oder sehr ähnliche TSD- und TIR-Sequenzen, anhand derer die MITEs klassifiziert werden. Mittels Southern-Blot-Hybridisierung und der PCR-Analyse könnten also nicht nur *MIToy* sondern auch der autonome Vorfahr von *MIToy* identifiziert worden sein.

Welcher Superfamilie gehört *MIToy* an?

Bioinformatische Analysen (RepeatMasker, <http://www.repeatmasker.org/>, CENSOR <http://www.girinst.org/replib/index.html>) zeigten, dass *MIToy* zur Superfamilie der *hAT* gehört. Der Name setzt sich aus der Transposon-Familie *hobo* aus *Drosophila*, *Activator* (*Ac*) aus Mais sowie der Löwenmäulchen Transposon-Familie *Tam3* zusammen. *MIToy* weist eine 93%ige Übereinstimmung zu dem transponierbaren Element TDR-3 von Zebrafisch nach, einem nicht-autonomen Transposon (TDR transposon-derived repeat – aus einem Transposon entstandene Wiederholungssequenz). Etwa 50% des menschlichen Genoms bestehen aus TDR [Lander et al. 2001]. Die im menschlichen Genom identifizierten TDRs gehören verschiedenen transponierbaren Elementen an, 13% LINE, 14% SINE, 4% LTR-Retrotransposons und 3% den DNA Transposons [Bjornsson et al. 2006]. Auch im

menschlichen Genom konnten MITEs identifiziert werden, einige miRNAs stammen von MITEs ab [Piriyaoponga und Jordan 2007]

*MIToy* zeigt keine Sequenzähnlichkeit zu dem Zebrafisch-MITE *Angel* auf. Laut RepeatMasker und CENSOR (<http://www.repeatmasker.org/>, <http://www.girinst.org/rebase/index.html>) Analysen gehört *Angel* ebenfalls der *hAT*-Superfamilie an. Dies steht allerdings im Widerspruch zu Feschotte et al. 2002, die *Angel* der Superfamilie *piggy-Bac/TTAA* zuschreiben.

Datenbankvergleiche (Ensemble, NCBI-Blast) wies *MIToy* in anderen Fischarten, wie Zebrafisch und Fugu nach. Dieses Ergebnis konnte mittels Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen bestätigt werden. Dazu wurde Platyfisch-*MIToy* als Sonde auf genomischer DNA verschiedener Fischarten hybridisiert. Multiple Kopien konnten im Zebrafisch, Tilapia und *Poecilia* nachgewiesen werden (Abb. D36 D).

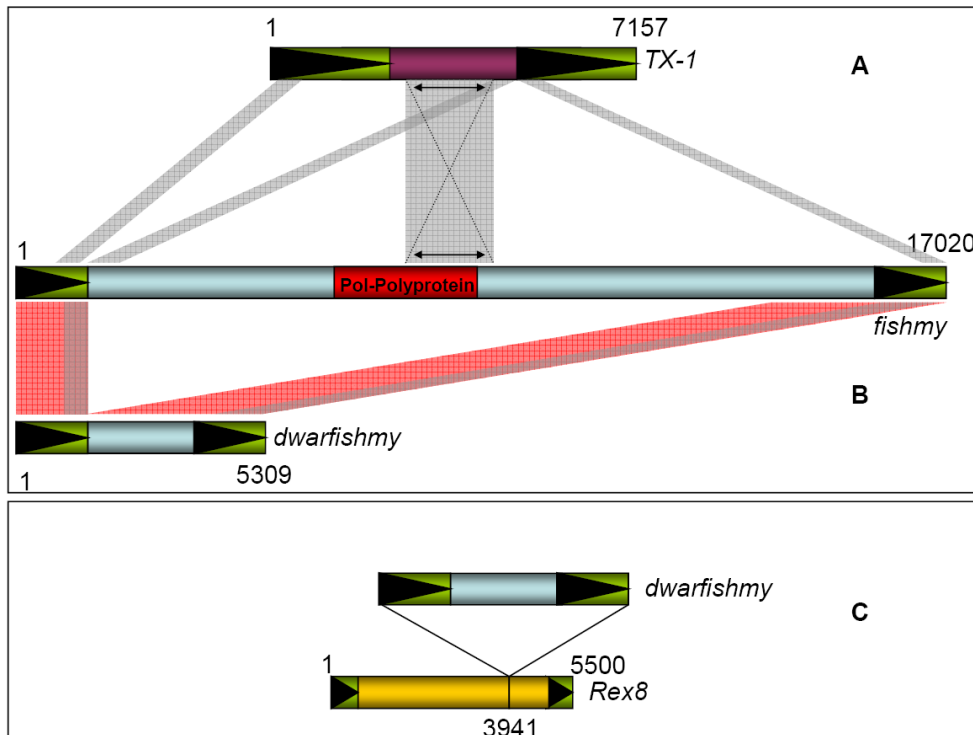
### **2.1.2 *Fishmy*, Identifizierung eines neuen endogenen Retrovirus in *Xiphophorus* mit Foamy-Virus verwandter *pol* Sequenz**

Beim Sequenzdatenvergleich zwischen X- und Y-chromosomalen Klonen des *Xmrk*-Contigs konnte eine etwa 1,7 kb große, Y-spezifische Sequenz identifiziert werden (VISTA, <http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>). Die Sequenz weist LTR (long terminal repeats – lange terminierende, wiederholende Sequenzen) auf. Sequenzanalysen (BlastX, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) zeigen Homologien zu dem Pol-Polyprotein des Retrovirus Foamy von Affen (SFV - simian foamy virus) auf.

Die Foamyviren, auch als Spumaviren bezeichnet, sind behüllte, Einzel(+)-Strang-RNA-Viren, (ss(+))RNA). Sie waren die ersten in der Literatur beschriebenen Retroviren. Bisher wurden sie ausschließlich in Säugetieren, verschiedenen Affenarten, Katzen, Rindern, Pferden und im Menschen nachgewiesen. Alle bisher charakterisierten Foamyviren besitzen ein komplexes Genom und kodieren neben Gag, Pol und Env noch weitere regulatorische Proteine Tas/Bel1 und Bet. Diese werden über einen internen Promotor, der sich im 3' Bereich des Env -Genes (Gene, die für Hüllproteine codieren.) befindet, exprimiert. Im Gegensatz zu anderen Retroviren lösen Foamyviren weder im Hauptwirt, noch in Wirten über die Artengrenzen hinaus Krankheiten aus. Aufgrund ihrer Apathogenität sind sie interessante Modellorganismen zur Weiterentwicklung und/oder Verbesserung der Gentherapie [Bock et al., 1998].

Neben der Sequenzhomologie zu dem Pol-Polyprotein des Foamyvirus wurde eine Homologie zu *TX-1* identifiziert (Abb D38 A, B). *TX-1* ist ein nicht-autonomes, aber aktives

LTR-Retrotransposon in *Xiphophorus*. Identifiziert wurde *TX-1* in sog. lof-1-Mutanten (loss-of-function-Mutanten – Funktionsverlustmutanten). Während interspezifische *Xiphophorus*-Kreuzungsmutanten spontan Hautkrebs ausbilden (siehe Kapitel A4.2), haben lof-1-Mutanten die Fähigkeit zur Melanombildung verloren. In diesen Mutanten ist die codierende Sequenz des Melanom-induzierenden Onkogens *Xmrk* durch *TX-1* zerstört. *TX-1* konnte nur in Fischarten innerhalb der Poecilidenfamilie identifiziert werden [Schartl et al., 1999].



**Abb. D38:** Schematische Darstellung der genomischen Struktur von *TX-1*: Grüne Kästen mit Pfeil stellen LTRs dar [A]. Schematische Darstellung der genomischen Struktur von *fishmy* und *dwarfishmy*. Grüne Kästen mit Pfeil stellen die LTRs dar. Roter Bereich ORF des Pol-Polyproteins ähnlich zu *foamy* [B]. Graue Kästen symbolisieren Homologien zwischen *TX-1* und *fishmy/dwarfishmy*. Schwarze Pfeile im grauen Kasten skizzieren einen invertierten Bereich [A, B]. Rosa Kästen zeigen Homologien zwischen *fishmy* und *dwarfishmy* [B]. *Dwarfishmy* konnte auf dem X Chromosom in dem ORF für Pol-Polyprotein von *Rex8* identifiziert werden [C].

Die Y-spezifische Kopie des transponierbaren Elements ist ein endogener Retrovirus, der *fish-foamy*, kurz *fishmy* genannt wurde. Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen mit Sequenzteilen des LTRs als Sonde konnten eine Vielzahl von *fishmy*-Kopien im Genom von *Xiphophorus maculatus* nachweisen. Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Individuen konnten aufgrund der großen Kopienanzahl jedoch nicht identifiziert werden.

Neben der Y-spezifischen Kopie, nachgewiesen in den überlappenden Klonen X6/AB1, wurden durch Southernblot-Hybridisierungsanalysen und PCR-Analysen mehrere Kopien in der Geschlechtsbestimmenden Region aufgezeigt (in den X-chromosomalen Klonen A3 und B11/B22, Abb. D15 A). Während die Kopien auf X6/AB1 und B22/B11 fast identisch sind,

fehlen der Kopie in A3 interne Sequenzanteile, das ORF (open reading frame – offenes Leseraster) für Pol-Polyprotein (Abb D38 B, Alignment erstellt durch ClustalW, BioEdit). Die Kopie wird daher *dwarfishmy* genannt. *dwarfishmy* wurde in der codierenden Sequenz des Pol-Polyproteins des autonomen LTR-Retrotransposons *Rex8* (Abb. D38 C) identifiziert. In der korrespondierenden Region auf dem Y Chromosom konnte *dwarfishmy* nicht nachgewiesen werden.

Weitere Datenbankuntersuchungen zielten darauf ab, *Fishmy* in anderen Fischarten aufzuspüren (Ensemble und NCBI). Dazu wurden BlastX und Blastp-Analysen mit dem ORF des *Xiphophorus maculatus fishmy*-Pol-Polyproteins im Zebrafisch, Fugu, Tetraodon, Medaka und Stichling durchgeführt. Lediglich Homologien zu verschiedenen anderen Pol-Polyproteinen wurden identifiziert, nicht aber zu dem *fishmy*-Pol-Polyprotein. *Fishmy* stellt somit vermutlich einen *Xiphophorus*-spezifischen endogenen Retrovirus dar.

## 2.2 Genkandidaten in der geschlechtsbestimmenden Region: Molekulargenetische und bioinformatische Analyse

Durch Sequenzanalysen konnten bisher mehr als 60 Genkandidaten (Tabelle D7, Abb. D30) in der Geschlechtsbestimmenden Region identifiziert werden. Jeder einzelne Genkandidat stellt einen potentiellen Anwärter auf die verschiedenen Genloci, die in der Geschlechtsbestimmenden Region lokalisiert sind dar, wie beispielsweise den geschlechtsbestimmenden Locus (*SD*) oder den Makromelanophor-Bestimmungslocus (*Mdl*). Jeder Genkandidat wird daher bioinformatischen und molekularbiologischen Analysen unterzogen. Hauptaugenmerk dieser Arbeit ist auf die Identifizierung von Genen, die bei der Geschlechtsbestimmung und/oder Geschlechtsdifferenzierung eine Rolle spielen, gerichtet. Die molekulare Grundlage der Geschlechtsbestimmung ist bei *Xiphophorus* weitgehend unbekannt [Kallman 1984, Volf und Schartl 2001]. Keines der bisher identifizierten Vertebraten Master-Geschlechtsbestimmungsgene, *dmrt1bY* von Medaka oder *SRY* der Säugetiere, konnten in der geschlechtsbestimmenden Region nachgewiesen werden [Veith et al.; 2003]. Die Identifizierung des Master-Geschlechtsbestimmungsgens in *Xiphophorus* wird vermutlich ein neues, bisher unbekanntes Master-Geschlechtsbestimmungsgen in Vertebraten hervorbringen. Die molekulargenetische und bioinformatische Untersuchung aller identifizierten Genkandidaten ist daher unerlässlich.

Tabelle D7: Genkandidaten der Geschlechtsbestimmenden Region

Genkandidat	Proteinprodukt	Kapitel	Hsa
<i>acot9</i>	Acyl-CoA Thioesterase		X
<i>acr</i>	Acetylcholine Rezeptor		2q33
<i>b4galt1</i>	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase		9q13
<i>bgd</i>	DNA Bindungsprotein		2q33
<b>cad20</b>	<b>Cadherin 20</b>	<b>1.3.4.1, 2.2.5.1</b>	<b>18q21</b>
<i>cad6</i>	Cadherin 6		5p14
<i>cgi112</i>	Unbekanntes Proteinprodukt		14q11
<i>cide</i>	Zelltodaktivator		3p26
<i>cldn11</i>	Claudin, Transmembranprotein		3q26
<i>cor11</i>	Neuronaler Korepressor		15q23
<i>cript</i>	Posynaptisches Protein		2p21
<i>dip2c</i>	AMP-Bindungsdomäne		10p15
<i>drosha</i>	Ribonuclease III		5p13
<i>egfrb</i>	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor		7p12
<i>eif5a</i>	Translation initiiender Faktor		17p13
<i>ezh2</i>	Enhancer des polycomb homolog		7q35
<b>fah</b>	<b>Unbekanntes Proteinprodukt</b>	<b>1.3.4.2, 2.2.2</b>	<b>Xq26</b>
<i>fbx11</i>	F-Box-Protein		2p21
<b>fredi</b>	<b>Transkriptionsfaktor mit Helix-turn-Helix-Domäne</b>	<b>2.2.1</b>	-
<i>gch1</i>	GTP Cyclohydrolase I		14q22
<i>gtf2ird2</i>	Transkriptionsfaktor		7q11
<i>IRF3</i>	Transkriptionsfaktor		
<i>igd</i>	Immunglobulin Domäne		3q13
<i>kbtbd2</i>	BTB/Kelch-Familie		7
<i>kelch</i>	Kelch-Domäne		Xp22
<b>kiaa0241</b>	<b>Proteindomäne mit unbekannter Funktion</b>	<b>2.2.5.2</b>	<b>7p14</b>
<i>kiaa1333</i>	Proteindomäne mit unbekannter Funktion		14q12
<i>liph</i>	Lipase		3q27
<i>mc4r</i>	Melanocortin Receptor Typ 4		18q22
<i>msh2</i>	DNA-Fehlbasenpaarungsreparatur-Protein		2q22
<i>p90a</i>	Autoantigen		3q13
<i>pdha1</i>	Pyruvate dehydrogenase		Xp22
<i>pld1</i>	Phospholipase		3q26
<i>psme2</i>	Proteasome Aktivator		14q11
<i>ptrf-1</i>	Transkriptionsfaktor		9q31
<b>rf131</b>	<b>RING-Finger-Protein, Zink-Finger verwandte Domäne</b>	<b>2.2.5.3</b>	<b>14q11</b>
<i>rf148</i>	RING-Finger-Protein, Zink-Finger verwandte Domäne		3q22
<i>rf152</i>	RING-Finger-Protein, Zink-Finger verwandte Domäne		18q21
<i>rps6ka3</i>	ribosomales Protein		Xp22
<i>slc7a14</i>	kationischer Aminosäure-Transporter		3q26
<i>ssat</i>	Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase		Xp22
<i>swimy</i>	DNA-Bindungsprotein		-
<i>stom</i>	Stomatin		9q34
<b>tan</b>	<b>Unbekanntes Proteinprodukt</b>	<b>2.2.3</b>	<b>Xq26</b>
<i>tigd1</i>	Tigger aus einem transponierbaren Element entstanden		
<i>tmeff</i>	Transmembran Protein, EGF ähnliche Domäne		2q32
<i>tnh2</i>	DNA-Bindungsprotein		
<i>tnh7</i>	DNA-Bindungsprotein		Xp22/Yp11
<i>tnik</i>	Interagierende Kinase		3q26
<i>trail</i>	Tumor necrosis factor receptor		3q26
<i>trim47</i>	Tripartitmotiv/RBCC Protein-Familie		17q25



<i>trim25</i>	Tripartitmotiv/RBCC Protein-Familie		
<i>vpac2</i>	Vasoactive Intestinal Peptide		7q36
<i>Xmrk</i>	Rezeptor Tyrosin Kinase Rezeptor		-
<i>znf226</i>	Zinkfingerprotein		

**Fett:** (z.B. *cad*) Genkandidaten in dieser Arbeit untersucht; Hsa: orthologe Sequenz auf menschlichen Chromosom.

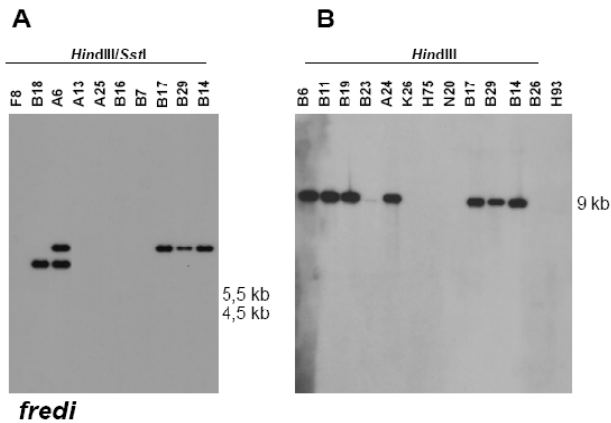
### 2.2.1 Fredi, ein möglicher Transkriptionsfaktor mit Helix-turn-Helix-Motif

Durch Transposon-Mutagenese-Sequenzierung des Klons B14 konnte der Genkandidat *fredi* in der Geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus* identifiziert werden (Q Zhou, 2005). Seinen Namen erhielt *fredi* in Anlehnung an den ehemaligen Fußballnationalmannschaftsspieler Fredi Bobic (<http://www.fredibobic.de/>). *Fredi* codiert für einen Transkriptionsfaktor mit Helix-turn-Helix Motiv und zeigt Ähnlichkeiten zu HTH\_7 (Zugangsnummer: PF02796, HTH-Domäne einer Rekombinase, die in Procaryoten in die site-spezifische Rekombination involviert ist [Garnier et al., 1987]). *Fredi* besitzt ca. 20 Kopien im *Xiphophorus maculatus* Genom (Q. Zhou, 2005). Einige dieser Kopien wurden von Sabine Matschl im Rahmen ihrer Diplomarbeit untersucht. Sie konnte Unterschiede zwischen Kopien feststellen und beschrieb *fredi* als eine neue Genfamilie in *Xiphophorus maculatus*. *Fredi* konnte auch als Multikopiengen in anderen Fischarten nachgewiesen werden, scheint aber außerhalb der Fischart nicht vorzukommen. Somit handelt es sich bei *fredi* um eine Fisch-spezifische Genfamilie (Q. Zhou, 2005; S. Matschl, 2005).

Expressionsanalysen in *Xiphophorus maculatus* wiesen ein alternativ gespleißtes PCR-Produkt im Hoden nach (Y. Selz, 2003 und Q. Zhou, 2005). Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen mit *fredi* (PCR-Produkt) als Sonde wiesen in der geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus* 2 Kopien auf dem X Chromosom und 4 Kopien auf dem Y Chromosom nach. Q. Zhou konnte im Rahmen seiner Doktorarbeit im *SstI/HindIII*-Doppelveerdau eine Y-spezifische 5,5 kb RFLP-Bande auf Klonen der Geschlechtsbestimmenden Region identifizieren. Gibt es Unterschiede zwischen X und Y spezifischen *fredi*-Kopien? In Zusammenarbeit mit C. Schmidt wurden die X und Y spezifischen *fredi*-Kopien der geschlechtsbestimmenden Region durch Transposon-Mutagenese sequenziert. Sequenzdatenvergleiche wiesen in Exon I eine ca 220 bp große, palindromische Insertion in X-chromosomalen Kopien auf. Dabei handelt es sich um ein transponierbares Element des Typs I, ein MITE (siehe Kapitel D2.1.1) *MIToy* genannt. *MIToy* zerstört das ORF („open reading frame“ – offenes Leseraster) des Exons I von *fredi*. Die Y-chromosomalen *fredi*-Kopien weisen keine Insertion auf, wie einerseits durch



Sequenzdatenvergleiche gezeigt werden konnte; andererseits durch Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen bestätigt wurde. Dazu wurde *MIToy* als Sonde auf X und Y chromosomalen *fredi*-Klonen eingesetzt. Lediglich die X-chromosomalen *fredi*-Klone wiesen eine 9 kb große Bande auf (Abb. D39 B).



**Abb. D39:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klonen *HindIII/SstI* [A] und *HindIII* [B] verdaut. Eingesetzte Sonde: *fredi* (aufgereinigtes PCR-Produkt).

Ist *MIToy* in Y-chromosomalen *fredi*-Kopien verloren gegangen? Integriert ein transponierbares Element an einer bestimmten Stelle im Genom, führt dies zu einer Verdopplung der Ziel- bzw. Integrationssequenz (TSD). Die verdoppelte Zielsequenz von *MIToy* lautet TGACTTAGACCA. Wird das transponierbare Element aus einem genomischen Abschnitt herausgeschnitten, bleibt die verdoppelte Zielsequenz erhalten. In den Y-chromosomalen *fredi*-Kopien konnte keine Verdopplung der Zielsequenz identifiziert werden und *MIToy* integrierte niemals in Y-chromosomale *fredi*-Kopien. Somit könnten die Y-chromosomalen *fredi*-Kopien funktional sein, während die X-chromosomalen *fredi*-Kopien Pseudogene in der Geschlechtsbestimmenden Region darstellen. *MIToy* wurde in den X-chromosomalen *fredi*-Kopien an der gleichen Stelle nachgewiesen, was die Vermutung zulässt, dass die Integration des Transposons vor der Duplikation stattgefunden haben muss.

### 2.2.2 *Fah*, ein Genkandidat mit unbekannter Funktion in der geschlechtsbestimmenden Region

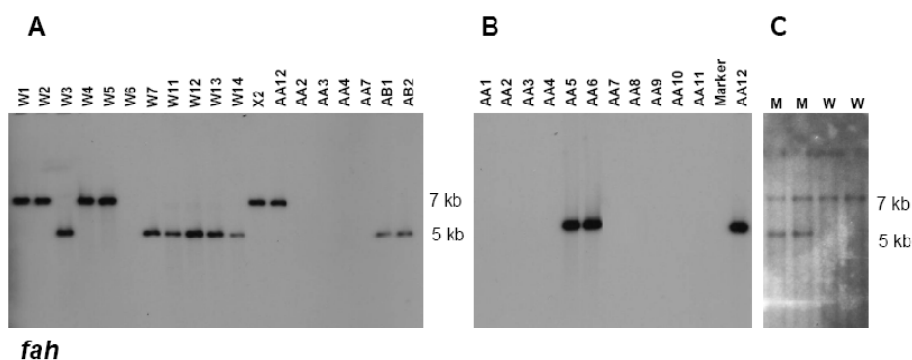
Der Klon AA12 wurde durch die „Schrotschuss“-Methode partiell sequenziert (in Zusammenarbeit mit Immanuel Rhode). Sequenzanalysen (BlastX) wiesen in dem Unterklon AA12-4m-T3 Homologien zu einem bisher unbekanntem Proteinprodukt von *Tetraodon* (Zugangsnummer: CAF98727) nach. CAF98727 ist ortholog zu Xvelo1 (Zugangsnummer: AAP43960, BlastX-Analysen), einem im südamerikanischen Krallenfrosch *Xenopus laevis* beschriebenen Protein mit unbekannter biologischer Funktion. Keine bisher bekannte

konservierte Proteindomäne oder Proteinmotiv konnte in Xvelo1 nachgewiesen werden [Claußen und Pieler, 2004]. Neben dem 779 AS großen Protein konnte eine 269 AS große Spleißvariante des Proteins Xvelo1, Xvelo1 splice variant (AAP43961), nachgewiesen werden. Die Xvelo1-Isoformen wurden bei der Suche nach vegetativ lokalisierter RNA in Xenopus-Oozyten identifiziert, wofür auch der Name, Xvelo1 - Xenopus vegetativ lokalisiert, steht. Beide Xvelo1-Isoformen weisen sehr ähnliche Expressionen auf. Im adulten Frosch sind sie stark im Ovar und im Hoden exprimiert. Im Embryo sind die *Xvelo1*-Isoformen während des Blastula-Stadiums und der Gastrulation exprimiert [Claußen und Pieler, 2004]. Die Expression fällt während der Midblastula ab und ist im frühen Neurula-Stadium kaum noch nachweisbar. Aufgrund der frühen Expression handelt es sich bei den Xvelo1-Isoformen um maternal exprimierte und in der Oocyte eingelagerte RNA, ein so genannter Maternalfaktor. Maternalfaktoren steuern alle frühen Prozesse der Embryonalentwicklung. Sie sind involviert in Achsenbildung, Keimbahn- und Keimzellendifferenzierung. Synthetisiert werden Maternalfaktoren während der ersten Wachstumsphase (Stadium I) der Oogenese. In den darauf folgenden Stadien werden die Maternalfaktoren in unterschiedliche Bereiche der Oocyte eingelagert, in den animalen und vegetativen Pol oder in den umrandenden Cortex. Die Lokalisierung in den vegetativen Cortex erfolgt über zwei zeitlich getrennte Wege. Früh lokalisierte RNA ist in Stadium I der Oogenese mit der mitochondrialen Wolke assoziiert. In Stadium II und III wird sie an die Spitze des vegetativen Cortex transportiert und dort gespeichert. Spät lokalisierte RNA befindet sich im Stadium I außerhalb der mitochondrialen Wolke, wird in Stadium II-IV in den vegetativen Cortex der Oocyte transportiert und gespeichert [Claußen und Pieler 2004]. Erst im späten Blastula Stadium (Mid-blastula transition – Mittblastulaübergang) nach 12 Zellteilungen, wird das zygotische Genom in Xenopus aktiviert [Newport and Kirschner 1982 a/b]. Das Verhältnis von DNA zu Zytoplasma scheint für die Expression des zygotischen Genoms verantwortlich zu sein. Dabei könnten im Zytoplasma gelagerte Transkriptionsrepressoren eine Rolle spielen [als Überblick siehe Wolpert 1998].

Die Xvelo1-Isoformen sind in unbefruchteten Oozyten (Stadium I) im gesamten Zytoplasma außerhalb der mitochondrialen Wolke nachweisbar. Die Lokalisierung in die vegetative Hemisphäre der Oocyte erfolgt in den darauf folgenden Stadien zunächst in die Spitze der vegetativen Cortex (Stadium III-IV der Oogenese), später in der gesamten Cortex der vegetativen Hemisphäre (Stadium VI der Oogenese). Somit gehören die Xvelo-Isoformen zu spät lokalisierter RNA. Das Lokalisierungssignal liegt in der 3' UTR (untranslated region - nichttranslatierte Region). Die Nukleotidsequenz des Lokalisierungssignals bildet eine

Stammschleife, die zusammen mit der Nukleotidsequenz für die Lokalisierung der RNA in die vegetative Hemisphäre der Oocyte verantwortlich ist [Claußen und Pieler 2004].

Aufgrund der Homologie zu *Xvelo1* wurde der in Klon AA12 identifizierte Genkandidat *Fahrrad* kurz *fah* (abgeleitet aus dem Französischen; velo – Fahrrad) genannt. Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse mit *fah* als Sonde auf genomischer *Xiphophorus maculatus* DNA wies neben einer 7 kb Bande eine Y-spezifische, 5 kb große RFLP-Bande im *Hind*III-Verdau auf (Abb. D40 C). Eine Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit *fah* als Sonde identifizierte ausschließlich Klone der Geschlechtsbestimmenden Region (Kapitel D1.3.4.2, Abb. D40 A, B). *Fah* kann daher als Einzelgen im Genom von *Xiphophorus maculatus* angesehen werden. Mit Hilfe von *fah* als genomischem Marker zur Contigweiterung konnten die beiden Y-spezifischen Contigs, das *Xmrk*- und *Ycript*-Contig miteinander verknüpft werden (Kapitel D1.4).



**Abb. D40:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klonen *Hind*III verdaut [A, B] und auf genomischer DNA (Männchen M und Weibchen W) *Hind*III verdaut [C]. Eingesetzte Sonde: *fah* (aufgereinigtes PCR Produkt).

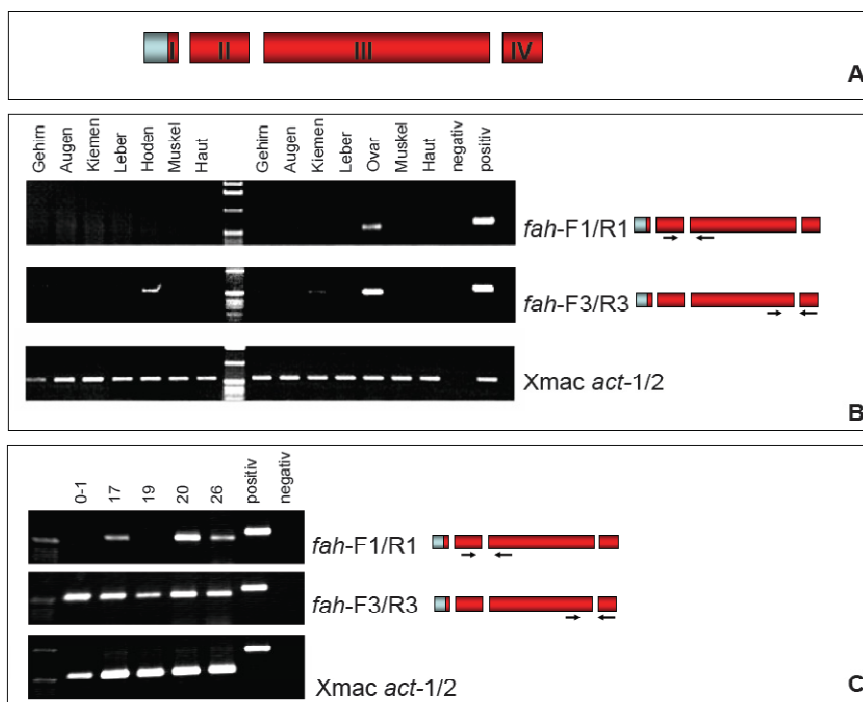
Gibt es Unterschiede zwischen den X- und Y- chromosomalen *fah*-Allelen? Die *fah*-Allele auf dem X und Y Chromosom wurden zunächst durch Transposonmutagenese sequenziert. Komplettiert wurden die Nukleotidsequenzen nach Erhalt der Sequenzen der BAC-Klone W2 (X-chromosomal) und AB1 (Y-chromosomal) (Sequenzierung der Klone durch GENOSCOPE). Wie Sequenzvergleiche zeigten (BioEdit, bl2seq), sind die *fah*-Allele auf dem X und Y Chromosom identisch. Anhand der Nukleotidsequenz und mittels Sequenzdatenvergleich (bl2seq mit dem Tetraodon-Protein Zugangsnummer: CAF98727) und Datenbankanalyse (Genescan) konnte die genomische Struktur (Intron- und Exongrenzen) von *fah* rekonstruiert werden. Die 5'-Region mit dem UTR (untranslated region – nichttranslatierte Region) -Bereich von *fah* wurde mittels RACE-PCR (rapid amplification of cDNA-ends – schnelles Amplifizieren von cDNA-Enden, Kapitel D2.2.2.1) aus Ovar-RNA ermittelt. Wie in Abb. D41 A zu sehen, besteht *fah* aus vier Exons. Die übersetzten

Proteinsequenz (BCM-search-launcher, ExPasy) weist keine bekannte Proteindomäne oder Proteinmotiv auf (PROSITE).

### 2.2.2.1 Expressionsanalysen von *fah* in *Xiphophorus maculatus*, Identifizierung von *fah*-Isoformen mit unterschiedlicher Expression

Zur Analyse der Expression von *fah* in Embryonen und adulten Geweben wurden verschiedene Primer konstruiert, die unterschiedliche Bereiche von *fah* amplifizieren (Abb. D41C). Diese wurden zunächst auf genomischer DNA getestet und anschließend auf cDNA (reverse Transkription von RNA) eingesetzt.

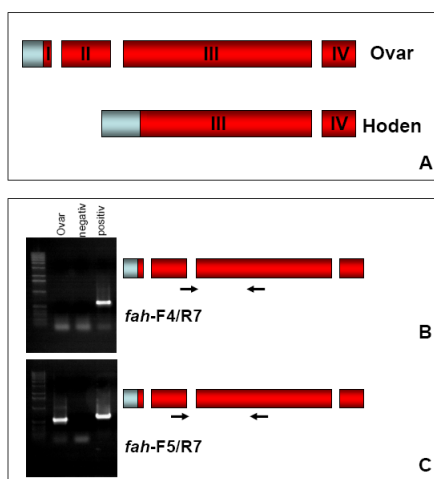
Abb. D41 C zeigt die Ergebnisse der RT-PCR-Expressionsanalyse. In adulten *Xiphophorus maculatus* Geweben konnte mit der Primerkombination *fah*-F1/R1 eine Expression ausschließlich im Ovar nachgewiesen werden. Die gleiche Primerkombination, eingesetzt auf embryonaler cDNA, wies Expression in späteren Embryonalstadien, in Stadium 17 und ab Stadium 20 auf.



**Abb. D41:** Schematische Darstellung der genomischen Struktur des Genkandidaten *Xiphophorus maculatus fah* (hellblauer Kasten 5'-UTR, rote Kästen Exon 1-4) [A]. RT-PCR- Expressionsanalysen auf männlichen und weiblichen Geweben [B] und verschiedenen Embryonalstadien [C]. Schwarze Pfeile auf der schematischen Darstellung von *fah* skizzieren die Primeransatzstellen. cDNA-Abgleich nach Aktin-PCR (*Xmac act-1/2*).

Die Primerkombination *fah*-F3/R3 (Abb. D41 C) wies neben einer starken Expression im Ovar eine Expression im Hoden nach. Dies deutet auf eine im Hoden exprimierte Spleißvariante hin. Wie könnte diese *fah*-Isoform aussehen? RT-PCR-Analysen mit der

Primerkombination *fah*-F1/R1 wiesen keine Expression im Hoden nach. Somit liegt der Unterschied zwischen den Isoformen in der 5'-Region des Gens. Zur Identifizierung der 5'-Region der Spleißvariante wurde eine RACE-PCR (RACE rapid amplification of cDNA ends – schnelle Identifizierung von cDNA Enden) durchgeführt, die das 5'-Ende der Hoden-cDNA amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde anschließend sequenziert und die cDNA-Sequenz konnte ermittelt werden. Im Vergleich zur zuvor rekonstruierten *fah*-Sequenz, ist die im Hoden exprimierte Sequenz verkürzt. Exon I konnte in der Sequenz nicht identifiziert werden. Die Sequenz beginnt in der Mitte von Exon II und beinhaltet Intron II. Ein Startcodon konnte zu Beginn von Exon III nachgewiesen werden. Exon II und Intron II stellen die 5'-UTR Region der im Hoden exprimierten Spleißform dar (Abb D42 A). Ist diese Spleißvariante auch im Ovar exprimiert? Dazu wurde ebenfalls eine RACE-PCR-Analyse mit RNA aus Ovar durchgeführt. Im sequenzierten RACE-PCR-Produkt konnte die im Hoden exprimierte Isoform nicht identifiziert werden. Bestätigt wurde das Ergebnis zur RT-PCR-Analyse auf Ovar-cDNA. Zwei Primerkombinationen wurden getestet, *fah*-F4/R7 und *fah*-F5/R7 (Abb. D42 B, C). *fah*-F4 liegt im Exon II direkt vor Intron II, während *fah*-F5 in Intron II liegt. In der Gelanalyse konnte in der Ovar-cDNA eine Bande mit der Primerkombination F4/R7 identifiziert werden. Mit der Primerkombination F5/R7 konnte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden. Intron II ist nicht in der Ovar-cDNA enthalten. Die Spleißvariante kann im adulten Gewebe nur im Hoden identifiziert werden.



**Abb. D42:** Schematische Darstellung der *fah*-Isoformen aus Ovar und Hoden [A]. RT-PCR-Analysen auf Ovar-cDNA. Die schwarzen Pfeile auf der schematischen Darstellung von *fah* skizzieren die Primeransatzstellen [B, C].

Neben der Expression im Hoden und Ovar weist die Primerkombination *fah*-F3/R3, eingesetzt auf embryonaler cDNA, Expression ab Stadium I nach. In diesem frühen Stadium liegen im Fischembryo lediglich maternal synthetisierte RNA vor. Diese wird während der Oogenese (Stadium I a/b) von der Oozyte selbst produziert und verbleibt zunächst im Zytoplasma. In

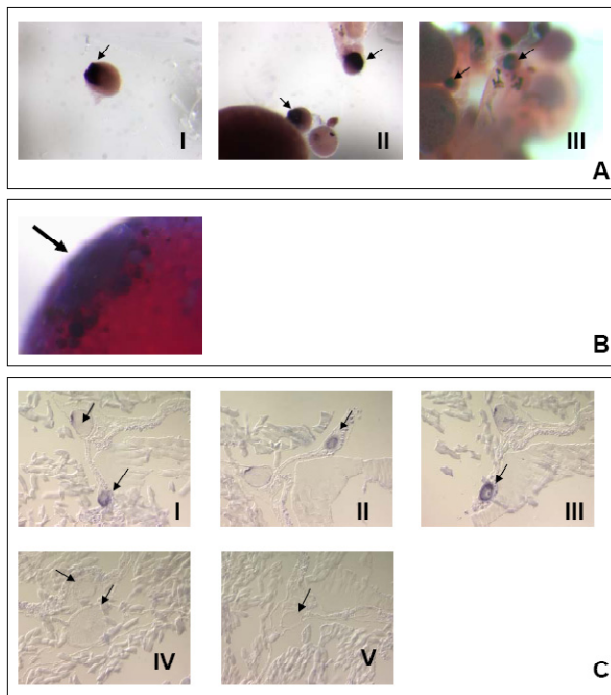
Stadium II-IV werden die Maternalfaktoren dann in der Oozyte verteilt. Je nach Lokalisierungssignal werden sie in unterschiedliche Klassen aufgeteilt. Klasse I wird in den animalen Pol, Klasse II in den vegetativen Pol transportiert. Klasse III und IV werden in der gesamten Oozyte im Zytoplasma (Klasse III) oder in der Cortex (Klasse IV) verteilt. Nach Eiaktivierung (Kontakt mit Wasser, spielt bei *Xiphophorus maculatus* keine Rolle, da sie lebendgebärend sind und eine intrakorporale Befruchtung stattfindet) und/oder Befruchtung werden die Maternalfaktoren der Klasse II und III über die axiale Strömung (axial-streaming) zunächst in den animalen Pol gezogen und anschließend mit den Maternalfaktoren der Klasse I in den Bereich der Keimscheibe verlagert. Maternalfaktoren der Klasse IV bilden einen cytokinetischen Ring an der Grenze zwischen Keimscheibe und Dotterzelle [zum Überblick siehe Pelegri 2003]. Die Aktivierung des zygotischen Genoms beginnt bei Fischen im späten Blastulastadium, etwa nach der zehnten Zellteilung (mid-blastula transition - Mittblastulaübergang) [Kane und Kimmel 1993]. Dies entspricht bei *Xiphophorus maculatus* etwa Embryonalstadium 3 [Tavolga 1949]. Im Mittblastulaübergang verlangsamen sich die Zellteilungen und werden asynchron. Erste Zellwanderungen können beobachtet werden [Kane und Kimmel 1993]. Welcher Klasse von maternal lokalisierter RNA gehört *fah*-Isoform an?

#### 2.2.2.2 Lokalisierung der *fah*-Isoform im Ovar und frühem Embryostadium

Zur Lokalisierung der Expression der *fah*-Isoform im unbefruchteten Ovar und im frühen Embryonenstadium wurden „Whole mount“ *in situ* Hybridisierungen (Expressionsanalyse im kompletten Gewebe siehe C 1.9) durchgeführt. Dazu wurde das zuvor klonierte *fah*-RT-PCR-Produkt aus Hoden (Primerkombination: *fah*-F3/R3) als Sonde eingesetzt. In Abb. D43 A ist das Ergebnis der Expressionsanalysen zu sehen. Im unbefruchteten Ovar kann in jüngeren Oocyten ein starkes Signal in einer Hemisphäre festgestellt werden, das in reiferen Oocyten schwächer wird. Möglicherweise hängt dies mit zunehmender Einlagerung von Cytoplasma während der Oogenese zusammen. Die *fah*-Expression an einem Pol schließt Maternalfaktoren der Klasse III aus, die im Cytoplasma der gesamten Oocyte verteilt sind. Im frühen Embryo wurde die *fah*-Expression in der Keimscheibe nachgewiesen (Abb. D43 B). Somit kann auch Maternalfaktor der Klasse IV (maternale RNA lokalisiert in die Cortex der gesamten Oozyte), ausgeschlossen werden. Diese bilden nach der Befruchtung einen Ring zwischen Eidotter und Keimscheibe. Genauer untersucht wurden die Ergebnisse durch *in situ* Hybridisierungen auf Ovarschnitten (Abb. D43 C). In sehr jungen Oocyten konnte *fah* im gesamten Zytoplasma der Oozyte identifiziert werden. Dies entspricht Stadium IA-IB der Oogenese, in der Maternalfaktoren in der gesamten Oozyte verteilt sind. Erst in späteren



Stadien werden die Maternalfaktoren in den verschiedenen Bereichen der Oozyte lokalisiert [Pelegri 2003]. Dafür spricht auch die Lokalisierung von *fah* in reiferen Oozyten an einer Polspitze. Ob es sich dabei um die animale oder vegetative Polspitze handelt, kann nicht festgestellt werden. Eine Doppel- *in situ* Hybridisierung mit einem animalen oder vegetativen Marker könnte Aufschluss über die genaue Lokalisierung von *fah* geben. Somit handelt es sich bei *fah* um Maternalfaktor der Klasse I oder II.



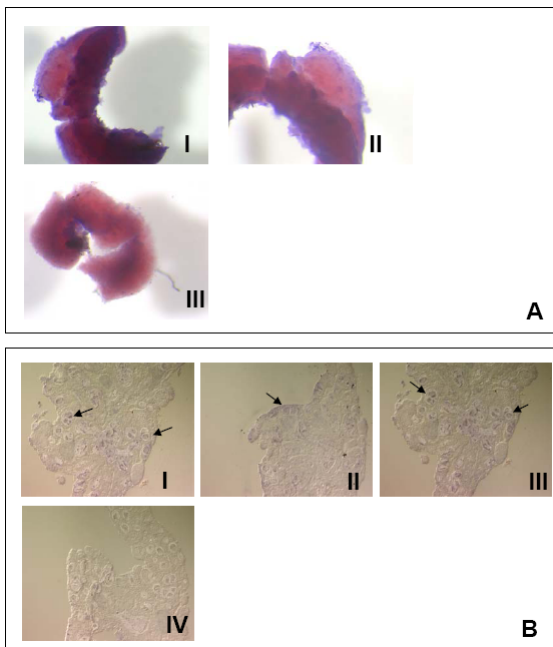
**Abb D43:** Whole mount *In situ* Hybridisierungen mit *fah* als Sonde auf unbefruchteten Ovar [A] und im befruchteten Ei, Stadium 1 [B] Schwarze Pfeile zeigen die angefärbten Bereiche [A I-III, B]. *In situ* Hybridisierung auf Ovar-Parafinschnitten mit *fah* als Sonde [C]. Schwarze Pfeile markieren Oocyten. Bilder I-IV Antisense Probe, Bild V Sense Kontrolle.

Offen bleibt auch die cDNA-Sequenz der *fah*-Isoform. Da mit der Primersequenz *fah*-F1/R1 keine Expression in frühen Oozyten nachgewiesen werden konnte, liegt der Unterschied zwischen den Isoformen in der 5'-Region des Gens. Die Sequenz ist mutmaßlich unterschiedlich zu der im Hoden exprimierten *fah*-Isoform, da die im Hoden exprimierte Isoform nicht im Ovar nachgewiesen wurde. In frühen Embryonen ist jedoch nur von der Oocyte synthetisierte maternale RNA exprimiert. Somit könnte es sich um eine dritte *fah*-Isoform handeln. Mittels 5'-RACE-PCR-Analyse mit embryonaler RNA könnte die cDNA Sequenz dieser Isoform ermittelt werden.

### 2.2.2.3 Lokalisierung der hodenspezifischen *fah*-Isoform *herrenfahrrad*

RT-PCR-Analysen und RACE-Analysen wiesen eine hodenspezifische *fah*-Isoform auf, die *herrenfahrrad* genannt wurde. Zur Lokalisierung der Expression dieser Isoform wurden whole mount *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Dazu wurde, wie schon zuvor beschrieben, das klonierte *fah*-RT-PCR-Produkt der Primerkombination: *fah*-F3/R3 aus Hoden als Sonde eingesetzt. *Fah*-Expression konnte in kleinen Bläschen in der äußeren

Hemisphäre des Hodens identifiziert werden (Abb. D44 A). Zur genaueren Lokalisierung wurden *in situ* Hybridisierungen auf Hodenschnitten durchgeführt. Eine Färbung konnte innerhalb globulärer Bläschen, am Rand der Hodenschnitte nachgewiesen werden (Abb. D44 B). *Xiphophorus maculatus* weist einen lobulären Hodentyp auf. Die Spermatogonese findet in lobulären Bläschen statt, die im äußeren Bereich des Hodens liegen. Die herangereiften Spermien werden in das Lobularlumen im Inneren des Hodens abgegeben und dort gespeichert [Nagahama 1983]. Bei der nachgewiesenen Färbung könnte es sich mutmaßlich um Spermatiden und/oder Spermatocyten in den Lobuli handeln. *Herrenfahrrad* könnte demnach in heranreifenden Spermien exprimiert sein. Eine eindeutige Zuordnung ist jedoch nicht möglich. Eine Doppel-*In-situ*-Hybridisierung mit Spermatogonosemarkern könnte für eine genauere Lokalisierung der Expression hilfreich sein.



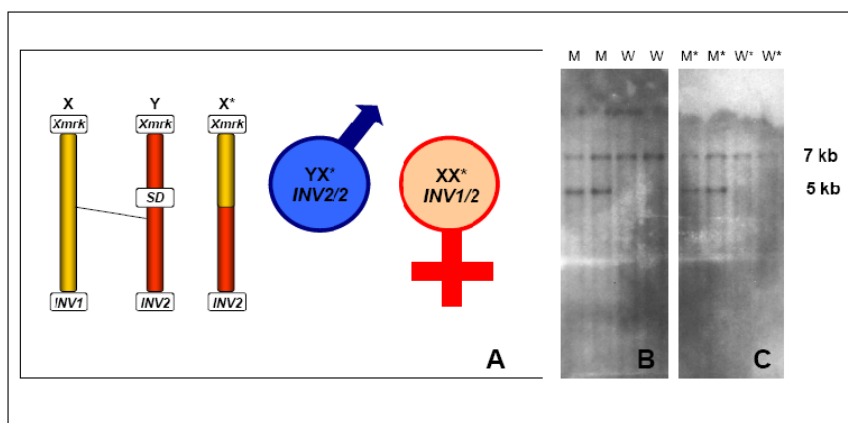
**Abb D44:** Whole Mount *In situ* Hybridisierungen mit *fah* als Sonde auf Hodengewebe. Bilder I-II Antisense Probe, Bild III Sense-Kontrolle [A]. *In situ* Hybridisierung auf Hoden-Parafinschnitten mit *fah* als Sonde. Bilder I-III Antisense Probe, Bild IV Sense Kontrolle [B].

#### 2.2.2.4 Genomische Lokalisierung von *fah* in der Geschlechtsbestimmenden Region

Aufgrund der Expressionsanalysen und RACE-Analyse konnte eine Hoden-spezifische Isoform von *fah*, *herrenfahrrad* identifiziert werden. Diese macht *fah* zu einem Kandidaten für den Geschlechtsbestimmenden Locus. *Fah* wurde daher genauer in der Geschlechtsbestimmenden Region lokalisiert. Das *fah*-PCR-Produkt (AA12) wurde als Sonde auf genomischer DNA rekombinanter *Xiphophorus maculatus* Männchen und Weibchen hybridisiert. Diese Individuen besitzen ein rekombinantes X Chromosom (Abb. D45 A), das Sequenzanteile des X und des Y Chromosoms aufweist (das *Xmrk*-Allel stammt vom X Chromosom, das *egfrb*-Allel jedoch vom Y Chromosom). Der Bruchpunkt des genomischen



Austausches ist in der Geschlechtsbestimmenden Region lokalisiert, konnte bisher aber noch nicht exakt bestimmt werden. Der Geschlechtsbestimmende Locus ist von der chromosomalen Umordnung nicht betroffen. Daher ist dieser nicht auf dem rekombinanten X lokalisiert. Rekombinante Weibchen besitzen ein 'normales' und ein rekombinantes X Chromosom (XX\*), während rekombinante Männchen neben dem Y Chromosom ein rekombinantes X Chromosom besitzen (YX\*). Untersuchungen machen nur mit genomischen Markern (z.B. Genkandidaten) Sinn, die eine Y-spezifische RFLP-Bande aufweisen. Wird diese Y-spezifische Bande in einem rekombinanten Weibchen nachgewiesen, befindet sich der Genkandidat näher am Centromer. Das Gen kann als Kandidat für den Geschlechtsbestimmungslocus ausgeschlossen werden. Ist die Y-spezifische Bande nicht im rekombinanten Weibchen feststellbar, handelt es sich um ein Gen stromaufwärts des Geschlechtsbestimmenden Locus oder um den Geschlechtsbestimmungslocus selber.



**Abb D45:** Schematische Darstellung zur Entstehung rekombinanten X\* Chromosoms (gelb/orange), das aus Sequenzanteilen des X (gelb) und Y Chromosoms (orange) besteht. Der Geschlechtsbestimmende Locus (*SD*) ist nicht betroffen. Rekombinante Männchen (M\*) sind X\*Y, rekombinante Weibchen X\*X [A]. Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf genomischer *Xiphophorus maculatus* DNA (Männchen M und Weibchen W [B], sowie auf rekombinanten Männchen M\* und rekombinanten Weibchen W\* [C]) *Hind*III verdaut.

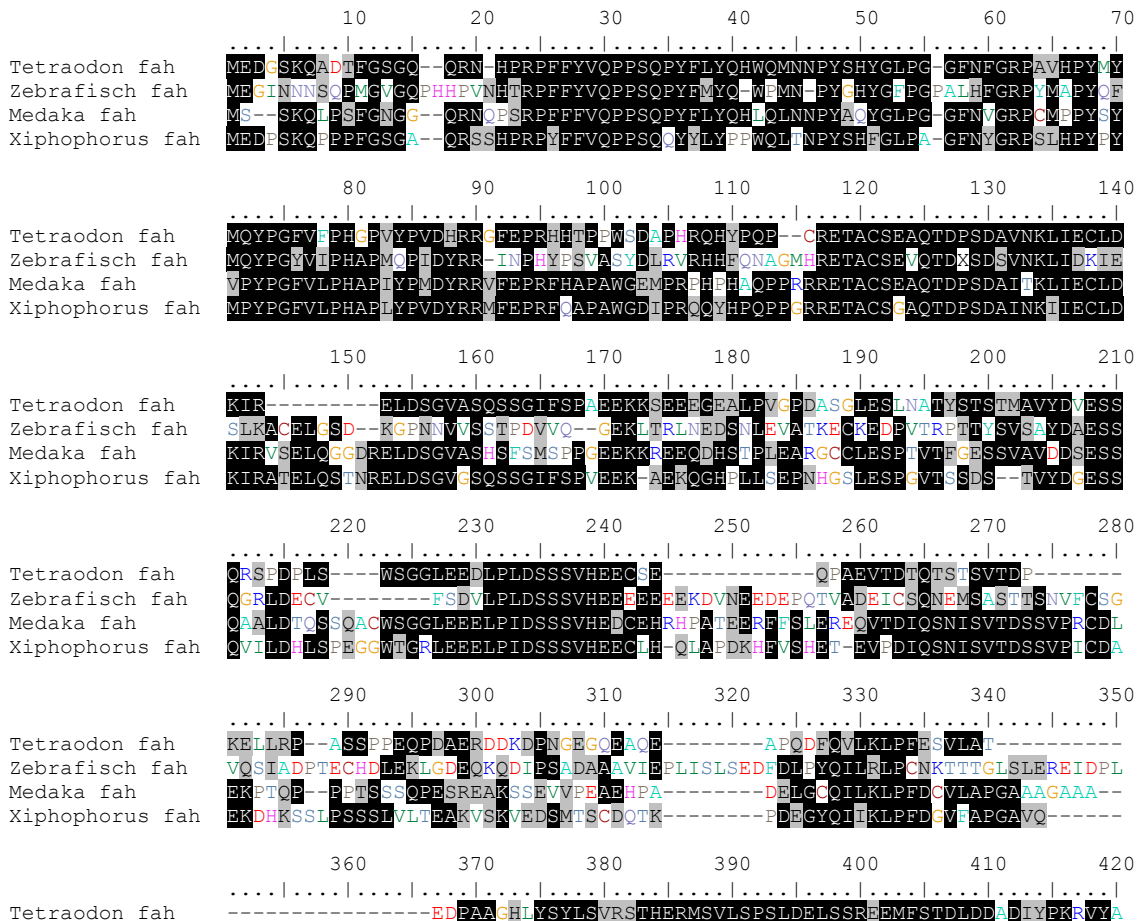
Für *fah* konnte im *Hind*III-Verdau bei Wildtyp-Individuen eine Y-spezifische 5 kb Bande identifiziert werden. Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen wurden mit *fah* als Sonde auf genomischer DNA rekombinanter *Xiphophorus maculatus* Männchen und Weibchen durchgeführt (Abb. D45 B, C). Die Y-spezifische 5 kb große Bande konnte nur in Männchen nicht aber in rekombinanten Weibchen identifiziert werden. Somit bleibt *fah* ein Kandidat für den geschlechtsbestimmenden Locus.

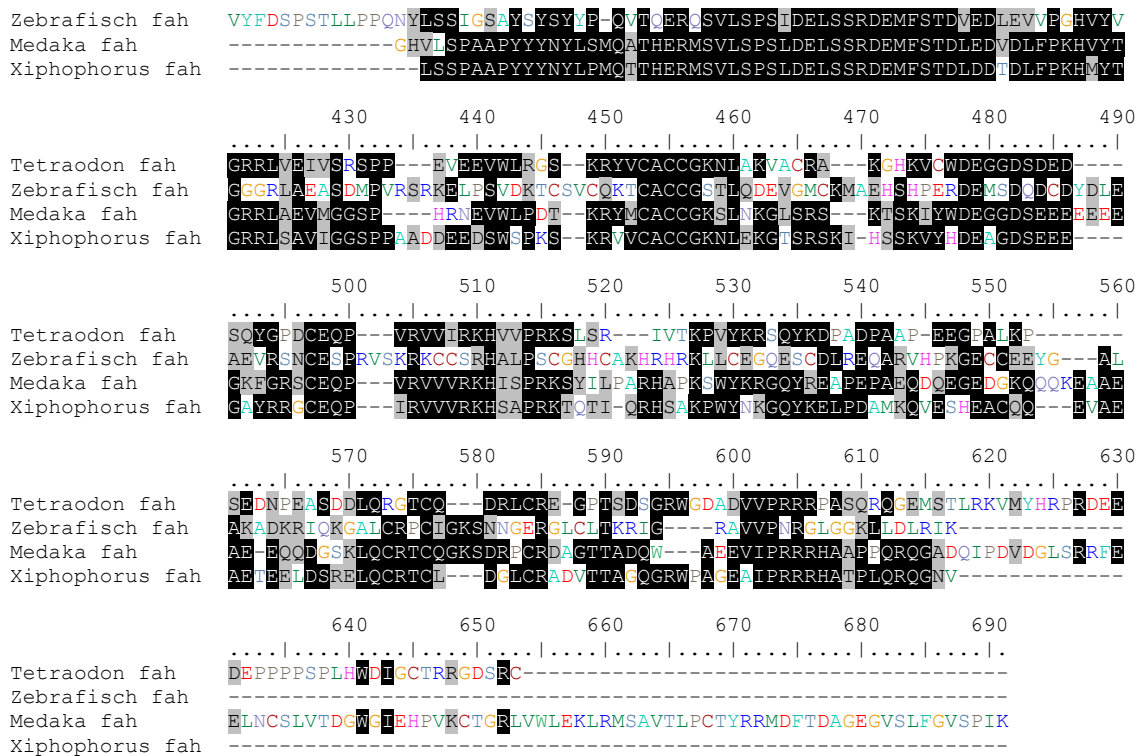
### 2.2.2.5 *Fah*-Orthologe in anderen Fischarten

Datenbankanalysen (Blast bei NCBI, Ensemble, TIGR) wiesen *fah* in Fischarten nach, die Objekte laufender Genomprojekte sind. Wie in Tabelle D8 und Abb. D46 zu sehen, konnten orthologe *fah*-Sequenzen in den Pufferfischen *Tetraodon* und *Fugu*, sowie in Medaka, Zebrafisch und Stichling nachgewiesen werden. Für Fischarten, in denen EST- (expressed sequence tag – exprimierte Sequenzen) Daten vorliegen, konnten orthologe Sequenzen zu *fah* in der Regenbogenforelle (Zugangsnummer: TC 1333565), im Katzenfisch (Zugangsnummer: z.B. BX 85776) sowie bei *P. promelas* (Zugangsnummer: TC 3962) identifiziert werden.

**Tabelle D8:** *fah* in verschiedenen Fischarten

Fischart	Zugangsnummer	Protein	Genomisch lokalisiert	EST Zugangsnummer
	Gen	Protein		
Tetraodon	CR680907	CAF98727	scaffold 14565	
Fugu			scaffold_96	
Medaka		UTOLAPRE05100115054	scaffold 103_Contig 49136, Chromosom 20	OLd57.08b
Zebrafisch	XM_683787	XP_688879	Chromosom 2	z.B. EG572306
Stichling	ENSGACESTT000000168476	ENSGACERSTP00000016846	Group XXI, Contig_12648	CD503062





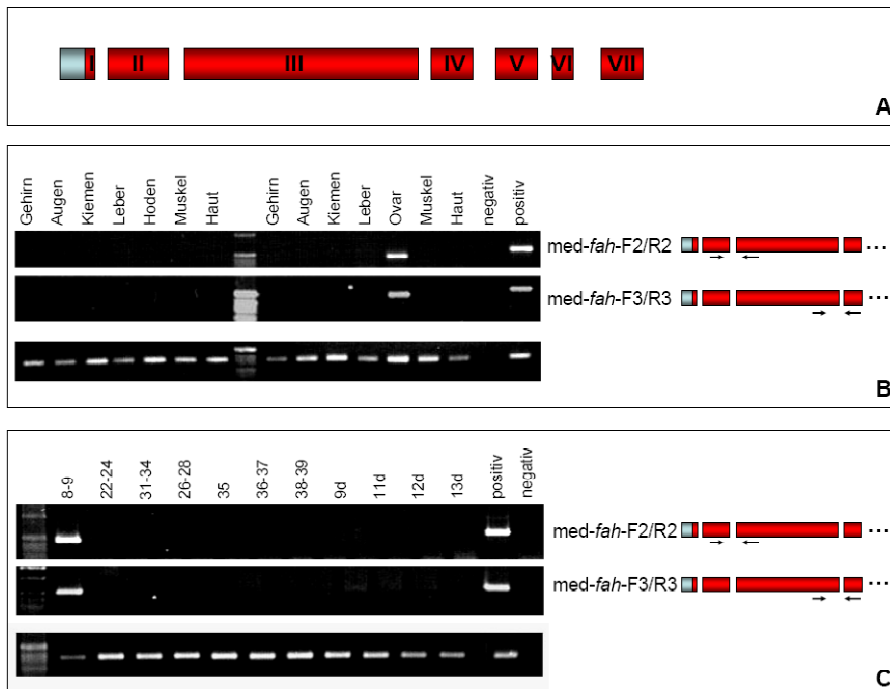
**Abb. D46:** Proteinsequenzvergleich von Fah aus verschiedenen Fischarten (Erklärung siehe Text).

### 2.2.2.6 Fah in Medaka: Identifizierung und Expressionsanalysen

Mittels Datenbankanalyse (Blast: Ensembl) konnte *fah* in Medaka identifiziert werden. Es ist auf Chromosom 20 (Scaffold 103 Contig 49136) lokalisiert. Die genomische Struktur (Intron/Exon Grenzen) wurde mittels Sequenzalignment (bl2sq) rekonstruiert. Hilfreich war die Identifizierung eines cDNA-Klons (Zugangsnummer: Old57.08b). Dieser stammt aus dem Ovar und deckt die 5' Region und UTR (untranslated region – nicht translatierter Bereich) des Gens ab. Die 3'-Region von *fah* konnte durch RACE-PCR-Analysen vervollständigt werden. Später konnte die genomische Struktur durch Sequenzierung der RT-PCR Produkte bestätigt werden. Medaka-*fah* besteht aus 7 Exons (Abb. D47 A).

Mittels der Nukleotidsequenz und der Intron/Exon Struktur konnten Primer für Expressionsanalysen konstruiert werden. Abb. D47 B, C zeigen die Ergebnisse der Expressionsanalysen in Medaka. Zwei Primerkombinationen, *med-fah-F2/R2* und *med-fah-F3/R3*, wurden verwendet. Die erste Primerkombination (*med-fah-F2/R2*) amplifiziert den 5' Bereich des Gens, während die zweite Primerkombination (*med-fah-F3/R3*) den hinteren Teil des Gens amplifiziert. Beide Primerkombinationen weisen eine identische Expression auf. Im adulten Gewebe konnte eine Expression im Ovar festgestellt werden. In Embryonen wurde eine Expression ausschließlich in Stadium 8-9 identifiziert. Somit handelt es sich bei

Medaka-*fah* um einen Maternalfaktor, der nur zu Beginn der Embryonalentwicklung in frühen Embryonalstadien eine Rolle zu spielen scheint.



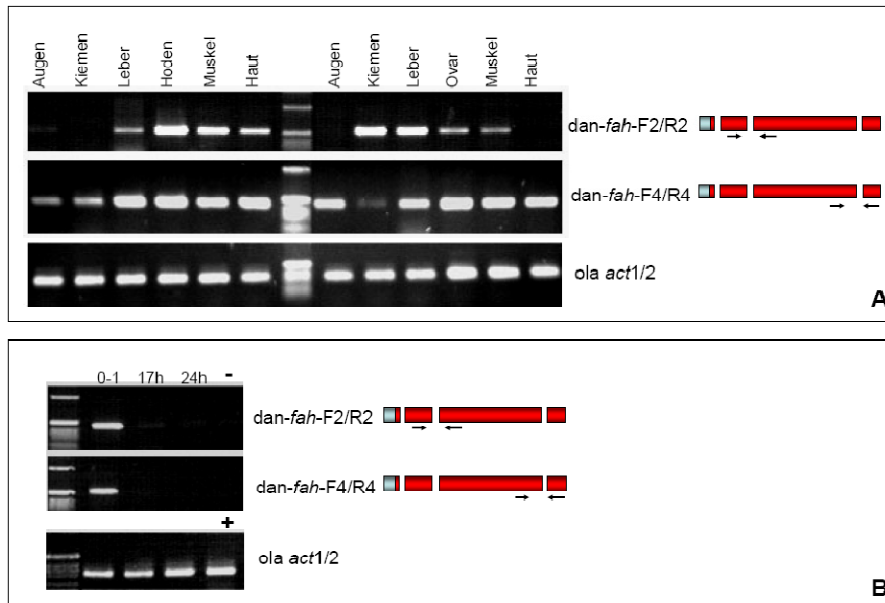
**Abb. D47:** Schematische Darstellung der genomischen Struktur von *Medaka-fah*, hellblauer Kasten ist das 5'-UTR, rote Kästen stellen die Exons I-VII dar [A]. RT-PCR-Expressionsanalysen von *Medaka-fah* auf verschiedenen Geweben [B] und verschiedenen Embryonalstadien [C]. Schwarze Pfeile an der schematischen Darstellung von *Medaka-fah* stellen die Primeransatzstellen dar. cDNA-Abgleich durch Aktin-PCR [B, C].

### 2.2.2.7 *Fah* in Zebrafisch, Identifizierung und Expressionsanalysen

Eine orthologe Sequenz zu *Xiphophorus-fah* kann in Zebrafisch unter der Zugangsnummer XM\_683787 aus der NCBI-Blast Datenbank gezogen werden. Bestätigt wurde die Sequenz durch Zusammensetzen überlappender EST-Sequenzen (NCBI Zebrafisch Blast EST). Zebrafisch-*fah* ist auf Chromosom 2 lokalisiert. Die Expression wurde mittels RT-PCR-Analysen auf adulten Geweben und verschiedenen Embryonalstadien untersucht. Wie zuvor bei Medaka wurden auch für Zebrafisch-*fah* zwei Primerkombinationen getestet. Die eine amplifiziert den vorderen Bereich (*danio-fah-F2/R2*) während die andere den hinteren Bereich (*danio-fah-F4/R4*) des Gens amplifiziert (Abb. D48 A, B).

In Embryonen ist Zebrafisch-*fah* mit beiden Primerkombinationen nur in Stadium I exprimiert. Somit handelt es sich auch bei Zebrafisch-*fah* um einen Maternalfaktor. Im adulten Gewebe konnten zwischen beiden Primerkombinationen Unterschiede festgestellt werden. Dies deutet auf zwei Isoformen von Zebrafisch-*fah* hin. Mit der Primerkombination *danio-fah-F4/R4* konnte in jedem getesteten Gewebe eine Expression nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu weisen Expressionsanalysen mit der Primerkombination *danio-fah-F2/R2* keine Expression in Augen auf. Handelt es sich um unterschiedliche Spleißvarianten

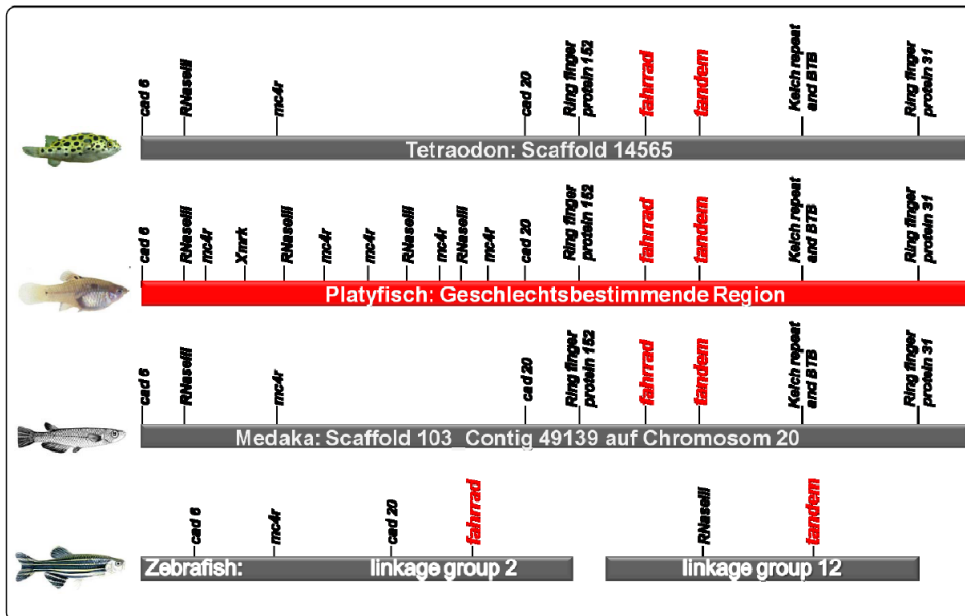
liegt der Unterschied zwischen beiden Isoformen im 5'-Bereich des Gens, da die Primerkombination *danio-fah-F2/R2* den vorderen Bereich des Gens amplifiziert. Vermutlich hängen die Unterschiede in der Expression jedoch mit der Qualität der cDNA zusammen.



**Abb. D48:** RT-PCR-Expressionanalysen im Zebrafisch auf verschiedenen Geweben [A] und verschiedenen Embryonalstadien [B]. Schwarze Pfeile an der schematischen Darstellung (hellblauer Kasten: 5'-UTR-Region, rote Kästen: Exons) von Zebrafisch-*fah* stellen die Primeransatzstellen dar. cDNA-Abgleich mit Aktin-PCR (Primer *ola-act1/2*).

### 2.2.2.8 Genomische Umgebung von *fah* in verschiedenen Fischarten, Identifizierung von Genkandidaten

Die genomische Umgebung von *fah* wurde in *Tetraodon* (Scaffold 14565) und Medaka (Chromosom 20, Scaffold 103 Contig 49136) untersucht und mit der Geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus* verglichen (Blast Analysen). Interessanterweise sind die verschiedenen genomischen Regionen untereinander sehr syntenisch (Abb. D49). In Zebrafisch kann dieser syntenische Bereich auf zwei unterschiedlichen Kopplungsgruppen (Kopplungsgruppe 2 und 12) identifiziert werden. Wie Tabelle D7 zeigt, konnte eine Reihe von Genkandidaten in dieser Region identifiziert werden. In den folgenden Kapiteln wird ein Genkandidat beschrieben, der mit *fah* verwandt ist und in den meisten Fischarten mit *fah* gekoppelt ist.

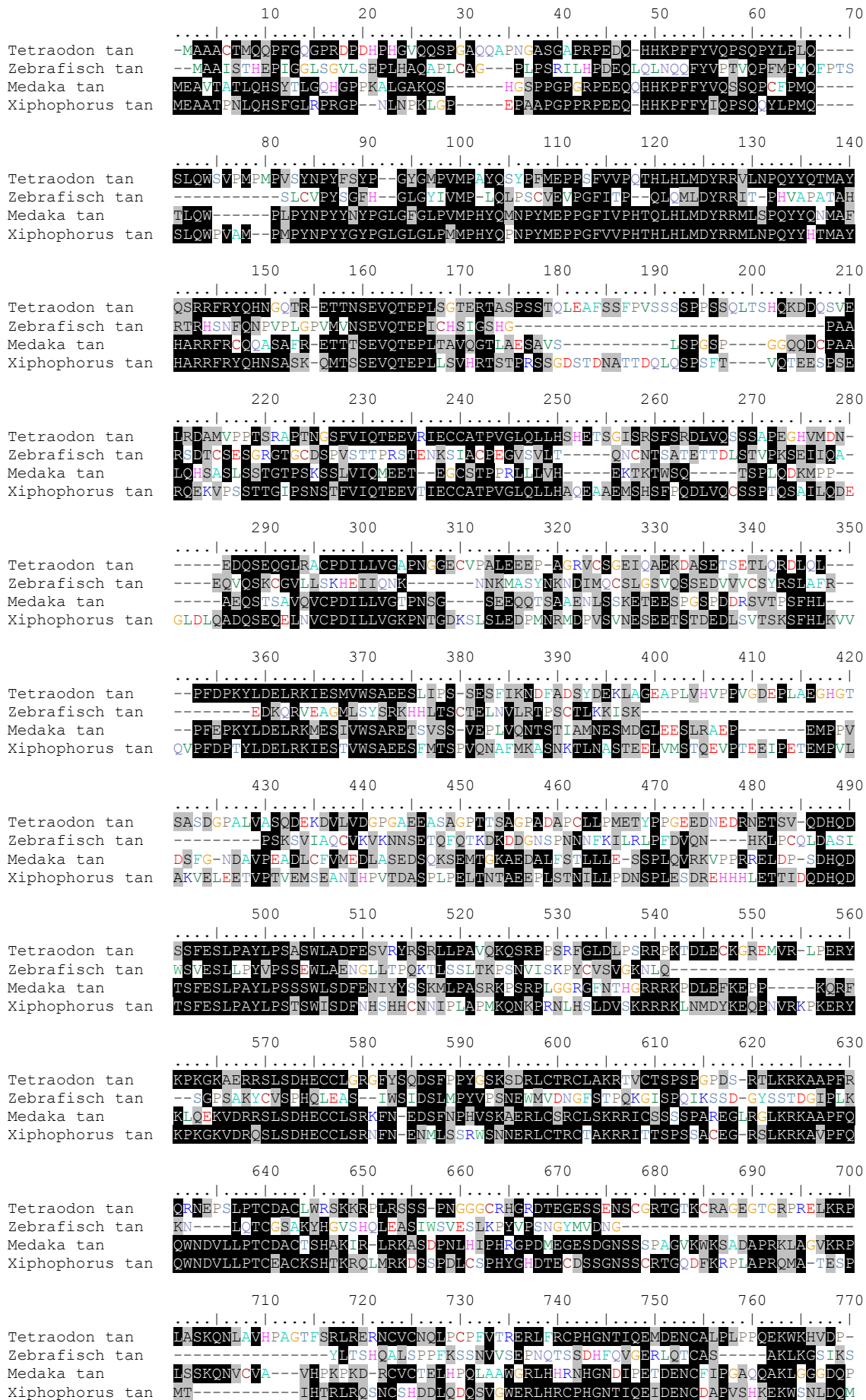


**Abb. D49:** Schematische Darstellung genomischer Regionen mit Genkandidaten in verschiedenen Fischarten, die syntensisch zur Geschlechtsbestimmungsregion von *Xiphophorus maculatus* ist.

### 2.2.3 *Tan*, ein zu *fah* verwandter und gekoppelter Genkandidat

In unmittelbarer genomischer Nähe von *fah* konnte in *Tetraodon* (Zugangsnummer: CAF98726) und Medaka ein weiteres mit *fah* verwandtes Gen identifiziert werden. Dieses Gen wurde *tan* (Tandem) genannt. *Fah* und *tan* besitzen untereinander in der Nukleotidsequenz kaum Sequenzübereinstimmung, dafür aber im N-Terminus der Aminosäuresequenz (Abb. D50/51). *Tan* konnte auch in Zebrafisch nachgewiesen werden (Zugangsnummer: CAF98726). Dort liegen *fah* und *tan* auf unterschiedlichen Kopplungsgruppen (Kapitel 2.2.3.3). Ist *tan* auch in *Xiphophorus maculatus* zu finden? Dazu wurde Medaka-*tan*, als Sonde für Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf Klonen der Geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus* eingesetzt. *Tan* konnte in den gleichen Klonen identifiziert werden, die auch *fah* enthalten (Abb. D52). Somit wurde *tan* in der geschlechtsbestimmenden Region auf dem X und Y Chromosom in *Xiphophorus maculatus* nachgewiesen.

Gibt es Unterschiede zwischen X und Y chromosomalen Allelen? Dazu wurden die X und Y chromosomalen *Xiphophorus maculatus tan*-Allele mittels Transposonmutagenese sequenziert. Komplettiert wurden die *tan*-Allel-Sequenzen mit dem Erhalt der Sequenzen der X und Y chromosomalen Klone (W2 und AB1, sequenziert durch GENOSCOPE). Zwischen beiden Allelen konnte kein Unterschied identifiziert werden. Durch die komplette Sequenz von W2 (X-Chromosom) und AB1 (Y-Chromosom) wurde offensichtlich, dass *tan* in unmittelbarer genomischer Nähe von *fah* liegt, etwa 5 kb voneinander getrennt.





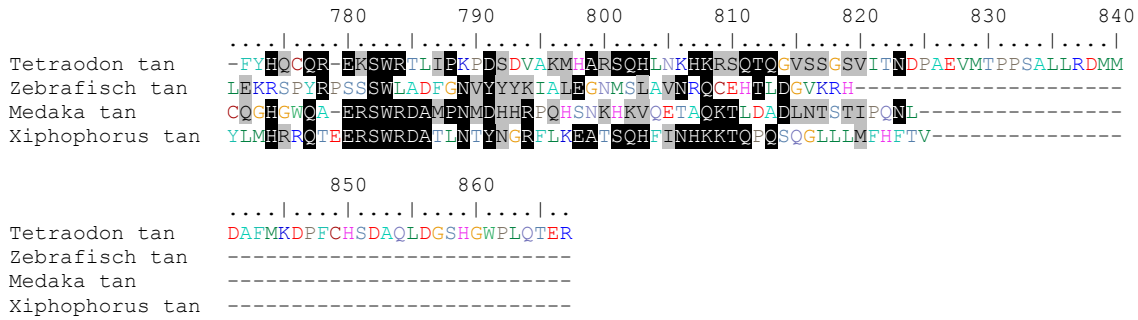
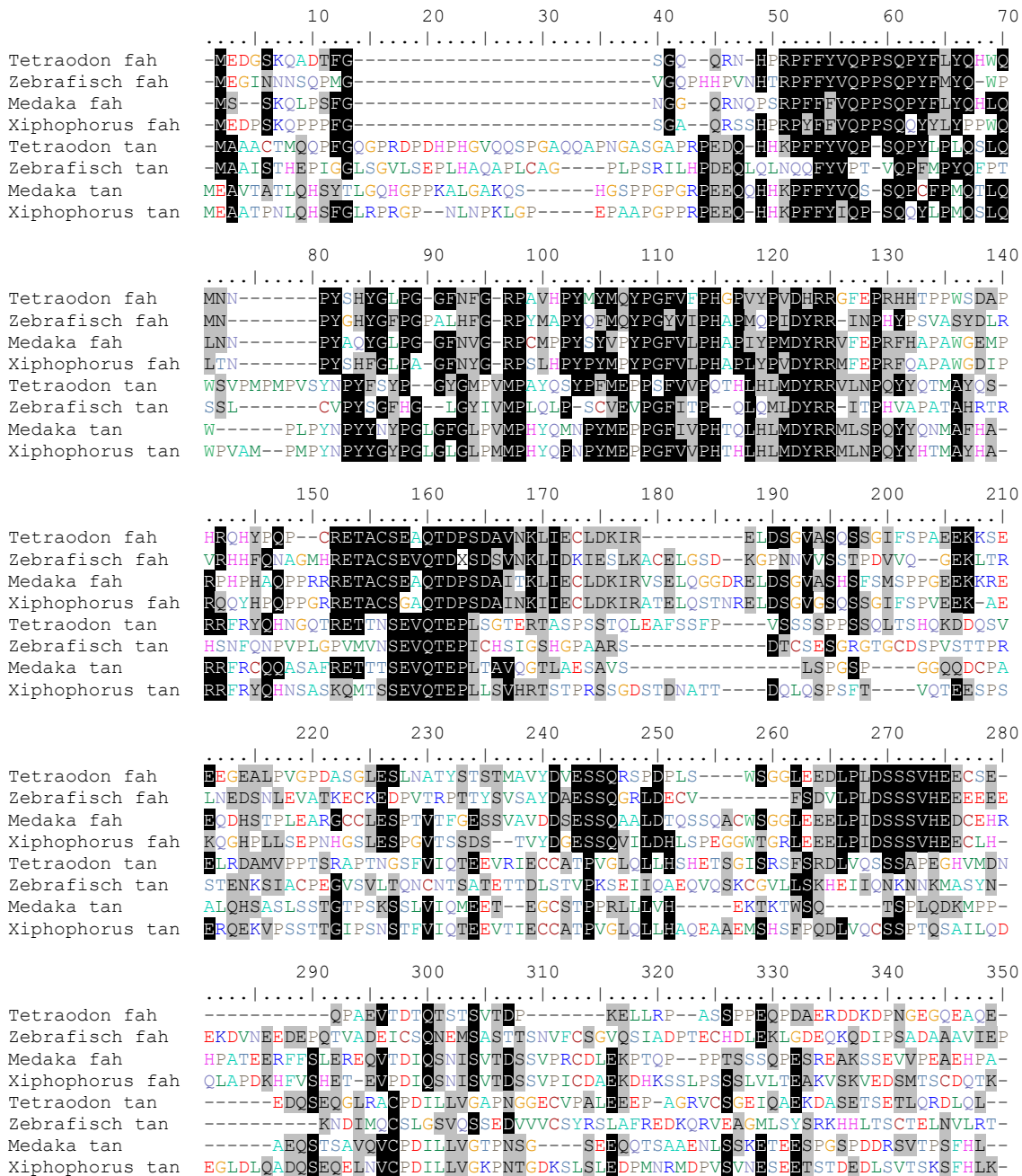


Abb. D50: Protein-Sequenzvergleich von Fah aus verschiedenen Fischarten.



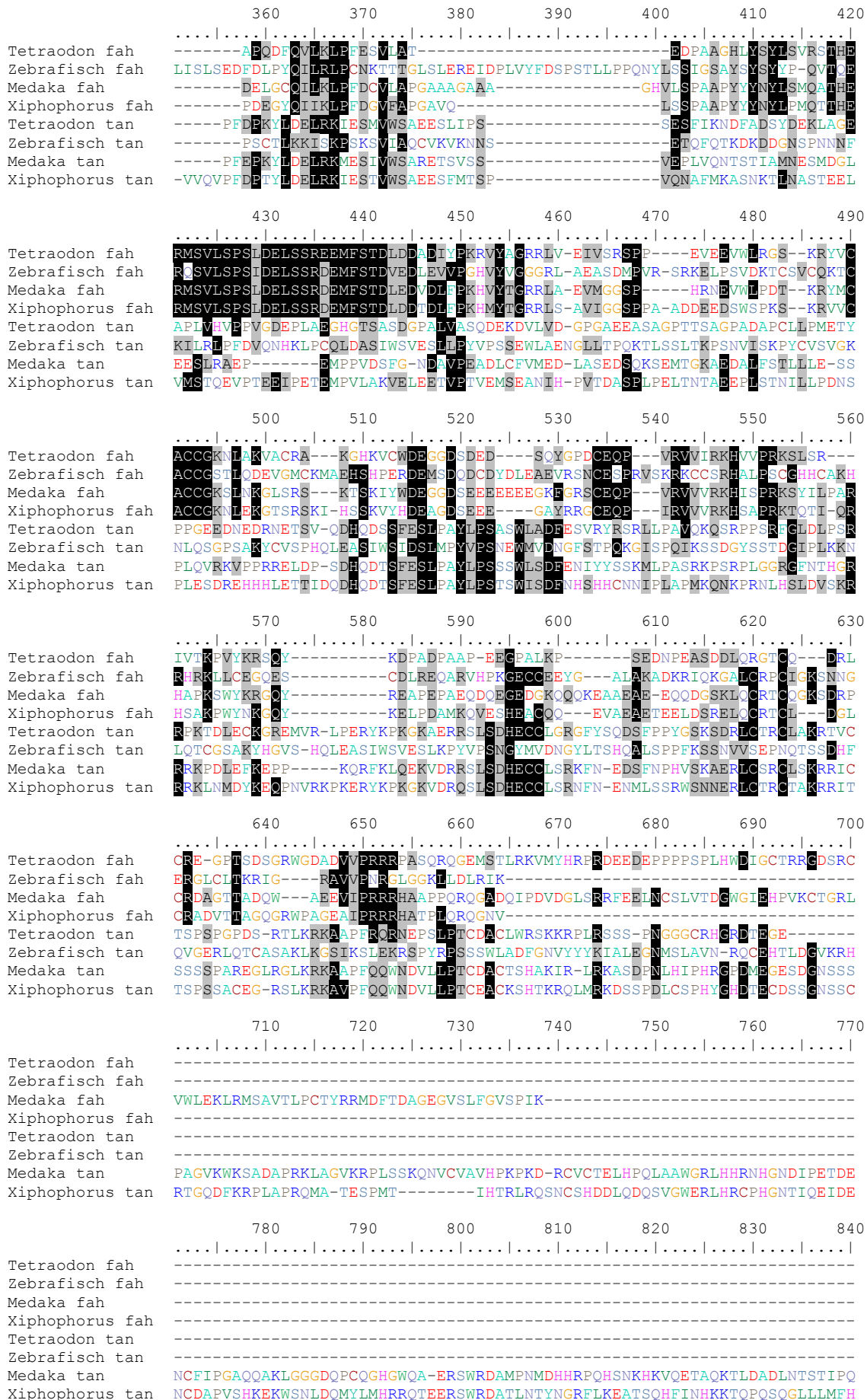
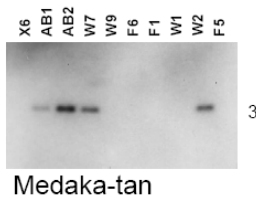


Abb. D51: Proteinsequenzvergleich von Fah und Tan aus verschiedenen Fischarten.

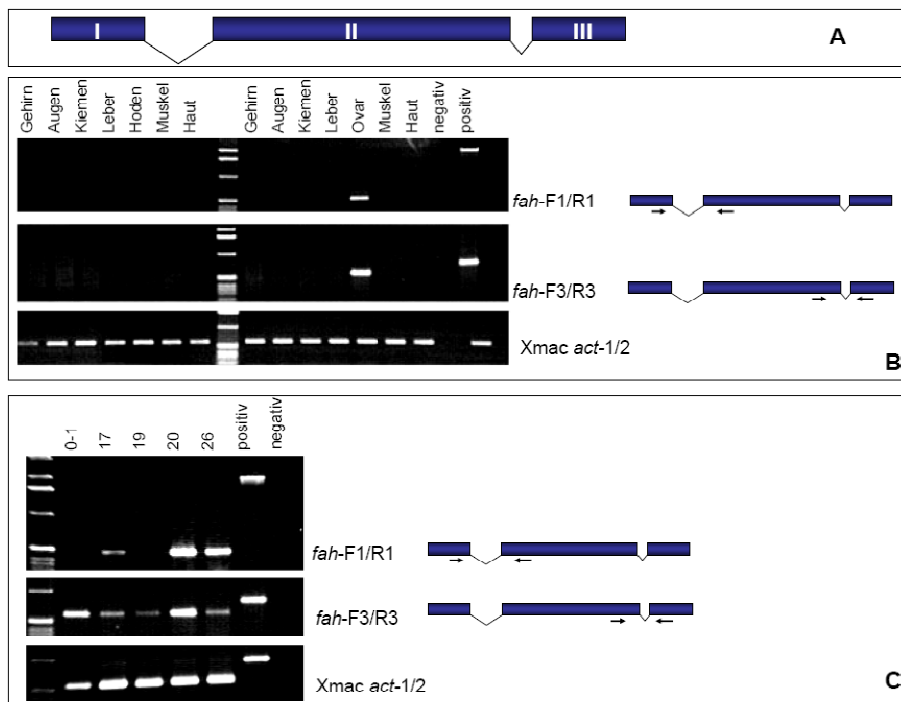


**Abb. D52:** Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen auf verschiedenen BAC-Klonen der Geschlechtsbestimmenden Region *Hind*III verdaut. Eingesetzte Sonde: *tan* (kloniertes RT-PCR-Produkt aus Medaka)

### 2.2.3.1 Expressionsanalysen von *tan* in *Xiphophorus maculatus*

Mittels *in silico*-Analysen (bl2seq bei NCBI mit *Medaka-tan* und *Tetraodon-tan*, Genscan bei MIT) konnte die genomische Struktur (Intron/Exon Grenzen) von *Xiphophorus maculatus-tan* rekonstruiert werden. *Tan* besteht aus drei Exons (Abb. D53 A). Zur Expressionsanalyse durch RT-PCR wurden Primer in den vorderen Bereich (*Xmac-tan-F1/R1*) und den hinteren Bereich (*Xmac-tan-F2/R2*) des Gens konstruiert. Die PCR-Bedingungen wurden auf genomischer DNA optimiert. Dem Testexperiment schlossen sich RT-PCR-Analysen auf cDNA unterschiedlicher adulter Gewebe sowie verschiedener Embryonalstadien an (Abb. D53 B, C).

Mit beiden Primerkombinationen wurde eine Expression ausschließlich im Ovar identifiziert. In Embryonalstadien hingegen zeigt *tan* das gleiche Expressionsmuster wie *fah*. Die Primerkombination *Xmac-tan-F1/R1* zeigt Expression in Stadium 17 und ab Stadium 20, während *tan* mit der Primerkombination *Xmac-tan-F2/R2* durchgehend ab Stadium 1 exprimiert ist. Demnach scheint es auch für *tan* zwei Isoformen in Embryonen zu geben. Der Unterschied zwischen beiden Isoformen liegt auch hier im 5'-Bereich des Gens, da mit der Primerkombination *Xmac-tan-F1/R1* keine Expression im frühen Embryostadium nachgewiesen werden konnte. Mittels 5'-RACE Analyse ließe sich die Sequenz der mutmaßlichen Isoformen aufklären.



**Abb. D53:** Schematische Darstellung der genomischen Struktur von *Xiphophorus-tan*. Blaue Kästen stellen die Exons I-III dar [A]. RT-PCR-Expressionsanalysen auf verschiedenen Geweben [B] und verschiedenen Embryonalstadien [C]. Schwarze Pfeile unter der schematischen Darstellung von *tan* symbolisieren die Primeransatzstellen. cDNA-Abgleich durch Aktin-PCR (Primerkombination (Xmac act-1/2)).

Die frühe Expression der Isoform, amplifiziert durch Xmac-*tan*-F2/R2 im Embryo, weist auf einen Maternalfaktor hin. Wie in Kapitel D2.2.2.1, beschrieben gibt es verschiedene Klassen von Maternalfaktoren. Welcher Klasse von Maternalfaktoren könnte *tan* angehören? Dazu wurden *in situ* Hybridisierungen auf Ovar-Schnitten durchgeführt. Das klonierte RT-PCR-Produkt aus dem Ovar (Primerkombination Xmac-*tan*-F2/R2) wurde als Sonde eingesetzt. In jüngeren Oozyten kann *tan* im kompletten Zytoplasma nachgewiesen werden. Lediglich der Zellkern ist von der Färbung ausgenommen (Abb. D54). In größeren Oozyten lagert sich das Signal an einem Pol an. Ob es sich dabei um den animalen oder vegetativen Pol handelt, kann nicht genau bestimmt werden. Somit könnte es sich bei *tan* ebenso wie bei *fah* um einen Maternalfaktor des Typs I oder II handeln. Doppel *in situ* Hybridisierungen mit animalen oder vegetativen Markern könnten Aufschluss über die Lokalisierung von *tan* geben.



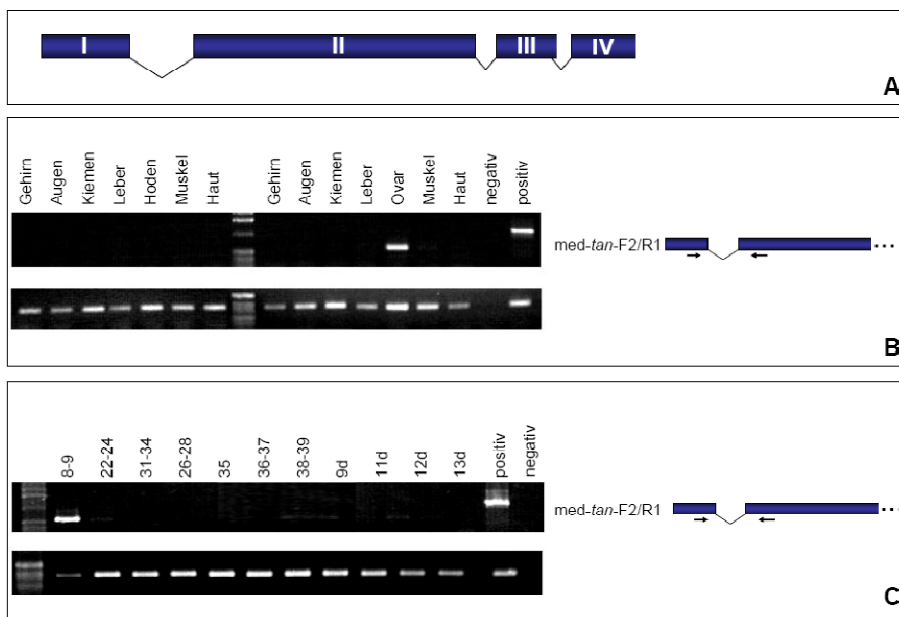
**Abb. D54:** *In situ*-Hybridisierungen auf Ovar-Parafinschnitten. Pfeile zeigen auf die Oocyten. Bild I-II Antisense-Probe, Bild III Antisense Probe.

### 2.2.3.2 Medaka-*tan*, Datenbank- und Expressionsanalysen

Medaka-*tan* konnte wie auch Medaka-*fah* auf Chromosom 20 (Scaffold 103 Contig 49136) nachgewiesen werden. Die genomische Struktur wurde mittels Datenbankanalysen (bl2seq bei

NCBI mit Tetraodon-*tan*, Zugangsnummer: CAF98726, Genscan bei MIT) und 3'-RACE (rapid amplification of cDNA-ends) ermittelt. Später konnte die rekonstruierte genomische Struktur durch Sequenzdatenvergleich mit den sequenzierten RT-PCR-Produkten bestätigt werden. Im Gegensatz zu Tetraodon oder *Xiphophorus maculatus* besitzt Medaka-*tan* 4 Exons (Abb. D55 A).

Mit Hilfe der genomischen Struktur wurden Primer konstruiert, die die vorderen Bereiche des Gens abdecken (Abb. D55 B, C). Die Primerkombination wurde auf genomischer DNA getestet und anschließend für Expressionsanalysen auf cDNA verschiedener Gewebe und unterschiedlicher Embryonalstadien eingesetzt. Medaka-*tan* weist in RT-PCR-Analysen (Abb. D55 B, C) die identische Expression wie Medaka-*fah* auf. Es ist im Embryo ausschließlich in Stadium 1 exprimiert, während in adulten Fischen eine Expression nur im Ovar nachgewiesen werden kann.



**Abb. D55:** Schematische Darstellung der genomischen Struktur von Medaka-*tan*. Blaue Kästen stellen die Exons I-IV dar [A]. RT-PCR-Expressionsanalysen auf verschiedenen Geweben [B] und verschiedenen Embryonalstadien [C]. Schwarze Pfeile unter der schematischen Darstellung von *tan* symbolisieren die Primeransatzstellen. cDNA-Abgleich durch Aktin-PCR.

Durch Datenbankanalysen (Ensemble Blast) konnte ein potentielles Genprodukt des Medaka-Genom-Projekts identifiziert (UTOLAPRE05100115054) werden. Dieses potentielle Gen beinhaltet, neben verschiedenen weiteren Exons, die Exons von *fah* und *tan*. Ist *fah* und *tan* in Medaka ein zusammengesetztes Gen? Zur Klärung der Frage wurde das 3'-Ende von Medaka-*fah* mittels RACE-PCR amplifiziert, kloniert und anschließend sequenziert. Das vom Medaka-Genom-Projekt vorausgesagte Gen konnte nicht nachgewiesen werden. Die 3'-Region des Gens entspricht jener zuvor beschriebenen Rekonstruktion (Abb. D55 A). Somit

handelt es sich bei *Medaka-fah* und *Medaka-tan*, wie auch in anderen Fischarten, um zwei unterschiedliche Gene. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses könnten RT-PCR-Analysen durchgeführt werden. Dazu müssten Primer konstruiert werden, die in Exon IV von *Medaka-fah* (Forward-Primer) und Exon I von *Medaka-tan* (Reverse-Primer) liegen. Die Primerkombination würde auf cDNA von Ovar eingesetzt. Würde ein PCR-Produkt amplifiziert, handelte es sich um ein zusammengesetztes Gen.

### 2.2.3.3 Ist *tan* auch ein Zebrafisch-Gen?

In anderen Fischarten wie *Medaka*, *Tetraodon* und *Xiphophorus maculatus* konnte in unmittelbarer genomischer Nachbarschaft von *fah tan*, das mit *fah* verwandte Gen identifiziert werden. Zebrafisch-*fah* wurde auf Chromosom 2 nachgewiesen, wie Datenbankanalysen im zusammengesetzten Zebrafisch-Genomprojekt *Zv6* (Zebrafish assembly Version 6 – Zebrafisch Zusammenbau Version 6 bei Ensemble) zeigen konnten. Eine orthologe Sequenz zu *tan* konnte weder in der Umgebung von Zebrafisch-*fah* noch auf anderen Chromosomen im Zebrafisch identifiziert werden. Ist *tan* überhaupt im Zebrafisch Genom vorhanden? Datenbankanalysen auf einer früheren Version des zusammengesetzten Zebrafisch Genom-Projekts *Zv4* (Zebrafish assembly version 4) wiesen eine orthologe *tan*-Sequenz auf Chromosom 1 nach. Darüber hinaus konnten eine Reihe von orthologen EST-Sequenzen identifiziert werden. Diese Ergebnisse lieferten erste Hinweise auf *tan* in Zebrafisch. Mit Hilfe von Datenbankanalysen (bl2sq mit *Tetraodon-tan* Zugangsnummer: CAF98726, und *Medaka-tan*, bei NCBI, Genscan bei MIT) und den EST-Sequenzen wurde die genomische Struktur ermittelt. Zebrafisch-*tan* besteht mutmaßlich aus drei Exons. Durch die genomische Struktur wurden Primer konstruiert, die den vorderen Bereich (*danio-tan-F1/R2*) und den hinteren Bereich (*danio-tan-F3/R3*) des hypothetischen Gens amplifizieren. PCR-Analysen auf genomischer Zebrafisch-DNA wiesen *tan* experimentell im Zebrafisch-Genom nach. Bestätigt wurde das Ergebnis zur RT-PCR Analysen auf cDNA von verschiedenen Geweben. Die RT-PCR-Produkte aus Ovar und Testis (Primerkombination *danio-tan-F1/R2*) wurden kloniert und sequenziert. Sequenzdatenvergleiche wiesen die vorausgesagte Struktur nach (Abb. D56 A, B).

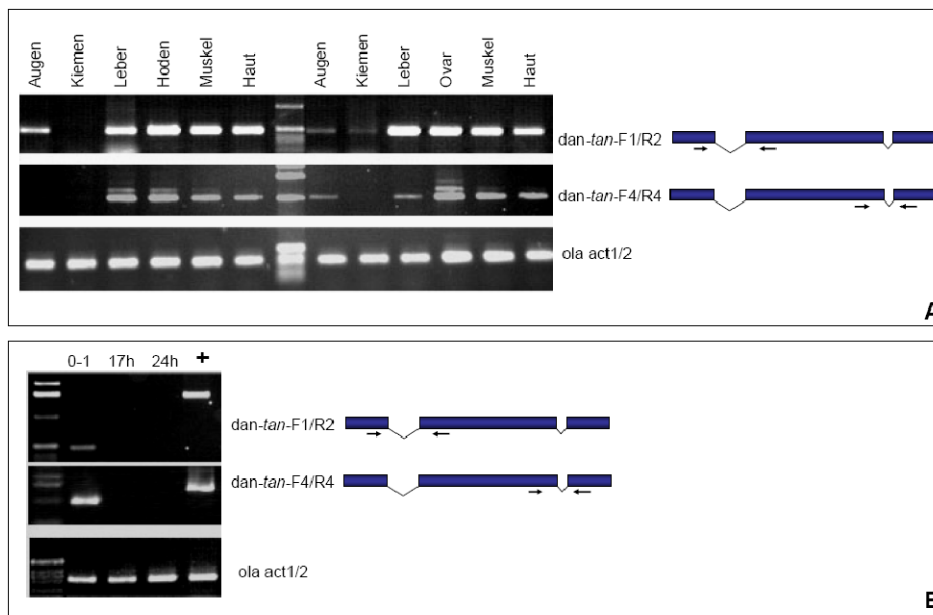
Auf welchem Chromosom ist *tan* im Zebrafisch lokalisiert? *Tan* konnte lediglich im Zebrafisch-Genomprojekt-Zusammenbau *Zv4* nachgewiesen werden. In späteren Versionen (*Zv5* bzw. *Zv6*) kann Zebrafisch-*tan* nicht mehr identifiziert werden. Die Lokalisierung von Zebrafisch-*tan* mit Hilfe von Datenbankanalysen ist somit nicht möglich. Ein experimenteller Ansatz zur Lokalisierung von Genen im Zebrafisch-Genom stellt der Radiation-Hybrid-Panel LN54 dar. Dabei werden PCR-Analysen auf Zebrafisch-Maus-Hybriden durchgeführt. Jeder



der 93 Zellhybriden besteht aus einem definierten Genomabschnitt [Hukriede et al.; 1999]. Das Gelmuster der PCR-Produkte gibt dann Aufschluss über die Lokalisierung des getesteten Gens. Als Test wurde zunächst Zebrafisch-*fah* lokalisiert. Es konnte auf der Kopplungsgruppe 2 nachgewiesen werden. Dies entspricht dem Ergebnis der Datenbankanalyse. Zebrafisch-*tan* konnte im Gegensatz dazu auf Kopplungsgruppe 12 identifiziert werden. Somit liegen Zebrafisch-*fah* und *-tan* auf unterschiedlichen Kopplungsgruppen.

### Expressionsanalysen von Zebrafisch-*tan*

Zur Untersuchung der Expression von Zebrafisch-*tan* wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Zwei Primerkombinationen (siehe oben, und Abb. D56 C) wurden auf cDNA von verschiedenen adulten Geweben und unterschiedlichen Embryonalstadien eingesetzt. Beide Primerkombinationen weisen die gleiche Expression auf. Im adulten Fisch ist Zebrafisch-*tan* ubiquitär exprimiert. Lediglich in den Kiemen konnte keine Expression nachgewiesen werden. In Embryonalstadien ist Zebrafisch-*tan* ausschließlich in Stadium 1 exprimiert. Wie auch schon für Zebrafisch-*fah* beschrieben, handelt es sich bei Zebrafisch-*tan* um einen Maternalfaktor.



**Abb. D56:** RT-PCR-Expressionsanalysen Zebrafisch-*tan* auf verschiedenen Geweben [B] und verschiedenen Embryonalstadien [C]. Schwarze Pfeile unter der schematischen Darstellung von *tan* (blauer Kasten stellen die Exons dar) symbolisieren die Primeransatzstellen. cDNA-Abgleich durch Aktin-PCR (Primerkombination *ola act1/2*).

### 2.2.4 Orthologe *fah/tan* Sequenzen in Tetrapoden

*Fah* ist ortholog zu *Xvelo*, dem unbekanntem Genprodukt des südamerikanischen Krallenfrosches. *Fah* erhielt daher seinen Namen (*velo* (französisch) – Fahrrad).



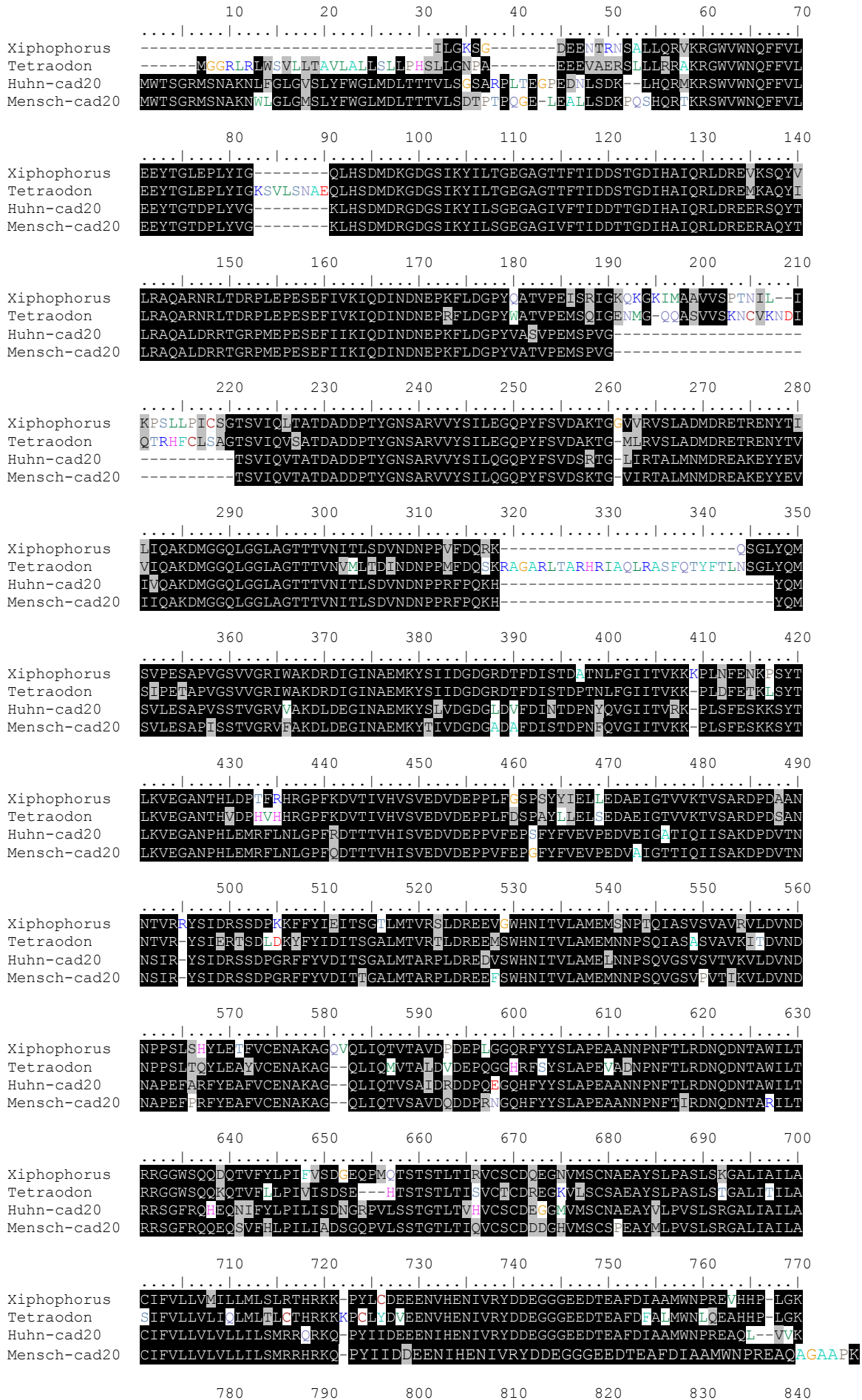
Datenbankanalysen wiesen orthologe Sequenzen auch im Huhn (Zugangsnummer: XP\_418846) auf Chromosom 2 und im Hund (Zugangsnummer: XP\_849403) auf Chromosom 6 nach. In der Maus konnte keine orthologe Sequenz identifiziert werden. Interessanterweise liegt *velo* in den beschriebenen Tierarten im Gegensatz zu Fischen nur als Einzelgen vor. Ein weiteres verwandtes Gen, wie *tan* bei Fischen, konnte nicht identifiziert werden. Auch beim Menschen und Schimpansen konnte auf dem X Chromosom (menschliches X Chromosom: Xq27) in genomischer Umgebung von *SOX3* eine orthologe Sequenz zu *velo* nachgewiesen werden. Diese Sequenz ist allerdings von multiplen Stopcodons durchzogen.

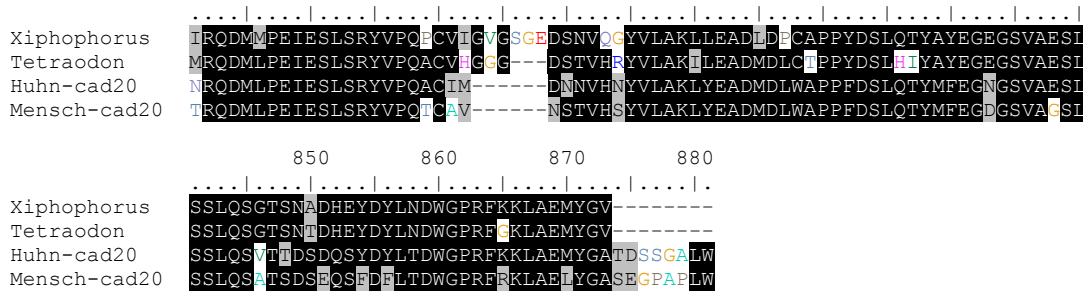
### 2.2.5 Weitere Genkandidaten in der Umgebung von *fah* in der geschlechtsbestimmenden Region von *X. maculatus*

Nachdem die Geschlechtsbestimmende Region in Kollaboration mit Genoscope, Frankreich komplett durchsequenziert wird, konnten durch Blast-Analysen eine Reihe weiterer Genkandidaten identifiziert werden. Drei dieser Genkandidaten, *cad20*, *KIAA0241*, *RNF31* liegen in der Umgebung von *fah* und werden in den folgenden Kapiteln ausführlicher behandelt.

#### 2.2.5.1 *Cadherin*, Eine Zell-Zell Adhäsionsprotein in der Geschlechtsbestimmenden Region

Durch Blastanalysen (BlastX auf dem NCBI-Server) konnte in der Geschlechtsbestimmenden Region ein Genkandidat, der ortholog zu *Cadherin20* ist (Abb. D57), identifiziert werden. Cadherine sind calciumabhängige Zell-Zell-Adhäsionsproteine und vermitteln homophile (Adhäsion zwischen Zellen des gleichen Typs) Zell-Zell-Adhäsionen. Sie bestehen aus einer N-terminalen extrazellulären Region, einem einzelnen Transmembranabschnitt und einem C-terminalen cytoplasmatischen Schwanz. Die extrazelluläre Domäne, bestehend aus mehreren Sequenzwiederholungen, ist für die Bindung des Calciums und die Zell-Zell-Bindung verantwortlich. Erst durch die Bindung von Calcium wird die richtige Faltung und normale Funktion der Cadherine gewährleistet. Die cytosolische Domäne ist mit dem Cytoskelett der Zelle assoziiert [zum Überblick siehe Lodish et al., 2001]. *Cadherin20* ist beim Menschen auf Chromosom 18q22-q23 lokalisiert. Exprimiert ist *Cadherin20* im embryonalen und adulten Gehirn sowie in der Placenta [Kools et al., 2000]. In der Maus könnte *cad20* eine Rolle bei der Kompartimentierung des Neuralrohrs und bei der Entstehung der neuralen Verschaltung spielen [Moore et al., 2004]

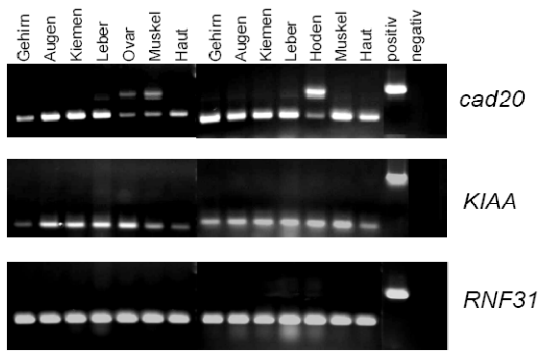




**Abb. D57:** Protein-Sequenzvergleich von Cad20 (Zugangsnummern: *Homo sapiens*, Cadherin 20, AAI01069; *Gallus gallus*, Cadherin 20, NP\_989465; *Tetraodon nigroviridis*, unbekanntes Protein, CAF 98723).

Der Genkandidat *cad20* wurde durch „Schrotschuss“-Sequenzierung des Klons X6 identifiziert. Sequenzanteile eines „Schrotschuss“-Klons sind ortholog zu *Cadherin 20*, kurz *cad20* genannt. Mit Hilfe von *cad20*, eingesetzt als genomischem Marker, konnte das X- und Y-chromosomale *Xmrk*-Contig erweitert werden (siehe Kapitel 1.3.4.1). Southernblot-Hybridisierungsanalysen mit *cad20* als Sonde (aufgereinigtes PCR-Produkt) auf genomischer *Xiphophorus maculatus* DNA, wies eine Bande im Genom nach (Abb. D18 B). Ein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Individuen konnte nicht identifiziert werden. In der Geschlechtsbestimmenden Region konnte *cad20* auf X- und Y-chromosomalen Klonen nachgewiesen werden (Abb. D18 A).

Nachdem der Klon X6 komplett sequenziert worden war (Sequenzierung durchgeführt von Genoscope, Frankreich), konnte die Intron-Exon-Struktur des Genkandidaten mittels Datenbankanalysen (bl2sq mit Tetraodon unbekanntes Proteinprodukt, Zugangsnummer: CAF98723; Genescan bei MIT) rekonstruiert werden. *Cad20* besteht aus 10 Exons. Zur Expressionsanalyse durch RT-PCR wurde ein Primerpaar verwendet, das Teile von Exon 9 und 10 auf cDNA amplifiziert. Zunächst wurden die PCR-Bedingungen auf genomischer DNA ausgetestet (PCR-Produkt etwa 1 kb groß). Anschließend wurden die Primer auf cDNA von adulten Geweben eingesetzt. *Cad20* ist in allen getesteten Geweben exprimiert, (600 bp PCR-Produkt, Abb. D58). Die Expression in Haut, Ovar und Muskel weiblicher Gewebe ist deutlich schwächer. Dies hängt mutmaßlich mit der Qualität der cDNA und/oder mit der Spezifität der Primer zusammen. Interessanterweise ist im Hoden und Ovar neben der 600 bp eine etwa 1 kb große Bande nachweisbar. Dabei handelt es sich um ein ungespleißtes PCR-Produkt. Da das Intron zwischen Exon 8 und 9 von multiplen Stopp-Codons durchzogen ist, kann daraus kein funktionales Proteinprodukt translatiert werden. Durch eine Negativ-PCR-Analyse (durchgeführt von C. Schmidt) sowie Wiederholung des Versuches mit einem anderen Satz cDNA, die das gleiche Ergebnis lieferte, kann eine Kontamination mit genomischer Kontamination weitestgehend ausgeschlossen werden.

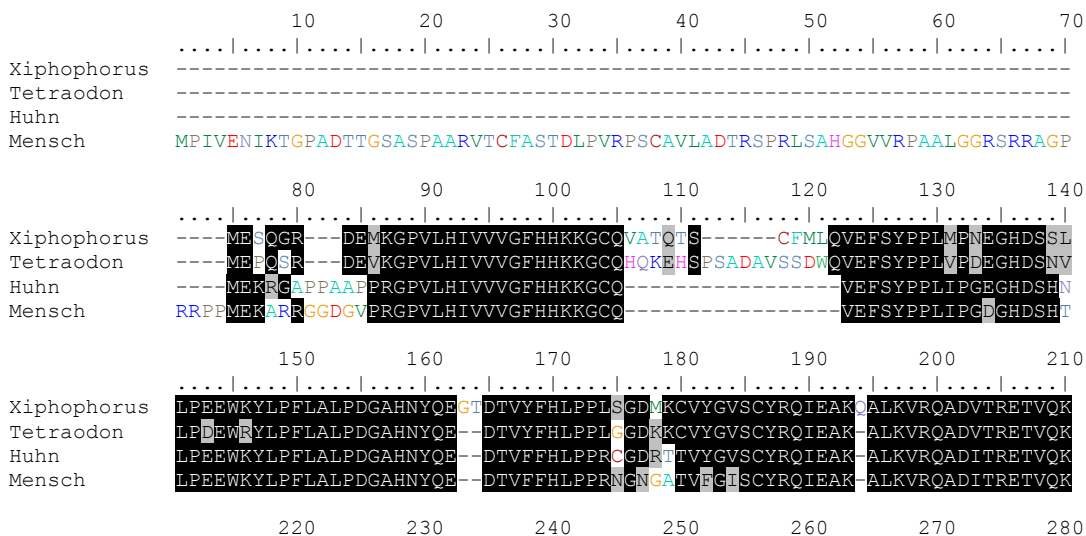


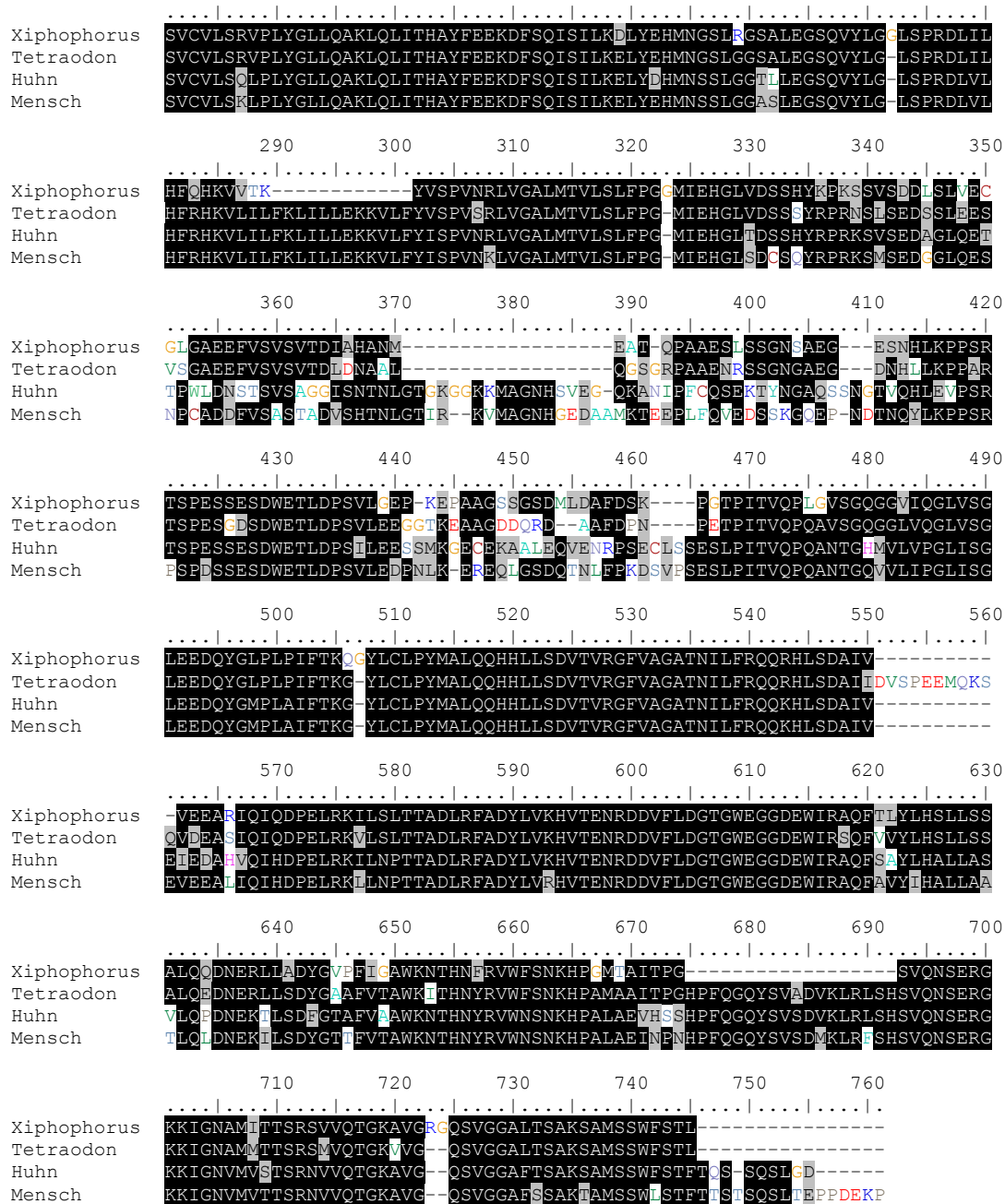
**Abb. D58:** RT-PCR-Expressionsanalysen verschiedener Genkandidaten (*cad20*, *KIAA0241* und *RNF31*) auf unterschiedlichen männlichen und weiblichen Geweben.

### 2.2.5.2 Genkandidat *KIAA0241*

Durch Blastanalysen der Sequenz der überlappenden Klone X6/AB1 (sequenziert durch Genoscope, Frankreich) konnte der Genkandidat *KIAA0241* identifiziert werden. Die Sequenz ist ortholog zu *KIAA0241*. *KIAA0241* codiert eine Proteindomäne mit unbekannter Funktion (DUF1630). Diese Proteindomäne konnte bei verschiedenen hypothetischen Eukaryotenproteinen nachgewiesen werden. Beim Menschen ist *KIAA0241* auf Chromosom 7 lokalisiert [Scherer et al., 2003].

Das *KIAA0241*-Gen besteht aus 11 Exons. Für RT-PCR-Expressionsanalysen wurden Primer konstruiert, die in Exon 5 und 7 liegen. Eingesetzt auf cDNA werden Teile des Exon 5, Exon 7 und Teile von Exon 9 amplifiziert. Daraus resultiert ein PCR-Produkt von etwa 400 bp. Eingesetzt auf genomischer DNA ist das PCR-Produkt 1,5 kb groß. *KIAA0241* ist in allen getesteten Geweben exprimiert (Abb. D58), wobei die Expression im weiblichen Gehirn und in der Haut etwas schwächer ist. Dies könnte aber auf Pipettierfehler oder auf die Qualität der cDNA zurückzuführen sein.





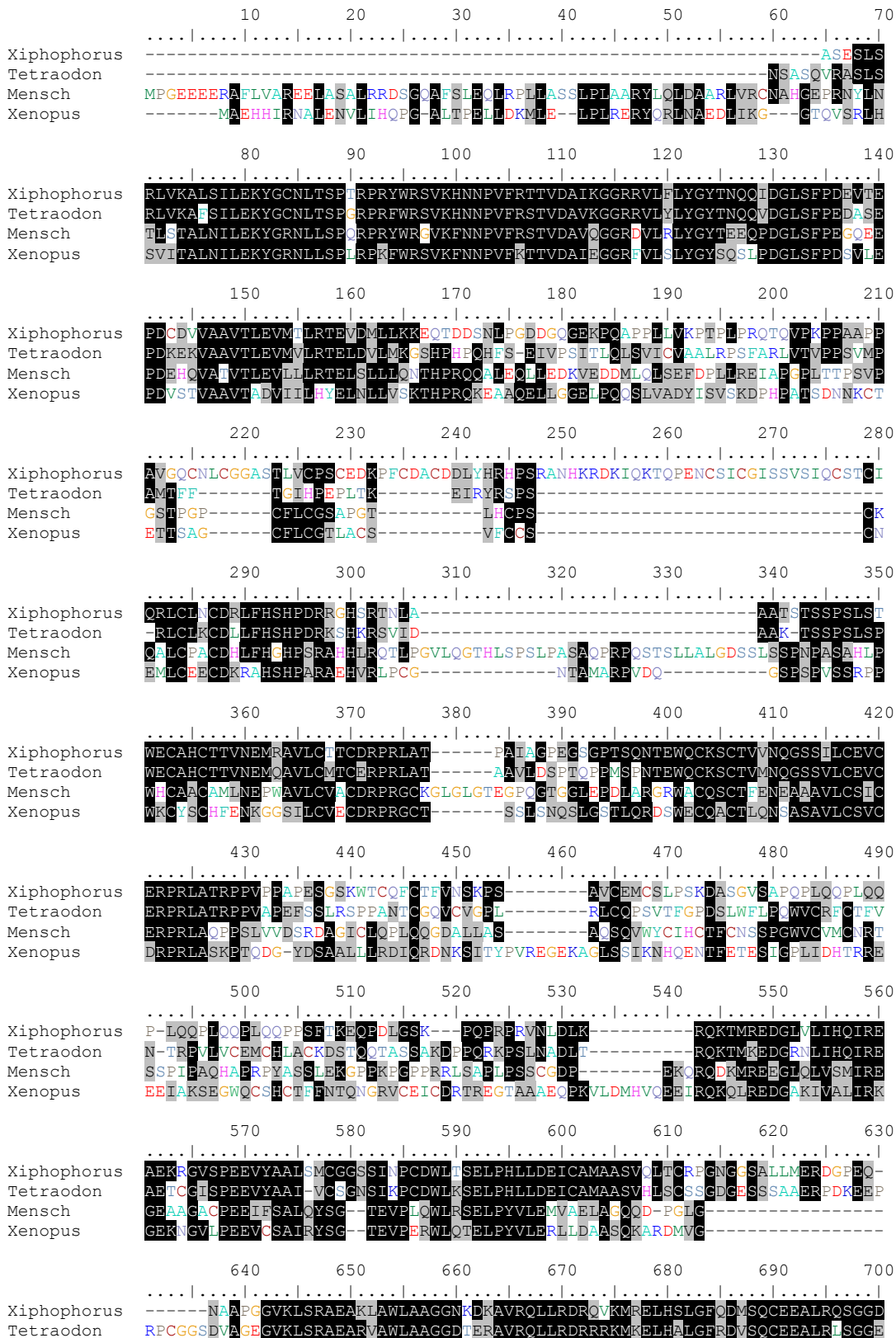
**Abb. D59:** Proteinsequenzvergleich von KIAA0241 (Zugangsnummern: *Tetraodon negroviridis*, unbekanntes Protein, CAF98729; *Gallus gallus*, hypothetisches Protein, XP\_418848; *Homo sapiens*, KIAA0241, EAL 24439)

### 2.2.5.3 Genkandidat *RNF31*

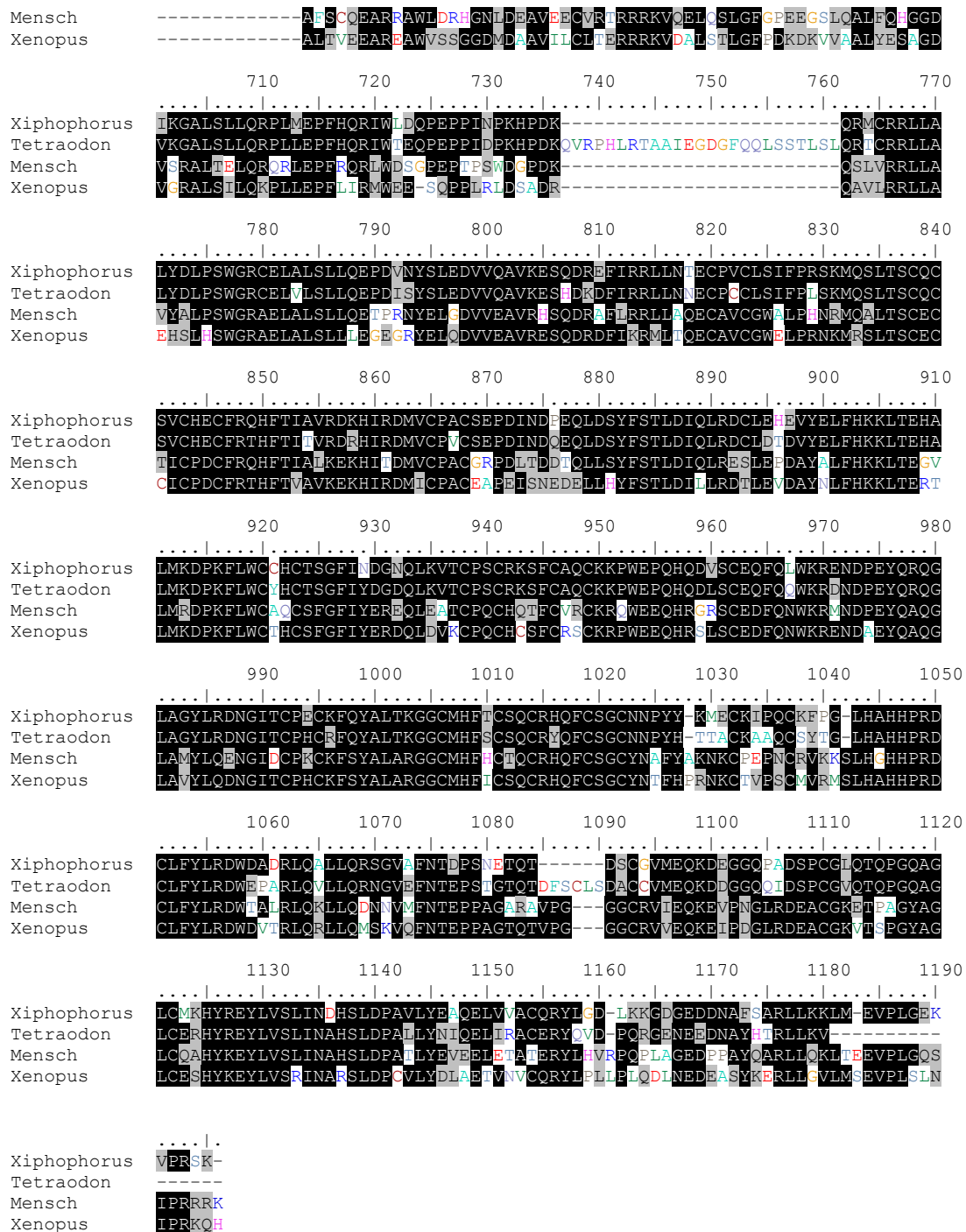
Datenbankanalyse wies in der Umgebung von *fah* auf den überlappenden Klonen X6 und AB1 einen weiteren möglichen Genkandidaten nach. Dieser zeigt Orthologie zu dem *Ring-Finger-Gen 31* und wurde daher *RNF31* genannt. *RNF* codieren ein Proteinmotiv, das mit Zink-Fingern verwandt ist.

Die Intron-Exon-Struktur von *RNF31* wurde mit Hilfe von Genscan und Sequenzdatenvergleich analysiert. *RNF31* besteht aus 19 Exons. Für RT-PCR-Expressionsanalysen wurde eine Primerkombination konstruiert, der For-Primer liegt in Exon

8, der Rev-Primer in Exon 9. Auf genomischer DNA amplifizieren die Primer ein etwa 1 kb großes PCR-Produkt. Eingesetzt auf cDNA von verschiedenen Geweben konnte eine 500 bp großes PCR-Produkt in allen getesteten Geweben identifiziert werden (Abb. D58). Die Intensität der Expression ist in allen Geweben ähnlich.







**Abb. D60:** Proteinsequenzvergleich RNF31 (Zugangsnummern: *Tetraodon neogroviridis* CAF 98733; *Homo sapiens* NP060469, *Xenopus laevis* NP\_001092429)

### 2.3 Genomische Struktur der geschlechtsbestimmenden Region

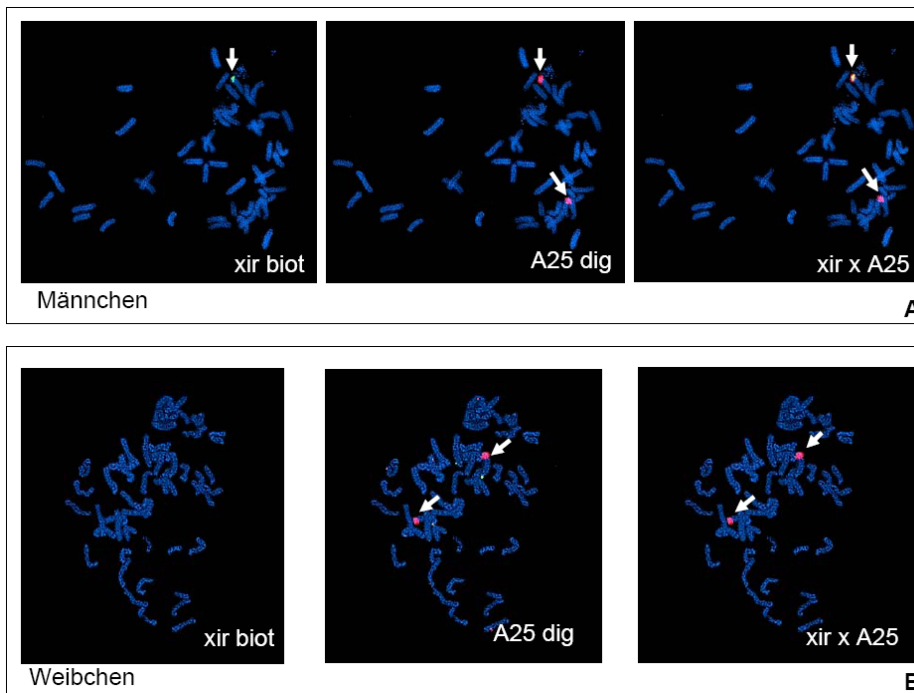
Die Geschlechtschromosomen von *Xiphophorus maculatus* weisen, wie Synaptonemal-Komplex-Untersuchungen gezeigt haben, keine Differenzierung auf und repräsentieren Geschlechtschromosomen in einer frühen evolutionären Phase. Meiotische Rekombination kann über die gesamte Länge der Geschlechtschromosomen beobachtet werden, scheint aber in der geschlechtsbestimmenden Region unterdrückt zu sein [Traut und Winking, 2001;



Gutbrod und Scharl, 1999]. Dies deutet auf molekulare Unterschiede zwischen dem X und Y Chromosom in der geschlechtsbestimmenden Region hin. Die meisten getesteten Marker, die zur Erstellung der X und Y chromosomalen Contigs verwendet wurden (Kapitel D1), sind auf beiden Geschlechtschromosomen lokalisiert. Auch wurden die meisten Genkandidaten und transponierbaren Elemente sowohl auf dem X als auch auf dem Y Chromosom nachgewiesen. Dennoch konnten Unterschiede zwischen dem X und Y Chromosom identifiziert werden.

### 2.3.1 Y-spezifische Sequenzen in der geschlechtsbestimmenden Region

Nanda et al., 2000a konnten durch FISH-Analysen in der geschlechtsbestimmenden Region ein Y-spezifisches *XIR*-Cluster nachweisen. *XIR* ist ein nicht-autonomes, LTR (Long terminal repeat – lange terminierende Wiederholungssequenz) -ähnliches transponierbares Element, das bei den Retrotransposons eingruppiert wird [Roushdy et al., 1999]. Der von Nanda et al., 2000a durchgeführte Versuch wurde wiederholt. Dazu wurde das klonierte *XIR*-Cluster Biotin-markiert. Zur Kontrolle wurde ein Klon der Geschlechtsbestimmenden Region A25 DIG-markiert und als Sonde eingesetzt. A25 ist ein Y-chromosomaler Klon, der in einer Region lokalisiert ist, in dem X und Y Chromosom sehr homolog sind. Beide Sonden (*XIR* und A25) wurden auf männlichen und weiblichen Metaphasechromosomen hybridisiert (Abb. D61). Auf weiblichen Metaphasechromosomen ist lediglich das DIG-Signal des Klons A25 auf zwei Chromosomen, den X Chromosomen zu sehen, das Biotin-Signal ist auf keinem Chromosom sichtbar. Auf männlichen Metaphasechromosomen kann das DIG-Signal (DIG-markierter A25 Klon) ebenfalls auf zwei Chromosomen identifiziert werden. Im Gegensatz zum Weibchen kann das Biotin Signal (Biotin markierte *XIR*-Sonde) auf einem Chromosom nachgewiesen werden. Werden beide Signale gleichzeitig eingeblendet, überlagern sich die Signale auf einem Chromosom. Dabei handelt es sich um das Y Chromosom.



**Abb. D61:** FISH-Analysen auf männlichen [A] und weiblichen [B] Metaphasechromosomen. Eingesetzte Sonden: xir, Biotin-markiert, A25 DIG-markiert. Pfeile zeigen auf die Signale von xir (grün) und A25 (rot). Bei Überlagerung der Signale erscheint das Signal gelb (xir x A25).

Eine weitere Y-spezifische-Sequenz konnte auf den überlappenden Klonen X6/AB1 identifiziert werden (Abb. D62 schwarzer Pfeil). Dabei handelt es sich um den endogenen Retrovirus *fishmy* (siehe Kapitel 2.2.1). Im Genom von *Xiphophorus maculatus* sind multiple Kopien nachgewiesen worden. Die *fishmy* Kopie in den überlappenden Klonen X6/AB1 stellt eine Y-spezifische Kopie dar. Auf der korrespondierenden Region auf dem X Chromosom konnte keine TSD festgestellt werden. Somit inserierte *fishmy* nicht auf dem X Chromosom (Kapitel D 2.1.2)

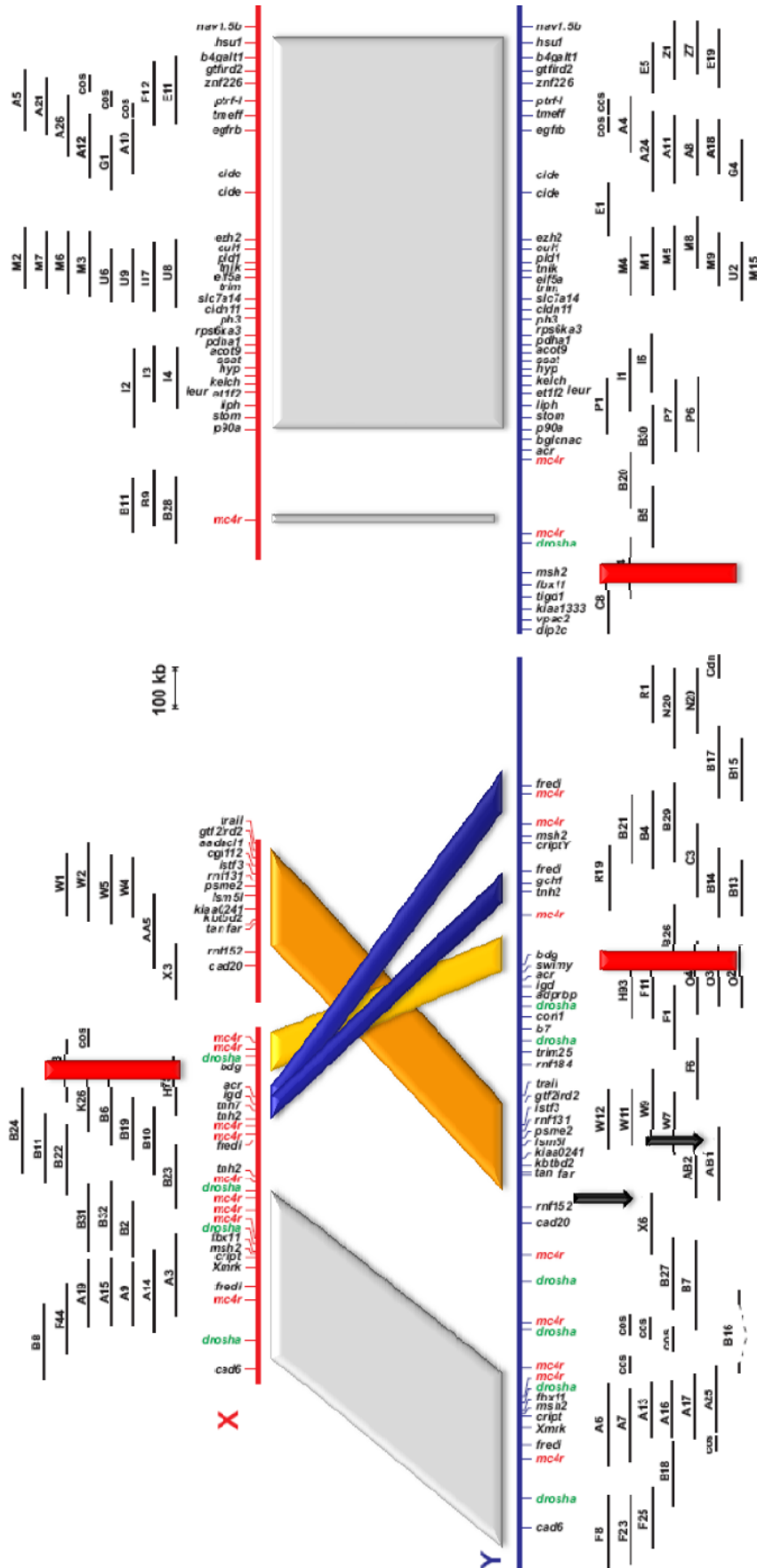
Durch Sequenzdatenvergleich (vista, <http://genome.lbl.gov/vista/servers.shtml>) zwischen dem X chromosomalen Klon W2 und dem Y chromosomalen Klon AB1 konnte eine weitere Y-spezifische etwa 2 kb große Sequenz identifiziert werden. Laut RepeatMasker und CENSOR (<http://www.repeatmasker.org/>, <http://www.girinst.org/repbases/index.html>) handelt es sich um ein *XIR*-ähnliches-Element, das sich dreimal wiederholt. Die TSD lautet TAATTAA (Abb. D62, schwarzer Pfeil).

Darüber hinaus konnte eine Akkumulation einer Wiederholungssequenz in der Umgebung des Y-spezifischen duplizierten Bereiches, die keine Homologien zu schon bekannten transponierbaren oder sich wiederholenden Sequenzen aufweisen, (Abb. D62, rote Kästen) nachgewiesen werden. Die Endfragmente C8-Rev, H75-For, K26-Rev, H93-For, F11-For beinhalten Sequenzabschnitte dieser Wiederholungssequenz. Wie Southern-Blot-

Hybridisierungsanalysen zeigen konnten, wird die duplizierte Y-spezifische Region scheinbar von zwei Clustern der Wiederholungssequenz flankiert, während auf dem X Chromosom nur ein Cluster vorzufinden ist (Abb. D62, rote Kästen).

### 2.3.2 Genomische Umordnungen zwischen dem X und Y Chromosom in der geschlechtsbestimmenden Region

Die 5'-Region von *Xmrk* sowie der 5' und 3'-Bereich um *egfrb* sind zwischen dem X und Y Chromosom sehr homolog. Die zur Contigstellung und -erweiterung verwendeten Marker wurden an der gleichen Stelle auf dem X und Y Chromosom identifiziert. Dennoch konnten neben den Y-spezifischen Sequenzen genomische Unterschiede zwischen dem X und Y Chromosom in der genomischen Struktur der geschlechtsbestimmenden Region identifiziert werden. Die Unterschiede wurden durch Vergleich der Marker zwischen dem X und Y Chromosom sowie durch Sequenzdatenvergleich (VISTA) identifiziert. Ein duplizierter Bereich (Abb. D62, blaue Kästen) auf dem Y Chromosom konnte um das Y-spezifische Pseudogen *Y-cript* nachgewiesen werden. Die Genkandidaten *fredi*, zwei Kopien von *mc4r*, *tnh2* und *tnh7* sind um *Y-cript* dupliziert, während auf dem Y Chromosom jeweils nur eine Kopie der Gene vorliegt. Darüber hinaus konnte eine große invertierte Region (Abb. D62, orange Kästen) identifiziert werden. Verschiedene Marker sind in dieser Region im jeweils homologen Chromosom in umgekehrter Reihenfolge nachgewiesen worden. Die Reihenfolge der Marker wurde durch Southern-Blot-Hybridisierung bestimmt. Dazu wurden molekulare Marker als Sonde auf Klonen der geschlechtsbestimmenden Region getestet.



**Abb. D62:** Schematische Darstellung der Genkandidaten und Genomumordnungen in der geschlechtsbestimmenden Region auf den Geschlechtschromosomen X (rote Linie) und Y (blaue Linie). Homologe Regionen sind durch graue Kästen gekennzeichnet, blaue Kästen symbolisieren den duplizierten Bereich auf dem Y Chromosom und orangene Kästen zeigen das Inversionsereignis. Rote Balken symbolisieren verschiedene Cluster einer Wiederholungssequenz, schwarze Pfeile zeigen Y-spezifische Kopien transponierbarer Elemente und Wiederholungssequenzen.



## E. Diskussion:

### 1 Probleme bei der Erweiterung X- und Y-chromosomaler Contigs der geschlechtsbestimmenden Region und Möglichkeiten zur Fortführung der Erweiterung

Ziel des Projekts „Molekulare Analyse der geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus*“ ist die komplette Abdeckung der genomischen Region zwischen *Xmrk* und *egfrb* mit einem aus BAC- und Cosmid-Klone bestehenden Contig, um diese für weitere molekulargenetische und bioinformatische Analysen zugänglich zu machen. Im Rahmen der Doktorarbeit konnten die schon etablierten X- und Y-chromosomalen Contigs mittels molekularbiologischer und cytogenetischer Methoden um ca. 500 kb auf 3,8 Mb auf dem X Chromosom bzw. um ca. 500 kb auf 3,1 kb auf dem Y Chromosom erweitert werden. Darüber hinaus konnte das Y-spezifische *Y-cript* Contig dem Y-chromosomalen *Xmrk*-Contig angeschlossen werden.

Trotz großer Bemühungen bestehen vereinzelt Lücken im Contig (Kapitel D1.3.1, D1.5.3) und ein Zusammenschluss der *egfrb*- und *Xmrk*-Contigs auf dem X bzw. Y Chromosom konnte bis zum Abschluss der praktischen Arbeit der Doktorarbeit nicht bewerkstelligt werden. Verschiedene Gründe sind dafür anzugeben. Die Erweiterung der Contigs erwies sich zum einen aufgrund des repetitiven Charakters der geschlechtsbestimmenden Region als äußerst schwierig und aufwendig. Zum anderen bestehen, möglicherweise aufgrund der disproportionalen Verteilung der *HindIII*-Schnittstellen im Genom von *Xiphophorus maculatus*, Lücken in der BAC-Bibliothek (siehe Kapitel D1.3.1) und die geschlechtsbestimmende Region kann daher nur unvollständig mit Klonen der BAC-Bibliothek abgedeckt werden. Auch mit Hilfe der Klone der Cosmid-Bibliothek konnten die Lücken nicht vollständig überbrückt werden. Eine Angabe der Größe der Lücken ist bisher nur ansatzweise möglich. Die auf dem Y Chromosom zwischen den Klonen A25 und B7 bestehende Lücke könnte -trotz Anfügung von Cosmid-Klonen- etwa 50-100 kb betragen. Eine Möglichkeit zur exakteren Bestimmung der Lückengröße ist durch Fiber-FISH (Fluoreszenz in situ-Hybridisierung)-Analysen gegeben. Dabei handelt es sich um eine Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung auf auseinander gezogener DNA, die eine hoch auflösende physikalische DNA-Kartierung ermöglicht. Das Auflösungsvermögen beträgt 1kb bis 1Mb, während bei Standard-FISH Analysen das Auflösungsvermögen bei etwa 2MB liegt [van de Rijke et al., 2000]. Zur

Analyse würden Marker als Sonde (BAC- und Cosmid-Klone) herangezogen werden, deren Position bestimmt ist. Mittels dieser Methode könnte nicht nur die Größe der Lücken, sondern auch der Abstand zwischen *Xmrk* und *egfrb*-Contig bestimmt werden. Dadurch wäre auch eine exaktere Größenangabe der Region zwischen *Xmrk* und *egfrb* möglich die im Gegensatz zur ursprünglichen Annahme, 1 Mb deutlich überschreitet. Da das maximale Auflösungsvermögen der Fiber-FISH-Analyse jedoch bei 1Mb liegt [van der Rijke et al., 2000] ist es ausgeschlossen, die Größe der genomischen Region zwischen *Xmrk* und *egfrb* mit nur einer Analyse zu bestimmen. Daher würden BAC-Klone als Sonde verwendet, die *Xmrk* bzw. *egfrb* auf der einen Seite und ein BAC-Klon, der aus der Mitte des Contigs stammt und dessen Position bestimmt wurde, verwendet werden. Die analysierten Abstände müssten dann nur addiert werden.

Zur Abdeckung der gesamten Region auf dem X und Y Chromosom müssen neben den schon beschriebenen molekulargenetischen und cytogenetischen Methoden alternative Strategien angewendet werden. (i) Um auszuschließen, dass bei zuvor durchgeführten Durchmusterungen der BAC-Bibliothek keine Klone übersehen wurden, könnten neue Marker, die bei der Sequenzierung X- und Y-chromosomaler Contig-Klone der geschlechtsbestimmenden Region identifiziert wurden, zur Durchmusterung der genomischen Bibliotheken verwendet werden. Diese Marker würden zunächst genomisch getestet und anschließend als Sonde zur Durchmusterung der BAC-Bibliotheken eingesetzt werden. (ii) Andererseits kann auf die Cosmid-Bibliothek zurückgegriffen werden. Wie schon in Kapitel D1.3.2 für die Überbrückung der Lücke zwischen A25 und B7 beschrieben, stellt das Endfragment T8 des Cosmid-Klons C009B22 aufgrund der zwei Banden in Southern-Blot-Analysen eine vielversprechende Sonde zur Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek dar. Auch an dem Centromer zugewandtem Ende des Y-chromosomalen *Xmrk/Y-crypt*-Contigs konnten Cosmid-Klone identifiziert werden, die mutmaßlich mit N20 überlappen könnten (Kapitel D1.4). Endfragment-Hybridisierungsanalysen hybridisiert auf BAC/Cosmid-Klonen könnten eine Überlappung zwischen N20 und den Cosmiden bestätigen und hybridisiert auf genomischer DNA Aufschluss darüber geben, ob es sich um geeignete Marker zur Durchmusterung der Cosmid Bibliothek handelt. Cosmid-Klone lassen sich aufgrund der geringen Insertgröße einfacher analysieren als Klone der BAC-Bibliothek. Ein Vorteil, der allerdings bei der Abdeckung größerer repetitiver Bereiche, die in der geschlechtsbestimmenden Region häufig vorkommen, Probleme aufwirft. Bedenkt man ferner, dass die Abdeckung der Cosmid-Bibliothek dem 2,7 fachen des *Xiphophorus*



*maculatus* Genoms entspricht und jedes Gonosom nur 1,3-fach im heterogametischen Geschlecht abgedeckt wird [Burgtorf et al., 1998], ist auch hier mit Lücken in der genomischen Bibliothek in der geschlechtsbestimmenden Region zu rechnen. Im Vergleich dazu werden die Gonosomen der BAC-Bibliothek im heterogametischen Geschlecht fünffach abgedeckt [Froschauer et al., 2002]. Auch bei der Sequenzierung des menschlichen X Chromosoms gab es Schwierigkeiten bei der physikalischen Kartierung, obwohl die verschiedenen verwendeten genomischen Bibliotheken eine 80-fache Genomabdeckung aufwiesen. Die hartnäckigsten Lücken traten dabei in der Telomerregion auf [Ross et al., 2005]. Ein Phänomen, das auch für andere Telomerregionen der menschlichen Chromosomen beschrieben wurde [Humphray et al., 2004]. Einerseits wird dies mit dem repetitiven und GC-reichen Charakter der Telomerregion in Verbindung gebracht und/oder andererseits auf die disproportionale Verteilung der Restriktionsschnittstellen zurückgeführt [Ross et al., 2005]. Auch die Erstellung einer physikalischen Karte der MSY (male-specific region on the Y chromosome), war aufgrund des repetitiven Charakters dieser Region äußerst schwierig [Skaletzky et al., 2003]. Daher wird es mutmaßlich schwierig sein, die Contiglücken in der geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus* mit Klonen der Cosmid-Bibliothek und die Zusammenführung des *egfrb* und *Xmrk*-Contigs mit den bestehenden genomischen Cosmid- und BAC-Bibliotheken fertig zu stellen. (iii) Deshalb wäre eine dritte, effiziente aber kostspielige und zeitaufwendige Strategie die Erstellung einer neuen BAC-Bibliothek, die unabhängig von Restriktionsschnittstellen und der Nukleotidzusammensetzung der genomischen Region wäre. Im Gegensatz zu den etablierten genomischen Bibliotheken (BAC- und Cosmid-Bibliothek) würde zur Erstellung der neuen genomischen Bibliothek das *Xiphophorus maculatus* Genom physikalisch zerkleinert. Die erhaltenen Fragmente entsprächen dann eher einer proportionalen Verteilung. Für *Drosophila melanogaster* wurden bereits zwei solcher genomischer Bibliotheken erstellt, die zur Physikalischen Kartierung der Telomerregion und zum Schließen von Lücken auf dem X Chromosom genutzt wurden [Abad et al., 2004; Osoegawa et al., 2007]. Dabei wurde die DNA, die in einem Agaroseblock eingebettet wurde, durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen physikalisch zerkleinert. Weitere BAC-Bibliotheken, generiert aus gescherter DNA, bestehen für *Drosophila pseudoobscura* und Mensch [Osoegawa et al., 2007].

## 2 Molekulare Analyse der geschlechtsbestimmenden Region

### 2.1 Transponierbare Elemente in der geschlechtsbestimmenden Region

#### 2.1.1 Einfluss transponierbarer Elemente auf die Evolution von Geschlechtschromosomen

Molekulare Untersuchungen der genomischen Struktur der geschlechtsbestimmenden Region wiesen eine Vielzahl von transponierbaren Elementen nach (Tabelle D6). Die genomische Region um *Xmrk* ist gefüllt mit transponierbaren Elementen, die 3' flankierende Region (33 kb) von *Xmrk* besteht zu 80% aus Retroelementen (fast ausschließlich LTR-Retrotransposons), während in der Region um *egfrb* die meisten Elemente nicht anzutreffen sind [Volff et al., 2003]. Transponierbare Elemente spielen nicht nur bei der Evolution der Genomgröße in Eukaryoten [Kidwell et al., 2002], sondern auch bei dem Degenerierungsprozess des Y bzw. W Chromosoms eine wichtige Rolle. Dies konnte durch Analysen bei *Drosophila miranda* nachgewiesen werden. Bei dieser *Drosophila*-Art fusionierte ein Autosom mit dem Y Chromosom, wodurch ein neo-Y Chromosom entstand, das sich im Degenerierungsprozess befindet, und ein von der Fusion unberührtes neo-X Chromosom entstand [Charlesworth und Charlesworth, 2000; Steinmann und Steinmann, 2005]. Transponierbare Elemente häufig Retrotransposons akkumulieren massiv in der nicht rekombinierenden Region auf dem degenerierenden Geschlechtschromosom. Dies konnte nicht nur bei *Drosophila miranda* festgestellt werden, sondern stellt vielmehr ein Charakteristikum von degenerierenden Geschlechtschromosomen dar. Die darauf folgende Bildung von Heterochromatin stellt eine Verteidigung gegen die parasitären Elemente dar [Charlesworth et al., 1994, 2005; Steinmann und Steinmann, 2005].

Die meisten in der geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus* identifizierten transponierbaren Elemente (siehe Tabelle D6) wurden jedoch an gleicher Stelle auf beiden Geschlechtschromosomen X und Y identifiziert [Volff et al., 2003]. Darüber hinaus ist die geschlechtsbestimmende Region in weiten Teilen zwischen X und Y Chromosom sehr homolog, was auf eine homologe Rekombination zwischen X und Y Chromosom hindeutet [Volff et al., 2003]. Somit ist die Anhäufung der transponierbaren Elemente in der geschlechtsbestimmenden Region mutmaßlich nicht auf eine unterdrückte homologe Rekombination zurückzuführen.

Allerdings konnten Y-spezifische Kopien von transponierbaren Elementen und Sequenzwiederholungen in der geschlechtsbestimmenden Region identifiziert werden. Dazu zählt die Y-spezifische Anhäufung des *Xir*-Elements [Nanda et al., 2000a], die Y spezifische Kopie von *fishmy* und einem *Xir* ähnlichen Element (siehe Kapitel D2.3.2). Dies deutet auf beginnende molekulare Differenzierung der Geschlechtschromosomen hin, die zu einer unterdrückten homologen Rekombination führen können.

### **2.2.2 Einfluss transponierbarer Elemente und Wiederholungssequenzen auf die genomische Struktur der geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus***

Neben den Y-spezifischen Kopien transponierbarer Elemente und Sequenzwiederholungen konnten weitere Hinweise auf eine molekulare Differenzierung zwischen den Geschlechtschromosomen in der geschlechtsbestimmenden Region identifiziert werden. Zum einen wurde ein duplizierter Bereich auf dem Y Chromosom um das Y-spezifische Pseudogen *Y-cript* nachgewiesen, zum anderen eine große invertierte Region (Kapitel D2.3.2).

Transponierbare Elemente sind durch den Prozess der Transposition und der nichthomologen Rekombination häufig an der Entstehung von Genomumordnungen wie Insertionen, Duplikationen, Inversionen und Amplifikationen beteiligt [Volf et al., 2003]. Ob die in der geschlechtsbestimmenden Region identifizierten genomischen Umordnungen durch die Fülle der transponierbaren Elemente und Wiederholungssequenzen verursacht wurden, konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Ein *Xir*-Element könnte allerdings bei dem Duplikationsereignis das zur Entstehung des *Xmrk*-Onkogens führte, beteiligt gewesen sein und darüber hinaus Einfluss auf die veränderte Expression von *Xmrk* haben [Volf et al., 2003; Meierjohann et al., 2004].

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang die Akkumulation einer Wiederholungssequenz in der Umgebung des duplizierten Bereiches auf dem Y Chromosom, die keine Homologien zu schon bekannten transponierbaren oder sich wiederholenden Sequenzen aufweist. Die duplizierte Y-spezifische Region wird scheinbar von Clustern dieser Wiederholungssequenz flankiert während auf dem X Chromosom nur ein Cluster vorzufinden ist (Abb. D62, rote Kästen). Ob und welchen Einfluss dieses Cluster auf das Duplikationsereignis hat, muss untersucht werden.

Genomumordnungen, wie beispielsweise Inversionen, beeinflussen die homologe Rekombination zwischen den Geschlechtschromosomen und könnten auch bei den frühen

Prozessen der Degenerierung der menschlichen Geschlechtschromosomen eine Rolle gespielt haben [Charlesworth et al., 2005]. Die Untersuchungen in *Xiphophorus* könnten darauf hindeuten, dass Inversionen ein mutmaßliches initiiierendes Charakteristikum differenzierender Geschlechtschromosomen darstellen könnten.

### 2.1.3 Einfluss transponierbarer Elemente auf Pseudogenentstehung in der geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus*

Transponierbare Elemente haben in der geschlechtsbestimmenden Region Einfluss auf die Pseudogenentstehung von Genen. Ein Beispiel stellt die Genzerstörung des *Xmrk*-Onkogens dar. In sogenannten lof-1 (loss of function 1) Mutanten ist die codierende Sequenz des Onkogens durch das nicht-autonome *Xiphophorus* spezifische Retrotransposon *TX-1* unterbrochen. Dadurch können die interspezifischen Kreuzungsmutanten keine Melanome mehr ausbilden. Dies ist auch ein Nachweis für die andauernde Aktivität von transponierbaren Elementen und die Anfälligkeit der geschlechtsbestimmenden Region für Transposition. Über welchen Mechanismus das nicht-kodierende Retrotransposon *TX-1* transponiert, ist bisher nicht bekannt [Schartl et al., 1999, Volff et al., 2003]. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Sequenzähnlichkeit zwischen *TX-1* und dem endogenen Retrovirus *fishmy* (Kapitel 2.1.1, Abb. D38 A und B), der ein scheinbar intaktes Pol-Polyprotein codieren könnte und wie auch *TX-1* anscheinend *Xiphophorus*-spezifisch ist. Daher kommt *fishmy* als möglicher Kandidat für das autonome Vorfahr-Element in Frage, mit dessen Hilfe *TX-1* im Genom von *Xiphophorus* transponieren könnte.

Ein weiteres Beispiel stellt die Pseudogenentstehung von verschiedenen *cript*-Kopien in der geschlechtsbestimmenden Region. Eine *cript*-Kopie befindet sich 5' von *Xmrk* und besitzt jeweils ein Allel auf dem X und Y Chromosom, die andere Kopie 3' von *Xmrk*, *Y-cript* genannt, ist Y-spezifisch. Diese geschlechtschromosomalen Kopien sind durch den endogenen Retrovirus *Rex4* im dritten Exon unterbrochen, die Y-spezifische Kopie *Y-cript* ist zusätzlich durch ektopische homologe Rekombination zwischen *Rex4*-Elementen und der Anknüpfung eines *Rex4* Elements stark verkürzt [Froschauer, 2003].

Ein drittes Beispiel für die Genzerstörung durch transponierbare Elemente in der geschlechtsbestimmenden Region stellt *fredi* dar. Verschiedene *fredi*-Kopien wurden in der geschlechtsbestimmenden Region identifiziert, 4 Kopien auf dem Y Chromosom, während nur 2 Kopien auf dem X Chromosom lokalisiert sind. Die Genduplikation von

*fredi* in der geschlechtsbestimmenden Region scheint evolutiv gesehen relativ jung zu sein, da zwischen den einzelnen Kopien kaum Sequenzunterschiede identifiziert wurden. Die codierende Sequenz der X-chromosomalen *fredi*-Kopien ist allerdings durch ein Transposon namens *MIToy* zerstört. Die Y-chromosomalen Allele blieben von dieser Insertion unberührt, wie durch Sequenzanalysen nachgewiesen werden konnte (Kapitel D2.1.1; D2.2.1). Anhand dieser Analysen kann auch vermutet werden, dass die Integration des transponierbaren Elementes in die X chromosomalen Kopien vor der Duplikation von *fredi* stattfand. Expressionsanalysen von *fredi* belegen eine alternative Spleißform im Hoden. Welche Kopie diese Hodenspleißform exprimiert, lässt sich anhand der bisherigen Ergebnisse nicht klären. Auch wenn bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte, ob ein Y-spezifisches *fredi*-Allel das Hodenprodukt exprimiert, stellt *fredi* einen Genkandidaten für Geschlechtsbestimmung und/oder Differenzierung dar.

#### **2.1.4 *MIToy*, ein MITE (Miniature inverted transposable Element)-Transposon im Kontext**

Das Transposon *MIToy* besitzt mehrere hundert Kopien im *Xiphophorus* Genom. Die in der geschlechtsbestimmenden Region identifizierten Kopien wurden in der codierenden Region der X-chromosomalen Allele des Genkandidaten *fredi* nachgewiesen und führten mutmaßlich zur Pseudogenenstehung dieser Allele. Die Insertion des Elements scheint evolutiv gesehen relativ jung zu sein, da die *fredi* Kopien neben der Insertion kaum Nukleotidsequenzabweichungen aufweisen. Die Genzerstörung durch MITE-Elemente wurde in Mais-Mutanten beschrieben und deren Einsatz als Mutagen für gentische Studien wird diskutiert [Nakazaki et al., 2003]. In dieser Arbeit wurde die Genzerstörung im Zusammenhang der Evolution von (geschlechtschromosomalen) Genen beschrieben, wodurch eine alternative Strategie der molekularen Geschlechtschromosomendifferenzierung vorstellbar ist (siehe Kapitel E2.2).

Der Mechanismus der Transposition und Amplifikation von MITE ist bisher kaum verstanden [Feschotte et al.2002]. MITE-Elemente stellen nicht-autonome transponierbare Elemente dar, die mittels eines autonomen Vorfahrens im Genom transponieren. Der autonome Vorfahr von *MIToy* konnte bisher noch nicht identifiziert werden, könnte möglicherweise mittels PCR oder Transposonmutagenese-Verfahren identifiziert werden. Eine PCR mit Primern, die sich an die TIRs anlagern, lieferte Produkte in verschiedenen Größen (Kapitel D2.1.1). Größere Produkte könnten dem

autonomen Vorfahren entsprechen. Klonierung und Sequenzierung dieser PCR-Produkte könnte Auskunft über den Vorfahren liefern. Andererseits wurden, durch Southern-Blot-Hybridisierungen mit *MIToy* als Sonde auf genomischer DNA, eine Vielzahl von Banden identifiziert. Die Isolierung und Klonierung der Fragmente, die *MIToy* enthalten, gefolgt von einer Sequenzierung durch Transposonmutagenese, könnten zur Identifizierung des autonomen Vorfahren beitragen und möglicherweise Aufschluss über den Mechanismus der Transposition und Amplifikation geben.

Southern-Blot-Hybridisierungsanalysen wies *MIToy* im Zebrafisch, *Tilapia* und *Poecilia* nach, während in Medaka und *Tetraodon* keine Sequenzen aufgezeigt werden konnten. Interessanterweise wurde durch Datenbankvergleiche ein Fugu-homolog zu *MIToy* identifiziert. Dies deutet auf eine diskontinuierliche Verteilung von *MIToy* in Fisch hin. Ob *MIToy* in Medaka und *Tetraodon* sekundär verloren gegangen ist oder durch horizontalen Transfer in Fisch verteilt wurde, kann bisher nur vermutet werden. Die geringe Größe der Elemente, aufgrund dessen sie mutmaßlich eher dem Evolutionsdruck standhalten können und das Auffinden im kompakten Fugugenom sprächen daher eher für den horizontalen Transfer. Ein horizontaler Gentransfer für Transposons der *hAT*-Superfamilie, zu der auch *MIToy* gehört, ist äußerst umstritten [Rubin et al., 2001]. Gegen den horizontalen Transfer spricht die Tatsache, dass das *Tetraodon*genom kompakter und erfolgreicher in der Eliminierung von sogenannter Junk-DNA zu sein scheint als das Fugugenom [Voff et al., 2003a]. Daher könnte *MIToy* auch aus dem *Tetraodon*genom eliminiert worden sein, was jedoch nicht die Abwesenheit von *MIToy* in Medaka erklärt.

## 2.2 Genkandidaten und Pseudogene in der geschlechtsbestimmenden Region

### 2.2.4 Duplikationsereignisse in der geschlechtsbestimmenden Region: Genduplikationen und Genamplifikationen

In der geschlechtsbestimmenden Region konnte eine Vielzahl von Genkandidaten identifiziert werden (Tabelle D7). Einzelne dieser Gene sind dupliziert, während orthologe Gene in anderen Fischarten oder Tetrapoden als Einzelgene vorzufinden sind. Genduplikationen und Genamplifikationen scheinen ein häufig auftretendes Phänomen der geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus* zu sein. Beispiele für Genduplikation sind neben der häufig erwähnten Duplikation von *egfrb*, aus der das *Xmrk*-Onkogen entstand, die Genduplikation von *fredi*, oder Genamplifikation von *mc4r* oder *droscha* (Voff et al., 2003). Die Genduplikationen und Genamplifikationen scheinen

evolutiv gesehen relativ jung zu sein, da Sequenzdatenvergleiche kaum Unterschiede in der Nukleotidsequenz aufwiesen [Volff et al., 2003; Meierjohann et al., 2004].

Genduplikationen sind an der Evolution der Genexpression und Genfunktion beteiligt, da durch die Genomumordnung Gene in ein neues Umfeld gelangen und unter die Aktivität eines neuen Promoters gestellt werden können. Welchen Einfluss das genomische Umfeld auf die Expression und Funktion eines duplizierten Gens hat, wurde bisher kaum untersucht. Für *Xmrk* ist vorgeschlagen worden, dass neben dem genomischen Umfeld das transponierbare Element *Xir* in die veränderte Genexpression involviert und letztendlich an der Melanomentstehung beteiligt sein könnte [Volff et al., 2003, Meierjohann et al., 2004].

### 2.2.2 Pseudogene und deren Einfluss auf den Mechanismus der Geschlechtschromosomendifferenzierung

Einige der Duplikate der geschlechtsbestimmenden Region stellen Pseudogene dar. Dazu zählen verschiedene *mc4r*-Kopien, bei denen die codierende Sequenz durch Stop-Codons unterbrochen ist (Froschauer, 2003; Volff et al., 2003), die X-chromosomalen *fredi*-Allele (siehe oben) oder *Y-cript*. Pseudogene sind ein Charakteristikum differenzierender Geschlechtschromosomen. Diese entstehen häufig in der nichtrekombinierenden Region auf dem degenerierten oder sich differenzierenden Chromosom [Charlesworth et al., 2005; Graves, 2006]. Die meisten Pseudogene in der geschlechtsbestimmenden Region konnten jedoch auf beiden Chromosomen identifiziert werden. Die Pseudogene *Y-cript* und *fredi* stellen jedoch Ausnahmen dar.

*Y-cript* stellt eine Y-spezifische Kopie dar, dessen codierende Sequenz durch ektopische homologe Rekombination zweier endogener Retroelemente stark verkürzt (Froschauer et al., 2003; Kapitel E2.1.3) ist. Lokalisiert ist *Y-cript* in der duplizierten Region auf dem Y Chromosom. Diese genomische Umordnung könnte Einfluss auf die homologe Rekombination in diesem Bereich haben. Ob die Pseudogenentstehung von *Y-cript* jedoch auf eine mögliche unterdrückte homologe Rekombination zurückzuführen sein könnte, bleibt zu untersuchen.

Die Pseudogenentstehung der X-chomosomalenen *fredi*-Kopien (Kapitel E2.1.3) inspiriert zu einem alternativen Mechanismus zur Differenzierung von Geschlechtschromosomen: Durch das Einspringen des Transposons *MIToy* in die codierende Sequenz von *fredi* auf einem Chromosom würde dieses zum proto-X Chromosom, das Chromosom mit den mutmaßlich intakten *fredi*-Kopien würde entsprechend zum proto-Y Chromosom. Die



Insertion von *MIToy* in den X-chromsomalen Kopien beeinflusst die homologe Rekombination zwischen den proto-Geschlechtschromosomen und könnte eine Rolle bei der molekularen Differenzierung hin zu diversen Geschlechtschromosomen spielen. Der Degenerierungsprozess des Y Chromosoms bei *Xiphophorus maculatus* ist kaum fortgeschritten. Dennoch könnte homologe Rekombination durch die Insertion von *MIToy* zwischen den X und Y chromosomal *fredi* Kopien unterdrückt sein. Gene in der nicht rekombinierenden Region sind häufig von Mutationen, die zu Pseudogenenstehung führt betroffen [Charlesworth et al, 2005, Steinemann und Steinemann, 2005]. Wenn es sich bei *fredi* um ein Gen handelt, das bei der Geschlechtsbestimmung und/oder Geschlechtsdifferenzierung eine Rolle spielt müsste ein Mechanismus vorliegen, der die Y-chromosomal *fredi*-Kopien vor zerstörenden Mutationen und der Pseudogenenstehung bewahrt. Eine Möglichkeit wäre eine homologe Rekombination zwischen den Y-chromosomal Kopien, eine Art Selbstheilungsmechanismus, der auch für duplizierte Y-spezifische Gene auf dem Y Chromosom des Menschen angenommen wird und für die Gene *OlaflankR* und *OlaflankL*, die die Y-spezifische geschlechtsbestimmende Region in Medaka flankieren, vorgeschlagen wurde [Kondo et al., 2006].

### 2.2.3 Die Genkandidaten *fah* und *tan*

#### 2.2.3.1 *Fah* und *tan* entstanden mutmaßlich durch ein altes Genduplikationsereignis

Die meisten Genduplikationen und Genamplifikationen in der geschlechtsbestimmenden Region lassen sich mutmaßlich auf die Instabilität der genomischen Region zurückführen und scheinen evolutiv gesehen relativ jung zu sein (Kapitel E2.2.4) [Volf et al.2003, Volf und Scharl 2003, Froschauer et al., 2001]. Auch die Genkandidaten *fah* und *tan* scheinen durch Duplikation eines der beiden Gene entstanden zu sein. Welches der beiden Gene das ursprünglichere darstellt, konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise konnten außerhalb der Fischarten, in Tetrapoden, lediglich ein orthologes Einzelgen identifiziert werden und in Invertebraten scheint das Gen gar nicht vorzukommen. Daher stellt sich die Frage, ob *fah* und *tan* durch die Fisch-spezifische Genom-Duplikation [Meyer und Scharl 1999] entstanden sind. Einige Ergebnisse wie die Kopplung von *fah* und *tan* in mehreren Fischarten sowie die geringe Sequenzähnlichkeit in der Nukleotidzusammensetzung sprächen gegen eine Duplikation im Zuge der FSGD. Durch FSGD entstandene Gene liegen meist auf unterschiedlichen Chromosomen [Taylor

et al., 2001, Volff, 2005]. Darüber hinaus ist die Nukleotidsequenz sehr divergiert und Homologien sind lediglich in der Aminosäuresequenz signifikant, was auf ein sehr altes Duplikationsereignis hindeutet. Daher könnte es sich um ein älteres Duplikationsereignis als die FSGD handeln.

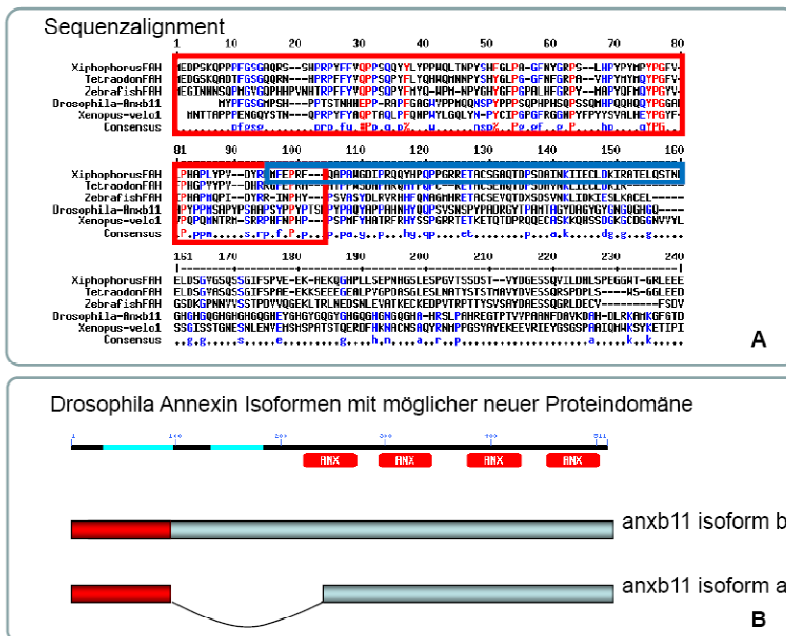
Zum Nachweis der Theorie einer alten Genduplikation, sollten *fah* und *tan* in Tetrapoden, außerhalb der Vertebraten oder in Fischarten, in denen keine Tetraploidisierung nachgewiesen wurde, dupliziert vorliegen. In Tetrapoden liegt *fah/tan* jedoch nur als Einzelgen vor, was anhand von Datenbankanalysen nachgewiesen werden konnte und außerhalb der Vertebraten können *fah* und/oder *tan* weder als dupliziertes noch als Einzelgen nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit zum Nachweis einer FSGD-unabhängigen Duplikation bestünde in der Untersuchung in Fischarten wie beispielsweise dem Stör, die keine FSGD des Genoms aufweisen. Könnten *fah* und *tan* dupliziert nachgewiesen werden, wäre ein Duplikat mit dem Übergang zu den Tetrapoden und damit zum Landleben verloren gegangen.

### **2.2.3.2 Funktion von *fah* und *tan* und Identifizierung einer möglichen neuen Proteindomäne in *fah* und *tan***

Bioinformatische Analysen konnten kein Proteinmotiv oder konservierte Domäne identifizieren, die auf die Funktion von *fah* und/oder *tan* hinweisen könnten. Durch Expressionsanalysen in verschiedenen Fischarten wurden *fah* und *tan* als maternal exprimierte Gene nachgewiesen, deren RNA in der Oocyte eingelagert wird, wie es auch für das *fah/tan* Ortholog *Xvelo* in *Xenopus* beschrieben wurde [Claussen und Pieler., 2004]. Maternalfaktoren spielen bei frühen Entwicklungsprozessen eine Rolle. Alle Prozesse, die vor der Aktivierung des zygotischen Genoms ablaufen, werden von Maternalfaktoren gesteuert. Dazu zählen Achsenformation, Keimbahn- und Keimzellspezifizierung [Pelegri, 2003]. Welche Funktion *fah* und *tan* in der frühen Embryonalphase übernehmen, ist bisher nicht bekannt. Mittels antisense knock down Experimenten (Morpholinos) in Zebrafisch und Medaka könnte die Funktion von *fah* und *tan* untersucht werden. Morpholino Knock down Experimente sind auch in *Xenopus* möglich. Damit könnte die Funktion von *fah/tan* mit der von *Xvelo* verglichen werden.

Multiple Sequenzalignment wies eine Syntenie zwischen *fah* und *Xvelo* und dem N-Terminus des Proteins Annexin 11 aus *Drosophila* nach (Abb. E2 A roter Kasten). Annexine sind eine Familie calcium- und phospholipidbindender Proteine mit konservierter Proteindomäne aus etwa 70 Aminosäureresten, die sich 4-8-mal im Molekül

wiederholt [Römpp 2000]. Die Homologie zwischen *fah*/Xvelo und Annexin 11 befindet sich jedoch vor den sich wiederholenden Annexindomänen im N-terminalen Bereich des Proteins. Datenbankanalysen wiesen zwar keine bekannte Proteindomäne in diesem Bereich nach, aber ein gehäuftes Auftreten der Aminosäure Prolin. Proline spielen bei der Tertiärstruktur von Proteinen eine Rolle und werden als Helixbrecher beschrieben [Römpp, 2000]. Prolinreiche Sequenzen wurden in Transkriptionsfaktor-domänen beschrieben [Mermod et al., 1989] und die Aktivität eines Transkriptionsfaktors kann durch künstliches Anfügen homopolymerischer Prolin-Wiederholungen moduliert werden [Gerber et al., 1994]. Daher könnte es sich bei diesem Abschnitt um bisher unbekannte Proteindomäne handeln, die möglicherweise aufgrund der maternalen Expression eine Rolle bei Entwicklungsvorgängen spielen könnte und/oder ein Transkriptionsfaktor darstellen könnte.



**Abb E2:** (A) Proteinsequenzvergleich zwischen *fah* aus verschiedenen Fischarten, Xvelo aus *Xenopus* und Annexin 11 aus *Drosophila*. Roter Kasten umrandet die homologe Region im N-Terminus der Aminosäuresequenzen. Blauer Kasten umrandet den N-terminalen Bereich der möglichen Isoform herrenfahrrad in *Xiphophorus maculatus*. (B) Schematische Darstellung von Annexin 11 mit den Annexindomänen (roter Kasten mit ANX beschriftet) in *Drosophila*. Die potentielle neue Proteindomäne (roter Bereich) ist dem konservierten Bereich der Wiederholung der Annexindomänen (hellblauer Bereich) in beiden Annexin 11 Isoformen aus *Drosophila* vorgeschaltet.

**2.2.3.3 Fah, ein möglicher Kandidat für Geschlechtsbestimmung und Geschlechtsdifferenzierung in *Xiphophorus maculatus***

Neben der Expression im Ovar konnte in *Xiphophorus maculatus* eine im Hoden exprimierte Isoform identifiziert werden. Im Gegensatz zu dem im Ovar exprimierten

Produkt ist *herrenfahrrad* im 5' Bereich des Gens verkürzt und weist ein alternatives Startcodon auf, wodurch die potentielle neue Proteindomäne in *herrenfahrrad* nicht vorhanden ist (Abb. E2 A blauer Kasten). Da in der Nukleotidsequenz zwischen X und Y chromosomaler Kopie keine Unterschiede identifiziert werden konnten, ist bisher nicht klar, welches Allel –X oder Y Chromosom- die Isoform *herrenfahrrad* exprimiert. Daher scheinen Untersuchungen der Promoterregion von *fah* für beide Allele unerlässlich. Stellte sich heraus, dass die Y-chromosomale Kopie für die verkürzte Isoform verantwortlich ist, könnte *fah* einen Anwärter auf den Geschlechtsbestimmungslocus oder ein Kandidat für die Geschlechtsdifferenzierung darstellen.

Alternatives Spleißen spielt in Geschlechtsbestimmungsmechanismen eine regulatorische Rolle und es wird angenommen, dass es sich dabei um einen gemeinsamen regulatorischen Mechanismus der Geschlechtsbestimmung handelt, der in verschiedenen Tier- und Pflanzenstämmen vorzufinden ist [Lalli et al., 2003]. Spleißvarianten regulatorischer geschlechtsbestimmender Gene sind nicht nur in den Geschlechtsbestimmungsmechanismus in *Drosophila* involviert. Auch *SRY*, das geschlechtsbestimmende Gen der Säugetiere (Theria) und andere Proteine der SOX-Familie, spielen eine Rolle bei Spleißvorgängen und wurden in der Umgebung Spleißfaktoren im Zellkern nachgewiesen [Misteli et al., 2000].

Für eine Rolle bei der Geschlechtsbestimmung und Geschlechtsdifferenzierung spräche auch die Tatsache, dass *fah* und *tan* kaum Sequenzhomologien in der Nukleotidsequenz aufweisen und Gene, die an der Geschlechtsbestimmung bzw. Geschlechtsdifferenzierung beteiligt sind schneller evolvieren als Gene, die nicht geschlechtsspezifisch sind [Civetta und Singh, 1995].

Handelt es sich bei *fah* um ein Gen, das in der Geschlechtsbestimmung und/oder Geschlechtsdifferenzierung in Fischen eine Rolle spielt, erhält das Zitat der Frauenbewegung „Eine Frau ohne Mann ist wie ein Fisch ohne Fahrrad“ eine ganz neue Bedeutung. Männer wären für dann Frauen genauso essentiell, wie *Fahrrad* für die Geschlechtsbestimmung der Fische.

### **3 Vergleichende Genomanalyse der geschlechtsbestimmenden Region mit Fisch und Tetrapoden**

Syntenie zwischen der geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus* und den Geschlechtschromosomen von Medaka, Stichling oder Fugu konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Auch die Geschlechtschromosomen von Medaka, Fugu und

Stichling zeigen keine Syntenien untereinander -wie molekulare Untersuchungen der geschlechtsbestimmenden Region zeigen konnten [Peichel et al., 2005; Kondo et al., 2006, Kikuchi et al., 2007]-, was darauf hinweist, dass sich die Geschlechtschromosomen in Fischen aus unterschiedlichen Chromosomenpaaren des gemeinsamen Vorfahren entwickelten [Charlesworth, 2004; Volff et al., 2007]. Möglicherweise entwickeln sich Geschlechtschromosomen und Geschlechtsbestimmungsmechanismen in Fisch generell immer wieder neu [Volff et al., 2007] und es stellt sich die Frage, ob ursprüngliche Fischgeschlechtschromosomen und ein konservierter Geschlechtsbestimmungsmechanismus aus denen sich die anderen Mechanismen und die Evolution der Geschlechtschromosomen in Fisch abgeleitet haben nachvollzogen werden kann.

Im Vergleich zu Menschen und Vögeln repräsentieren die meisten Fischarten junge Geschlechtschromosomen in einer frühen evolutionären Phase [Charlesworth 2004], die kaum Degenerierung zwischen den heterozygotischen Geschlechtschromosomen aufweisen [Volff et al., 2007]. Dies konnte anhand von molekularen Untersuchungen der geschlechtsbestimmenden Regionen von Stichling [Peichel et al., 2005] und Medaka [Kondo et al., 2006] nachgewiesen werden.

Die geschlechtsbestimmende Region von Medaka liegt auf dem Y Chromosom und entstand durch transchromosomale Duplikation eines 43 kb großen Segmentes der Kopplungsgruppe 9. Aufgrund fehlender homologer Rekombination sammelten sich transponierbare Elemente, Wiederholungssequenzen und weitere transchromosomale Duplikationen in der Region an und vergrößerten die Region auf 258 kb. Bis auf *dmrt1bY*, dem geschlechtsbestimmenden Gen, degenerierten die übrigen Gene zu Pseudogenen. Die Geschlechtschromosomenentstehung in Medaka wird daher als evolutiv mit 10 Millionen Jahre sehr jung angesehen, scheint linienspezifisch zu sein und könnte aufgrund der Duplikation einer kompletten genomischen Region eher einen Sonderfall bei der Entstehung von Geschlechtschromosomen darzustellen [Kondo et al., 2006]

In der geschlechtsbestimmenden Region beim Stichling auf der Kopplungsgruppe 19 konnten Y-spezifische transponierbare Elemente und Wiederholungssequenzen sowie lokale Y-spezifische Duplikationen nachgewiesen werden, die auf beginnende Differenzierung der Geschlechtschromosomen hindeuten. Hinweise auf Geschlechtschromosomen im frühen evolutiven Stadium liefern identifizierte geschlechtschromosomale Gene, die auf beiden Geschlechtschromosomen nachgewiesen

wurden und in anderen Schwesterarten autosomal lokalisiert sind. Das geschlechtsbestimmende Gen konnte bisher noch nicht identifiziert werden und bisher wurde kein Anwärter auf den Geschlechtsbestimmungslocus beschrieben [Peichel et al., 2005].

Auch die Geschlechtschromosomen von *Xiphophorus maculatus* sind Geschlechtschromosomen in einem frühen evolutiven Stadium. Vergleicht man den Geninhalt (Tabelle D7) der geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus* mit anderen Fischarten, scheint diese Region in Fisch konserviert zu sein. Genomanalysen wiesen eine hohe Syntenie zwischen der geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus* und dem Scaffold 14565 von *Tetraodon* sowie Scaffold 103 auf Chromosom 20 von Medaka nach. Im Zebrafisch sind orthologe Gene dieser Region auf zwei Kopplungsgruppen aufgeteilt (2 und 12) (Kapitel D 2.2.2.8). Die geschlechtsbestimmende Region scheint aber im Vergleich zu den syntenischen Regionen genomisch instabiler zu sein. Einige Gene, wie *drosha* und *mc4r*, des konservierten Bereiches, sind im Gegensatz zu den untersuchten Fischarten in der geschlechtsbestimmenden Region von *Xiphophorus maculatus* dupliziert bzw. amplifiziert. Darüber hinaus konnten eine Vielzahl von transponierbaren Elementen und Genomumordnungen identifiziert werden. Der Grund für die genomische Plastizität ist bisher unklar, könnte aber für die Vielfältigkeit der Geschlechtsbestimmung, den unterschiedlichen Beginn der Geschlechtsreife und den phänotypisch variable Ausprägung der Melanome in *Xiphophorus* verantwortlich sein, da deren kontrollierenden Genloci in der geschlechtsbestimmenden Region lokalisiert sind [Froschauer et al., 2001, Volff und Schartl, 2003; Volff et al., 2007].

Vergleicht man den Geninhalt der geschlechtsbestimmenden Region mit dem Menschen, sind orthologe Gene auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert (siehe Tabelle D7). Interessanterweise ist eine orthologe, von Stopcodons durchzogene Pseudogensequenz von *fah* beim Menschen und Schimpansen auf dem X Chromosom in der Nähe von *Sox3*, dem mutmaßlichen Vorfahren des geschlechtsbestimmenden Gens der Säugetiere, lokalisiert. *Fah*, der einen Anwärter für den Geschlechtsbestimmungslocus in *Xiphophorus maculatus* darstellt, konnte darüber hinaus in den syntenischen Regionen von Medaka, *Tetraodon* und Zebrafisch nachgewiesen werden. Auch beim südamerikanischen Krallenfrosch konnte eine orthologe *fah*-Sequenz namens *velo* identifiziert werden. Dies könnte auf eine über 450 Millionen Jahre alte

geschlechtsbestimmende Region hinweisen, die in Fisch bis heute eine Rolle bei der Geschlechtsbestimmung bzw. Geschlechtsdifferenzierung übernimmt.

Andererseits ist die geschlechtsbestimmende Region syntenisch zum menschlichen Chromosom 2. Orthologe Gene der geschlechtsbestimmenden Region (siehe Tabelle D7) sind auf dem menschlichen Chromosom 2 lokalisiert, das eine Rolle bei der Geschlechtsbestimmung beim Menschen spielt. Dies konnte durch Patienten mit Mutationen in der Region 2q32 nachgewiesen werden. Trotz männlichen XY Genotyps weisen betroffene Patienten einem weiblichen Phänotyp auf [Fryssira et al., 1998]. Orthologe Gene zu *acr* und *tmef* (Tabelle D7) konnten in unmittelbarer Nachbarschaft des bisher noch unbekanntes geschlechtsbestimmenden Gens identifiziert werden. Damit wäre ein Mechanismus der Entstehung von Geschlechtschromosomen und der Geschlechtsbestimmung bei *Xiphophorus* vorstellbar. Das geschlechtsbestimmende Gen auf Chromosom 2, das weiter unten in der geschlechtsbestimmenden Kaskade stünde, wäre in *Xiphophorus maculatus* an die Spitze der geschlechtsbestimmenden Kaskade rekrutiert worden. Somit wäre ein Chromosom, das von Beginn an in die Geschlechtsbestimmung involviert ist und bereits ein geschlechtsbestimmendes Gen trägt, zum Geschlechtschromosom umfunktioniert worden.

Die Identifizierung des geschlechtsbestimmenden Gens in *Xiphophorus maculatus* wird Aufschluss über das evolutive Alter der Geschlechtschromosomen und die Allgemeingültigkeit des Geschlechtsbestimmungsmechanismus geben. Interessant ist auch die Untersuchung des Geschlechtsbestimmungsmechanismus in weiblichen heterogametischen Populationen um herauszufinden, ob und welcher Zusammenhang zwischen den beiden heterogametischen Systemen besteht.

Die möglicherweise immer neu entstehenden Geschlechtschromosomen und ständig wechselnden Mechanismen der Geschlechtsbestimmung in Fisch wären theoretisch eine Möglichkeit für das Fortbestehen der Menschheit, wenn *SRY* in einigen Millionen Jahren verschwunden sein wird [Graves, 2002, Volf et al., 2007].



## F. Anhang

### 1. Tabellen

**Tabelle 1:** Klone der verschiedenen X- und Y-chromosomalen Contigs. (Legende: **Fett** markierte Klone: Endfragment-Hybridisierungsanalysen wurden in dieser Arbeit durchgeführt; \* Klone, die zur Sequenzierung ausgewählt wurden; \*\* bereits sequenzierte Klone; n.b. : nicht bestimmt).

Klon	identifiziert mit Sonde:	Contig	Chromosom	Größe der Klone in kb	Kapitel
A03	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>Xmrk</i> -Contig	X Chromosom	230	
A04	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>egfrb</i> -Contig	Y Chromosom	165	
A05	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>egfrb</i> -Contig	X Chromosom	170	
A06**	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>Xmrk</i> -Contig	Y Chromosom	230	
A07	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>Xmrk</i> -Contig	Y Chromosom	195	
A08	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>egfrb</i> -Contig	Y Chromosom	160	
A09	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>Xmrk</i> -Contig	X Chromosom	175	
A10	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>egfrb</i> -Contig	X Chromosom	150	
A11	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>egfrb</i> -Contig	Y Chromosom	200	
A12	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>egfrb</i> -Contig	X Chromosom	190	
A13	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>Xmrk</i> -Contig	Y Chromosom	150	
A14	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>Xmrk</i> -Contig	X Chromosom	215	
A15	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>Xmrk</i> -Contig	X Chromosom	180	
A16	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>Xmrk</i> -Contig	Y Chromosom	160	
A17	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>Xmrk</i> -Contig	Y Chromosom	175	
A18	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>egfrb</i> -Contig	Y Chromosom	160	
A19	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>Xmrk</i> -Contig	X Chromosom	179	
A21	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>egfrb</i> -Contig	X Chromosom	165	
A24	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>egfrb</i> -Contig	Y Chromosom	225	
A25	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>Xmrk</i> -Contig	Y Chromosom	170	
A26	<i>Xmrk</i> (plasmid G4)	<i>egfrb</i> -Contig	X Chromosom	180	
<b>AA05</b>	<i>cad</i> (PCR-Product)	<i>cad20-Contig</i>	X Chromosom	194	Kapitel 1.3.4.1
<b>AA12</b>	<i>cad</i> (PCR-Product)	<i>cad20-Contig</i>	X Chromosom	n.b.	Kapitel 1.5.1
<b>AB1**</b>	<i>fah</i> (PCR Produkt)	<i>Xmrk</i> -Contig	Y Chromosom	195	Kapitel 1.4
<b>AB2</b>	<i>fah</i> (PCR Produkt)	<i>Xmrk</i> -Contig	Y Chromosom	n.b.	Kapitel 1.4
B01	<i>mc4r</i> (PCR Xmc4r F1 x R1/ pROST53)	<i>egfrb</i> -Contig	n.b.	160	
B02	<i>mc4r</i> (PCR Xmc4r F1 x R1/ pROST53)	<i>Xmrk</i> -Contig	X Chromosom	150	
B04	<i>mc4r</i> (PCR Xmc4r F1 x R1/ pROST53)	<i>Xmrk</i> -Contig zuvor <i>Y-crypt</i> -Contig	Y Chromosom	220	
B05	<i>mc4r</i> (PCR Xmc4r F1 x R1/ pROST53)	<i>egfrb</i> -Contig	Y Chromosom	179	
B06	<i>mc4r</i> (PCR Xmc4r F1 x R1/ pROST53)	<i>Xmrk</i> -Contig	X Chromosom	157	

<b>B07</b>	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig	Y Chromosom	240	Kapitel 1.3.1
B08	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig	X Chromosom	200	
B09	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	egfrb-Contig	n.b.	160	
B10	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig	X Chromosom	170	
B11	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig	X Chromosom	150	
B13	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	150	
B14	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	175	
B15	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	n.b.	
<b>B16</b>	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig	Y Chromosom	50	Kapitel 1.3.1
B17	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	190	
B18	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig	Y Chromosom	170	
B19	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig	X Chromosom	165	
B20	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	egfrb-Contig	Y Chromosom	170	
B21	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	180	
B22	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig	X Chromosom	180	
B23	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig	X Chromosom	160	
B24	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig	X Chromosom	220	
B26**	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	165	
<b>B27</b>	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig	Y Chromosom	180	Kapitel 1.3.1
<b>B28</b>	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	egfrb-Contig	n.b.	190	Kapitel 1.7
B29	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	210	
B30	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	egfrb-Contig	Y Chromosom	157	
B31**	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig	X Chromosom	180	
B32	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig	X Chromosom	170	
<b>B33</b>	<i>mc4r</i> (PCR Xmc <sub>r</sub> F1 x R1/ pROST53)	Xm <sub>r</sub> k-Contig	X Chromosom	150	
C03	<i>cript</i> (PCR Xcript-F1 x R1)	Xm <sub>r</sub> k-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	190	
<b>C08</b>	<i>cript</i> (PCR Xcript-F1 x R1)	egfrb-Contig	Y Chromosom	189	Kapitel 1.7
E01	090H19-Pvull-SP6 (Cosmid 5'INV)	egfrb-Contig	Y Chromosom	145	
E03	090H19-Pvull-SP6 (Cosmid 5'INV)	egfrb-Contig	n.b.	165	
E04	090H19-Pvull-SP6 (Cosmid 5'INV)	egfrb-Contig	n.b.	170	
E05	090H19-Pvull-SP6 (Cosmid 5'INV)	egfrb-Contig	Y Chromosom	146	
F08	090H19-Pvull-SP6 (Cosmid 5'INV)	egfrb-Contig	n.b.	153	

E10	090H19-Pvull-SP6 (Cosmid 5'INV)	egfrb-Contig	n.b.	178
E11	090H19-Pvull-SP6 (Cosmid 5'INV)	egfrb-Contig	X Chromosom	197
E12	090H19-Pvull-SP6 (Cosmid 5'INV)	egfrb-Contig	X Chromosom	184
E19	090H19-Pvull-SP6 (Cosmid 5'INV)	egfrb-Contig	Y Chromosom	162
F01	rnaseIII (PCR pROST72-F1 x R1)	Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	160
F02	rnaseIII (PCR pROST72-F1 x R1)	Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	25
F04	rnaseIII (PCR pROST72-F1 x R1)	egfrb-Contig	Y Chromosom	179
F05	rnaseIII (PCR pROST72-F1 x R1)	keine Zuordnung	X Chromosom	n.b.
F06	rnaseIII (PCR pROST72-F1 x R1)	Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	145
F08**	rnaseIII (PCR pROST72-F1 x R1)	Xmrk-Contig	Y Chromosom	196
F11	rnaseIII (PCR pROST72-F1 x R1)	Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	150
F23	rnaseIII (PCR pROST72-F1 x R1)	Xmrk-Contig	Y Chromosom	185
F25	rnaseIII (PCR pROST72-F1 x R1)	Xmrk-Contig	Y Chromosom	176
F44	rnaseIII (PCR pROST72-F1 x R1)	Xmrk-Contig	X Chromosom	186
G01	A10-FOR (3' INV)	egfrb-Contig	X Chromosom	145
G04	A10-FOR (3' INV)	egfrb-Contig	Y Chromosom	170
H75	B6-HinclI-REV	Xmrk-Contig	X Chromosom	152
H93	B6-HinclI-REV	Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	160
I01	V10-HinclI-REV	egfrb-Contig	X Chromosom	170
I02	V10-HinclI-REV	egfrb-Contig	n.b.	227
I03	V10-HinclI-REV	egfrb-Contig	n.b.	153
I04	V10-HinclI-REV	egfrb-Contig	n.b.	173
I06	V10-HinclI-REV	egfrb-Contig	X Chromosom	150
J02	Z7-HinclI-FOR	egfrb-Contig	n.b.	n.b.
J03	Z7-HinclI-FOR	egfrb-Contig	n.b.	137
K26	TnH7 (PCR-Produkt)	Xmrk-Contig	X Chromosom	152
M01**	E1-Pvull-REV	egfrb-Contig	Y Chromosom	192
M02	E1-Pvull-REV	egfrb-Contig	X Chromosom	178
M03	E1-Pvull-REV	egfrb-Contig	X Chromosom	193
M04	E1-Pvull-REV	egfrb-Contig	Y Chromosom	172
M05	E1-Pvull-REV	egfrb-Contig	Y Chromosom	187
M06	E1-Pvull-REV	egfrb-Contig	X Chromosom	183

M07	E1-PvuII-REV		egfrb-Contig	X Chromosom	171
M08	E1-PvuII-REV		egfrb-Contig	Y Chromosom	140
M09	E1-PvuII-REV		egfrb-Contig	Y Chromosom	145
M15	E1-PvuII-REV		egfrb-Contig	Y Chromosom	188
N20	B17-DraI-FOR		Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	160
O02	B26-PvuII-FOR		Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	155
O03	B26-PvuII-FOR		Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	165
O04	B26-PvuII-FOR		Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	190
P01	Acetylcholin Rezeptor (acr H75-16)		egfrb-Contig	X Chromosom	154
P02	Acetylcholin Rezeptor (acr H75-16)		egfrb-Contig	n.b.	n.b.
P04	Acetylcholin Rezeptor (acr H75-16)		egfrb-Contig	n.b.	164
P05	Acetylcholin Rezeptor (acr H75-16)		egfrb-Contig	n.b.	179
P06	Acetylcholin Rezeptor (acr H75-16)		egfrb-Contig	X Chromosom	211
<b>P07</b>	Acetylcholin Rezeptor (acr H75-16)		egfrb-Contig	X Chromosom	204
R01	N20-RsaI-REV		Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	150
R19	N20-RsaI-REV		Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	170
<b>T12</b>	F1-FOR		keine Zuordnung	X Chromosom	n.b.
U01	M2-HincII-FOR		egfrb-Contig	n.b.	155
U02	M2-HincII-FOR		egfrb-Contig	Y Chromosom	175
U05	M2-HincII-FOR		egfrb-Contig	n.b.	170
U06	M2-HincII-FOR		egfrb-Contig	X Chromosom	151
U07	M2-HincII-FOR		egfrb-Contig	X Chromosom	204
U08	M2-HincII-FOR		egfrb-Contig	X Chromosom	205
U09	M2-HincII-FOR		egfrb-Contig	X Chromosom	153
V08	Y3-RsaI-REV		egfrb-Contig	n.b.	159
V09	Y3-RsaI-REV		egfrb-Contig	n.b.	146
V10	Y3-RsaI-REV		egfrb-Contig	n.b.	170
V11	Y3-RsaI-REV		egfrb-Contig	n.b.	172
W01	F6-EcoRV-FOR		Xmrk-Contig	X Chromosom	n.b.
<b>W02**</b>	F6-EcoRV-FOR		cad20-Contig	X Chromosom	170
W04	F6-EcoRV-FOR		Xmrk-Contig	X Chromosom	n.b.
W05	F6-EcoRV-FOR		Xmrk-Contig	X Chromosom	n.b.
					Kapitel 1.7
					Kapitel 1.6
					Kapitel 1.5.2

W07	F6-EcoRV-FOR	Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	n.b.	
W09*	F6-EcoRV-FOR	Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	194	
W11	F6-EcoRV-FOR	Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	n.b.	
W12	F6-EcoRV-FOR	Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	n.b.	
W13	F6-EcoRV-FOR	Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	n.b.	
W14	F6-EcoRV-FOR	Xmrk-Contig zuvor Y-cript-Contig	Y Chromosom	n.b.	
X01	B27-FOR	cau20-Contig	X Chromosom	n.b.	Kapitel 1.5.2
X03*	B27-FOR	cau20-Contig	X Chromosom	145	Kapitel 1.5.2
X06	B27-FOR	Xmrk-Contig	Y Chromosom	160	Kapitel 1.3.3
Y01	U1-PvuII-FOR	egfrb-Contig	n.b.	168	
Y02	U1-PvuII-FOR	egfrb-Contig	n.b.	158	
Y03	U1-PvuII-FOR	egfrb-Contig	n.b.	142	
Y04	U1-PvuII-FOR	egfrb-Contig	n.b.	175	
Z01	E19-StuI-REV	egfrb-Contig	Y Chromosom	171	
Z02	E19-StuI-REV	egfrb-Contig	n.b.	134	
Z03	E19-StuI-REV	egfrb-Contig	n.b.	159	
Z04	E19-StuI-REV	egfrb-Contig	n.b.	154	
Z05	E19-StuI-REV	egfrb-Contig	n.b.	134	
Z07	E19-StuI-REV	egfrb-Contig	Y Chromosom	147	
C131H20 Cosmid	mc4r (PCR Xmcr F1 x R1/ pROST53)	Xmrk-Contig	Y Chromosom	n.b.	Kapitel 1.3.2
C035P16 Cosmid	mc4r (PCR Xmcr F1 x R1/ pROST53)	Xmrk-Contig	Y Chromosom	n.b.	Kapitel 1.3.2
C049F01 Cosmid	mc4r (PCR Xmcr F1 x R1/ pROST53)	Xmrk-Contig	Y Chromosom	n.b.	Kapitel 1.3.2
C009B22 Cosmid	C131H20 T8	Xmrk-Contig	Y Chromosom	n.b.	Kapitel 1.3.2
C122E05 Cosmid	mc4r (PCR Xmcr F1 x R1/ pROST53)	Xmrk-Contig	X Chromosom	n.b.	Kapitel 1.5

## 2. Literaturverzeichnis

- Abad J. P., De Pablos B., Osoegawa K., De Jong P. J., Martin-Gallardo A., and Villasante A. (2004). Genomic analysis of *Drosophila melanogaster* telomeres: full-length copies of HeT-A and TART elements at telomeres. *Mol Biol Evol* **21**: 1613-9.
- Adam D., Dimitrijevic N., and Scharl M. (1993). Tumor suppression in *Xiphophorus* by an accidentally acquired promoter. *Science* **259**: 816-9.
- Aitken R. J., and Marshall Graves J. A. (2002). The future of sex. *Nature* **415**: 963.
- Anders F., Scharl M., and Barnekow A. (1984). *Xiphophorus* as an in vivo model for studies on oncogenes. *Natl Cancer Inst Monogr* **65**: 97-109.
- Anders F., Scharl M., Barnekow A., and Anders A. (1984). *Xiphophorus* as an in vivo model for studies on normal and defective control of oncogenes. *Adv Cancer Res* **42**: 191-275.
- Asakawa S., Abe I., Kudoh Y., Kishi N., Wang Y., Kubota R., Kudoh J., Kawasaki K., Minoshima S., and Shimizu N. (1997). Human BAC library: construction and rapid screening. *Gene* **191**: 69-79.
- Baroiller J. F., and D'Cotta H. (2001). Environment and sex determination in farmed fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **130**: 399-409.
- Birnboim H. C., and Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-23.
- Bjornsson H. T., Ellingsen L. M., and Jonsson J. J. (2006). Transposon-derived repeats in the human genome and 5-methylcytosine-associated mutations in adjacent genes. *Gene* **370**: 43-50.
- Bock M., Heinkelein M., Lindemann D., and Rethwilm A. (1998). Cells expressing the human foamy virus (HFV) accessory Bet protein are resistant to productive HFV superinfection. *Virology* **250**: 194-204.
- Böhne A. (2006). Molekulare und genetische Analyse der swimy-Genfamilie in Fischen. *Diplomarbeit*.
- Brenner S., Elgar G., Sandford R., Macrae A., Venkatesh B., and Aparicio S. (1993). Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature* **366**: 265-8.
- Britten R. J. (2002). Divergence between samples of chimpanzee and human DNA sequences is 5%, counting indels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13633-5.
- Burgtorf C., Welzel K., Hasenbank R., Zehetner G., Weis S., and Lehrach H. (1998). Gridded genomic libraries of different chordate species: a reference library system for basic and comparative genetic studies of chordate genomes. *Genomics* **52**: 230-2.
- Butlin R. (2002). Evolution of sex: The costs and benefits of sex: new insights from old asexual lineages. *Nat Rev Genet* **3**: 311-7.
- Carvalho A. B. (2003). The advantages of recombination. *Nat Genet* **34**: 128-9.
- Charlesworth B. (1991). The evolution of sex chromosomes. *Science* **251**: 1030-3.
- Charlesworth B. (2004). Sex determination: primitive Y chromosomes in fish. *Curr Biol* **14**: R745-7.
- Charlesworth B., and Charlesworth D. (2000). The degeneration of Y chromosomes.



- Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 1563-72.
- Charlesworth B., Sniegowski P., and Stephan W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* **371**: 215-20.
- Charlesworth D., Charlesworth B., and Marais G. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* **95**: 118-28.
- Civetta A., and Singh R. S. (1995). High divergence of reproductive tract proteins and their association with postzygotic reproductive isolation in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis* group species. *J Mol Evol* **41**: 1085-95.
- Claussen M., and Pieler T. (2004). Xvelo1 uses a novel 75-nucleotide signal sequence that drives vegetal localization along the late pathway in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol* **266**: 270-84.
- Cohen D. R., Sinclair A. H., and McGovern J. D. (1994). SRY protein enhances transcription of Fos-related antigen 1 promoter constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 4372-6.
- Crews D., and Fitzgerald K. T. (1980). "Sexual" behavior in parthenogenetic lizards (*Cnemidophorus*). *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 499-502.
- Devlin R., and Nagahama Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influence. *Aquaculture* **208**: 191-364.
- Ezaz T., Valenzuela N., Grutzner F., Miura I., Georges A., Burke R. L., and Graves J. A. (2006). An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: Chelidae) with genetic sex determination. *Chromosome Res* **14**: 139-50.
- Feinberg A. P., and Vogelstein B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem* **137**: 266-7.
- Ferguson M. W., and Joanen T. (1982). Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*. *Nature* **296**: 850-3.
- Feschotte C., Jiang N., and Wessler S. R. (2002). Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat Rev Genet* **3**: 329-41.
- Fischer C., Bouneau L., Coutanceau J. P., Weissenbach J., Ozouf-Costaz C., and Volf J. N. (2005). Diversity and clustered distribution of retrotransposable elements in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Cytogenet Genome Res* **110**: 522-36.
- Fischer J., Maier H., Viell P., and Altenbuchner J. (1996). The use of an improved transposon mutagenesis system for DNA sequencing leads to the characterization of a new insertion sequence of *Streptomyces lividans* 66. *Gene* **180**: 81-9.
- Fornzler D., Altschmied J., Nanda I., Kolb R., Baudler M., Schmid M., and Schartl M. (1996). The Xmrk oncogene promoter is derived from a novel amplified locus of unusual organization. *Genome Res* **6**: 102-13.
- Frohman M. A., Dush M. K., and Martin G. R. (1988). Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 8998-9002.
- Froschauer A. (2003). Identifizierung und molekulare Analyse Xmrk gekoppelter Gene in



- der geschlechtsbestimmenden Region des Genoms von *Xiphophorus maculatus*. *Dissertation*.
- Froschauer A., Korting C., Bernhardt W., Nanda I., Schmid M., Schartl M., and Volff J. N. (2001). Genomic plasticity and melanoma formation in the fish *Xiphophorus*. *Mar Biotechnol (NY)* **3**: S72-80.
- Froschauer A., Korting C., Katagiri T., Aoki T., Asakawa S., Shimizu N., Schartl M., and Volff J. N. (2002). Construction and initial analysis of bacterial artificial chromosome (BAC) contigs from the sex-determining region of the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Gene* **295**: 247-54.
- Furutani-Seiki M., and Wittbrodt J. (2004). Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. *Mech Dev* **121**: 629-37.
- Garnier T., Saurin W., and Cole S. T. (1987). Molecular characterization of the resolvase gene, *res*, carried by a multicopy plasmid from *Clostridium perfringens*: common evolutionary origin for prokaryotic site-specific recombinases. *Mol Microbiol* **1**: 371-6.
- Gerber H. P., Seipel K., Georgiev O., Hofferer M., Hug M., Rusconi S., and Schaffner W. (1994). Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* **263**: 808-11.
- Gomez A., Volff J. N., Hornung U., Schartl M., and Wellbrock C. (2004). Identification of a second *egfr* gene in *Xiphophorus* uncovers an expansion of the epidermal growth factor receptor family in fish. *Mol Biol Evol* **21**: 266-75.
- Gordon M. (1927). The Genetics of a Viviparous Top-Minnow *Platyopocilus*; the Inheritance of Two Kinds of Melanophores. *Genetics* **12**: 253-83.
- Graves J. A. (2006). Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell* **124**: 901-14.
- Grimanelli D., Leblanc O., Perotti E., and Grossniklaus U. (2001). Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends Genet* **17**: 597-604.
- Grutzner F., Deakin J., Rens W., El-Mogharbel N., and Marshall Graves J. A. (2003). The monotreme genome: a patchwork of reptile, mammal and unique features? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **136**: 867-81.
- Grutzner F., Rens W., Tsend-Ayush E., El-Mogharbel N., O'Brien P. C., Jones R. C., Ferguson-Smith M. A., and Marshall Graves J. A. (2004). In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature* **432**: 913-7.
- Gutbrod H., and Schartl M. (1999). Intragenic sex-chromosomal crossovers of *Xmrk* oncogene alleles affect pigment pattern formation and the severity of melanoma in *Xiphophorus*. *Genetics* **151**: 773-83.
- Hamilton W. D., Axelrod R., and Tanese R. (1990). Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 3566-73.
- Herpin A., Rohr S., Riedel D., Kluever N., Raz E., and Schartl M. (2007). Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Dev Biol* **7**: 3.
- Hukriede N. A., Joly L., Tsang M., Miles J., Tellis P., Epstein J. A., Barbazuk W. B., Li F. N., Paw B., Postlethwait J. H., Hudson T. J., Zon L. I., McPherson J. D., Chevrette M., Dawid I. B., Johnson S. L., and Ekker M. (1999). Radiation hybrid

- mapping of the zebrafish genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9745-50.
- Humphray S. J., Oliver K., Hunt A. R., Plumb R. W., Loveland J. E., Howe K. L., Andrews T. D., Searle S., Hunt S. E., Scott C. E., Jones M. C., Ainscough R., Almeida J. P., Ambrose K. D., Ashwell R. I., Babbage A. K., Babbage S., Bagguley C. L., Bailey J., Banerjee R., Barker D. J., Barlow K. F., Bates K., Beasley H., Beasley O., Bird C. P., Bray-Allen S., Brown A. J., Brown J. Y., Burford D., Burrill W., Burton J., Carder C., Carter N. P., Chapman J. C., Chen Y., Clarke G., Clark S. Y., Clee C. M., Clegg S., Collier R. E., Corby N., Crosier M., Cummings A. T., Davies J., Dhimi P., Dunn M., Dutta I., Dyer L. W., Earthrowl M. E., Faulkner L., Fleming C. J., Frankish A., Frankland J. A., French L., Fricker D. G., Garner P., Garnett J., Ghori J., Gilbert J. G., Glison C., Grafham D. V., Gribble S., Griffiths C., Griffiths-Jones S., Grocock R., Guy J., Hall R. E., Hammond S., Harley J. L., Harrison E. S., Hart E. A., Heath P. D., Henderson C. D., Hopkins B. L., Howard P. J., Howden P. J., Huckle E., Johnson C., Johnson D., Joy A. A., Kay M., Keenan S., Kershaw J. K., Kimberley A. M., King A., Knights A., Laird G. K., Langford C., Lawlor S., Leongamornlert D. A., Leversha M., Lloyd C., Lloyd D. M., Lovell J., Martin S., Mashreghi-Mohammadi M., Matthews L., McLaren S., McLay K. E., et al. (2004). DNA sequence and analysis of human chromosome 9. *Nature* **429**: 369-74.
- Izsvak Z., Ivics Z., Shimoda N., Mohn D., Okamoto H., and Hackett P. B. (1999). Short inverted-repeat transposable elements in teleost fish and implications for a mechanism of their amplification. *J Mol Evol* **48**: 13-21.
- Jansohn M. H. (2007). *Gentechnische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag* **4. Auflage**.
- Jin V. X., O'Geen H., Iyengar S., Green R., and Farnham P. J. (2007). Identification of an OCT4 and SRY regulatory module using integrated computational and experimental genomics approaches. *Genome Res* **17**: 807-17.
- Jordan S. A., and Jackson I. J. (1998). Melanocortin receptors and antagonists regulate pigmentation and body weight. *Bioessays* **20**: 603-6.
- Just W., Rau W., Vogel W., Akhverdian M., Fredga K., Graves J. A., and Lyapunova E. (1995). Absence of Sry in species of the vole *Ellobius*. *Nat Genet* **11**: 117-8.
- Kallman K. D., and Ed. Turner B. J. (1984). A new look at sex determination in poeciliid fishes. *In: Evolutionary Genetics in fish (Plenum Publishing Corporation, New York)* **4**: 95-171.
- Kane D. A., and Kimmel C. B. (1993). The zebrafish midblastula transition. *Development* **119**: 447-56.
- Kawai A., Nishida-Umehara C., Ishijima J., Tsuda Y., Ota H., and Matsuda Y. (2007). Different origins of bird and reptile sex chromosomes inferred from comparative mapping of chicken Z-linked genes. *Cytogenet Genome Res* **117**: 92-102.
- Kazianis S., Morizot D. C., Coletta L. D., Johnston D. A., Woolcock B., Vielkind J. R., and Nairn R. S. (1999). Comparative structure and characterization of a CDKN2 gene in a Xiphophorus fish melanoma model. *Oncogene* **18**: 5088-99.
- Kidwell M. G. (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* **115**: 49-63.

- Kikuchi K., Kai W., Hosokawa A., Mizuno N., Suetake H., Asahina K., and Suzuki Y. (2007). The sex-determining locus in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics* **175**: 2039-42.
- Knoll A. H. (1992). The early evolution of eukaryotes: a geological perspective. *Science* **256**: 622-7.
- Kohn M., Kehrer-Sawatzki H., Vogel W., Graves J., and Hameister H. (2004). Wide genome comparisons reveal the origins of the human X chromosome. In "Trends Genet." pp. 598-603.
- Kondo M., Froschauer A., Kitano A., Nanda I., Hornung U., Volff J. N., Asakawa S., Mitani H., Naruse K., Tanaka M., Schmid M., Shimizu N., Scharl M., and Shima A. (2002). Molecular cloning and characterization of DMRT genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Gene* **295**: 213-22.
- Kondo M., Hornung U., Nanda I., Imai S., Sasaki T., Shimizu A., Asakawa S., Hori H., Schmid M., Shimizu N., and Scharl M. (2006). Genomic organization of the sex-determining and adjacent regions of the sex chromosomes of medaka. *Genome Res* **16**: 815-26.
- Kondo M., Nanda I., Hornung U., Schmid M., and Scharl M. (2004). Evolutionary origin of the medaka Y chromosome. *Curr Biol* **14**: 1664-9.
- Kools P., Van Imschoot G., and van Roy F. (2000). Characterization of three novel human cadherin genes (CDH7, CDH19, and CDH20) clustered on chromosome 18q22-q23 and with high homology to chicken cadherin-7. *Genomics* **68**: 283-95.
- Kosswig C. (1928). Über Kreuzungen zwischen Teleostiern *Xiphophorus hellerii* und *Platycephalus maculatus*. *Indukt.-Abstammungs.-Vererbungsbl.* **47**.
- Lahn B. T., and Page D. C. (1999). Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* **286**: 964-7.
- Lahn B. T., Pearson N. M., and Jégalian K. (2001). The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Rev Genet* **2**: 207-16.
- Lalli E., Ohe K., Latorre E., Bianchi M. E., and Sassone-Corsi P. (2003). Sexy splicing: regulatory interplays governing sex determination from *Drosophila* to mammals. *J Cell Sci* **116**: 441-5.
- Lamatsch D. K., Nanda I., Epplen J. T., Schmid M., and Scharl M. (2000). Unusual triploid males in a microchromosome-carrying clone of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Cytogenet Cell Genet* **91**: 148-56.
- Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., 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 J. P., 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 J. C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Shownkeen

- R., Sims S., Waterston R. H., Wilson R. K., Hillier L. W., McPherson J. D., Marra M. A., Mardis E. R., Fulton L. A., Chinwalla A. T., Pepin K. H., Gish W. R., Chissoe S. L., Wendl M. C., Delehaunty K. D., Miner T. L., Delehaunty A., Kramer J. B., Cook L. L., Fulton R. S., Johnson D. L., Minx P. J., Clifton S. W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J. F., Olsen A., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.
- Lecointre G., and Le Gyader H. (2006). Biosystematik. *Springer-Verlag, Berlin*.
- Lodish H., A. B., Zipursky S. L., and Darnell J. (2001). Molekulare Zellbiologie. *Spektrum Akademischer Verlag* **4. Auflage**.
- Lottspeich F., and Zorbas H. (1998). Bioanalytik. *Spektrum* **1. Auflage**.
- Lyon M. F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**: 372-3.
- Malone J. H., Hawkins D. L., Jr., and Michalak P. (2006). Sex-biased gene expression in a ZW sex determination system. *J Mol Evol* **63**: 427-36.
- Marin I., and Baker B. S. (1998). The evolutionary dynamics of sex determination. *Science* **281**: 1990-4.
- Marshall Graves J. A. (2000). Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis- a feminist view. *Biol Reprod* **63**: 667-76.
- Marshall Graves J. A. (2002). Sex chromosomes and sex determination in weird mammals. *Cytogenet Genome Res* **96**: 161-8.
- Marshall Graves J. A. (2002). The rise and fall of SRY. *Trends Genet* **18**: 259-64.
- Marshall Graves J. A., and Shetty S. (2001). Sex from W to Z: evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *J Exp Zool* **290**: 449-62.
- Matsuda M., Nagahama Y., Shinomiya A., Sato T., Matsuda C., Kobayashi T., Morrey C. E., Shibata N., Asakawa S., Shimizu N., Hori H., Hamaguchi S., and Sakaizumi M. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* **417**: 559-63.
- Matsuda M., Sato T., Toyazaki Y., Nagahama Y., Hamaguchi S., and Sakaizumi M. (2003). *Oryzias latipes* has DMY, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. *Zoolog Sci* **20**: 159-61.
- Matsuda Y., Nishida-Umehara C., Tarui H., Kuroiwa A., Yamada K., Isobe T., Ando J., Fujiwara A., Hirao Y., Nishimura O., Ishijima J., Hayashi A., Saito T., Murakami T., Murakami Y., Kuratani S., and Agata K. (2005). Highly conserved linkage homology between birds and turtles: bird and turtle chromosomes are precise counterparts of each other. *Chromosome Res* **13**: 601-15.
- Maueler W., Scharl M., and Epplen J. T. (1992). Oligonucleotide fingerprinting in *Xiphophorus melanoma*. Detection of a melanoma associated DNA modification. *J Exp Anim Sci* **35**: 120-4.
- McClintock B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* **36**: 344-55.
- McLachlan J. C., and Storey H. (2003). Hot male: can sex in humans be modified by temperature? *J Theor Biol* **222**: 71-2.

- Meierjohann S., and Schartl M. (2006). From Mendelian to molecular genetics: the Xiphophorus melanoma model. *Trends Genet* **22**: 654-61.
- Meierjohann S., Schartl M., and Volff J. N. (2004). Genetic, biochemical and evolutionary facets of Xmrk-induced melanoma formation in the fish Xiphophorus. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **138**: 281-9.
- Mermod N., O'Neill E. A., Kelly T. J., and Tjian R. (1989). The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* **58**: 741-53.
- Meyer A., and Schartl M. (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 699-704.
- Meyer A., and Schartl M. (2002). Xiphophorus mayae, a new species of swordtail from Guatemala (Teleostei: Poeciliidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters* **13**: 59-66.
- Milinski M., Griffiths S., Wegner K. M., Reusch T. B., Haas-Assenbaum A., and Boehm T. (2005). Mate choice decisions of stickleback females predictably modified by MHC peptide ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4414-8.
- Misteli T. (2000). Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J Cell Sci* **113 ( Pt 11)**: 1841-9.
- Mittwoch U. (2000). Three thousand years of questioning sex determination. *Cytogenet Cell Genet* **91**: 186-91.
- Mittwoch U. (2005). Sex determination in mythology and history. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **49**: 7-13.
- Moore R., Champeval D., Denat L., Tan S. S., Faure F., Julien-Grille S., and Larue L. (2004). Involvement of cadherins 7 and 20 in mouse embryogenesis and melanocyte transformation. *Oncogene* **23**: 6726-35.
- Morizot D. C., Nairn R. S., Walter R. B., and Kazianis S. (1998). The Linkage Map of Xiphophorus Fishes. *Ilar J* **39**: 237-248.
- Mühlhardt C. (2002). Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. *Spektrum Akademischer Verlag* **3. Auflage**.
- Nagahama Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. *W. S. Hoar, D. J. Randall, and E. M. Donaldson (eds.), Fish physiology Reproduction, Part A, Endocrine tissues and hormones* **9**.
- Nairn R. S., Kazianis S., McEntire B. B., Della Coletta L., Walter R. B., and Morizot D. C. (1996). A CDKN2-like polymorphism in Xiphophorus LG V is associated with UV-B-induced melanoma formation in platyfish-swordtail hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13042-7.
- Nakazaki T., Okumoto Y., Horibata A., Yamahira S., Teraishi M., Nishida H., Inoue H., and Tanisaka T. (2003). Mobilization of a transposon in the rice genome. *Nature* **421**: 170-2.
- Nanda I., Kondo M., Hornung U., Asakawa S., Winkler C., Shimizu A., Shan Z., Haaf T., Shimizu N., Shima A., Schmid M., and Schartl M. (2002). A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 11778-83.
- Nanda I., Schartl M., Epplen J. T., Feichtinger W., and Schmid M. (1993). Primitive sex



- chromosomes in poeciliid fishes harbor simple repetitive DNA sequences. *J Exp Zool* **265**: 301-8.
- Nanda I., Schartl M., Feichtinger W., Epplen J. T., and Schmid M. (1992). Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. *Chromosoma* **101**: 301-10.
- Nanda I., Volff J. N., Weis S., Korting C., Froschauer A., Schmid M., and Schartl M. (2000). Amplification of a long terminal repeat-like element on the Y chromosome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Chromosoma* **109**: 173-80.
- Nanda I., Zend-Ajus E., Shan Z., Grutzner F., Schartl M., Burt D. W., Koehler M., Fowler V. M., Goodwin G., Schneider W. J., Mizuno S., Dechant G., Haaf T., and Schmid M. (2000). Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenet Cell Genet* **89**: 67-78.
- Nelson J. (1994). fishes of the world. 3rd edn. *John Wiley and Sons: New York*.
- Newport J., and Kirschner M. (1982). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription. *Cell* **30**: 687-96.
- Newport J., and Kirschner M. (1982). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* **30**: 675-86.
- Niethammer M., Valtschanoff J. G., Kapoor T. M., Allison D. W., Weinberg R. J., Craig A. M., and Sheng M. (1998). CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. *Neuron* **20**: 693-707.
- Ohno S. (1967). Sex chromosomes and sex linked genes. *Springer-Verlag, Berlin*.
- Osoegawa K., Vessere G. M., Li Shu C., Hoskins R. A., Abad J. P., de Pablos B., Villasante A., and de Jong P. J. (2007). BAC clones generated from sheared DNA. *Genomics* **89**: 291-9.
- Pelegri F. (2003). Maternal factors in zebrafish development. *Dev Dyn* **228**: 535-54.
- Piriyapongsa J., and Jordan I. K. (2007). A family of human microRNA genes from miniature inverted-repeat transposable elements. *PLoS ONE* **2**: e203.
- Rappold G. A. (1993). The pseudoautosomal regions of the human sex chromosomes. *Hum Genet* **92**: 315-24.
- Raymond C. S., Shamu C. E., Shen M. M., Seifert K. J., Hirsch B., Hodgkin J., and Zarkower D. (1998). Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* **391**: 691-5.
- Rice W. R. (2002). Experimental tests of the adaptive significance of sexual recombination. *Nat Rev Genet* **3**: 241-51.
- Riley J., Butler R., Ogilvie D., Finniear R., Jenner D., Powell S., Anand R., Smith J. C., and Markham A. F. (1990). A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Res* **18**: 2887-90.
- Roest Crolius H., Jaillon O., Bernot A., Dasilva C., Bouneau L., Fischer C., Fizames C., Wincker P., Brottier P., Quetier F., Saurin W., and Weissenbach J. (2000). Estimate of human gene number provided by genome-wide analysis using

- Tetraodon nigroviridis DNA sequence. *Nat Genet* **25**: 235-8.
- Römpp (2000). Lexikon Biochemie und Molekularbiologie. *Thieme Verlag*.
- Ross M. e. a. (2005). The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* **434**: 325-37.
- Roushdy J., Michel J., Petry H., Anders A., and Anders F. (1999). Paragenetic suppressors of suppressor genes--a new class of oncodeterminants. *J Cancer Res Clin Oncol* **125**: 123-33.
- Rubin E., Lithwick G., and Levy A. A. (2001). Structure and evolution of the hAT transposon superfamily. *Genetics* **158**: 949-57.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., and Erlich H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-91.
- Sambrook J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*.
- Sanger F. (1981). Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* **214**: 1205-10.
- Schartl M. (1995). Platyfish and swordtails: a genetic system for the analysis of molecular mechanisms in tumor formation. *Trends Genet* **11**: 185-9.
- Schartl M. (2004). Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 634-41.
- Schartl M. (2004). A comparative view on sex determination in medaka. *Mech Dev* **121**: 639-45.
- Schartl M., Hornung U., Gutbrod H., Volff J. N., and Wittbrodt J. (1999). Melanoma loss-of-function mutants in *Xiphophorus* caused by *Xmrk*-oncogene deletion and gene disruption by a transposable element. *Genetics* **153**: 1385-94.
- Schartl M., Mauer W., Raulf F., and Robertson S. M. (1988). Molecular aspects of melanoma formation in *Xiphophorus*. *Prog Clin Biol Res* **256**: 283-96.
- Scherer S. W., Cheung J., MacDonald J. R., Osborne L. R., Nakabayashi K., Herbrick J. A., Carson A. R., Parker-Katirae L., Skaug J., Khaja R., Zhang J., Hudek A. K., Li M., Haddad M., Duggan G. E., Fernandez B. A., Kanematsu E., Gentles S., Christopoulos C. C., Choufani S., Kwasnicka D., Zheng X. H., Lai Z., Nusskern D., Zhang Q., Gu Z., Lu F., Zeesman S., Nowaczyk M. J., Teshima I., Chitayat D., Shuman C., Weksberg R., Zackai E. H., Grebe T. A., Cox S. R., Kirkpatrick S. J., Rahman N., Friedman J. M., Heng H. H., Pelicci P. G., Lo-Coco F., Belloni E., Shaffer L. G., Pober B., Morton C. C., Gusella J. F., Bruns G. A., Korf B. R., Quade B. J., Ligon A. H., Ferguson H., Higgins A. W., Leach N. T., Herrick S. R., Lemyre E., Farra C. G., Kim H. G., Summers A. M., Gripp K. W., Roberts W., Szatmari P., Winsor E. J., Grzeschik K. H., Teebi A., Minassian B. A., Kere J., Armengol L., Pujana M. A., Estivill X., Wilson M. D., Koop B. F., Tosi S., Moore G. E., Bricht A. P., Zlotorynski E., Kerem B., Kroisel P. M., Petek E., Oscier D. G., Mould S. J., Dohner H., Dohner K., Rommens J. M., Vincent J. B., Venter J. C., Li P. W., Mural R. J., Adams M. D., and Tsui L. C. (2003). Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science* **300**: 767-72.
- Schmid M., and Steinlein C. (2001). Sex chromosomes, sex-linked genes, and sex



- determination in the vertebrate class amphibia. *Exs*: 143-76.
- Schories S., Lampert K. P., Lamatsch D. K., de Leon F. J., and Schartl M. (2007). Analysis of a possible independent origin of triploid *P. formosa* outside of the Rio Purificacion river system. *Front Zool* **4**: 13.
- Schultheis C. (2003). Molekulare Analyse der Geschlechtsbestimmungsregion der Gonosomen des Platyfisches *Xiphophorus maculatus*. *Diplomarbeit*.
- Selz Y. (2003). Funktionelle Untersuchungen zur Rolle der Melanocortin-Rezeptoren in der Melanombildung bei dem Fisch *Xiphophorus*. *Diplomarbeit*.
- Sinclair A. H., Berta P., Palmer M. S., Hawkins J. R., Griffiths B. L., Smith M. J., Foster J. W., Frischauf A. M., Lovell-Badge R., and Goodfellow P. N. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**: 240-4.
- Singh L. (1972). Evolution of karyotypes in snakes. *Chromosoma* **38**: 185-236.
- Skaletsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P. J., Cordum H. S., Hillier L., Brown L. G., Repping S., Pyntikova T., Ali J., Bieri T., Chinwalla A., Delehaunty A., Delehaunty K., Du H., Fewell G., Fulton L., Fulton R., Graves T., Hou S. F., Latrielle P., Leonard S., Mardis E., Maupin R., McPherson J., Miner T., Nash W., Nguyen C., Ozersky P., Pepin K., Rock S., Rohlfling T., Scott K., Schultz B., Strong C., Tin-Wollam A., Yang S. P., Waterston R. H., Wilson R. K., Rozen S., and Page D. C. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* **423**: 825-37.
- Steinemann S., and Steinemann M. (2005). Retroelements: tools for sex chromosome evolution. *Cytogenet Genome Res* **110**: 134-43.
- Tang P., Park D. J., Marshall Graves J. A., and Harley V. R. (2004). ATRX and sex differentiation. *Trends Endocrinol Metab* **15**: 339-44.
- Tatum E. L., and Lederberg J. (1947). Gene Recombination in the Bacterium *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **53**: 673-84.
- Tavolga (1949). Embryonic development of the platyfish the swordtails and their hybrids. *American museum of national history* **94**: 161-230.
- Taylor J. S., Van de Peer Y., Braasch I., and Meyer A. (2001). Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**: 1661-79.
- Teranishi M., Shimada Y., Hori T., Nakabayashi O., Kikuchi T., Macleod T., Pym R., Sheldon B., Solovei I., Macgregor H., and Mizuno S. (2001). Transcripts of the MHM region on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the DMRT1 locus. *Chromosome Res* **9**: 147-65.
- Traut W., and Winking H. (2001). Meiotic chromosomes and stages of sex chromosome evolution in fish: zebrafish, platyfish and guppy. *Chromosome Res* **9**: 659-72.
- Ullmann A., and Perrin D. (1970). The Lactose operon. *Cold Spring Harbour*: 143-72.
- van de Rijke F. M., Florijn R. J., Tanke H. J., and Raap A. K. (2000). DNA fiber-FISH staining mechanism. *J Histochem Cytochem* **48**: 743-5.
- Veith A. M., Froschauer A., Korting C., Nanda I., Hanel R., Schmid M., Schartl M., and Volff J. N. (2003). Cloning of the *dmrt1* gene of *Xiphophorus maculatus*:

- dmY/dmrt1Y is not the master sex-determining gene in the platyfish. *Gene* **317**: 59-66.
- Veith A. M., Klattig J., Dettai A., Schmidt C., Englert C., and Volff J. N. (2006). Male-biased expression of X-chromosomal DM domain-less Dmrt8 genes in the mouse. *Genomics* **88**: 185-95.
- Volff J., Korting C., and Schartl M. (2001). Ty3/Gypsy retrotransposon fossils in mammalian genomes: did they evolve into new cellular functions? *Mol Biol Evol* **18**: 266-70.
- Volff J., Nanda I., Schmid M., and Schartl M. (2007). Governing sex determination in fish: Regulatory Putsches and Ephemeral dictators. *SexDev* **1**: 85-99.
- Volff J. N. (2005). Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* **94**: 280-94.
- Volff J. N. (2006). Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *Bioessays* **28**: 913-22.
- Volff J. N., Bouneau L., Ozouf-Costaz C., and Fischer C. (2003). Diversity of retrotransposable elements in compact pufferfish genomes. *Trends Genet* **19**: 674-8.
- Volff J. N., Hornung U., and Schartl M. (2001). Fish retroposons related to the Penelope element of *Drosophila virilis* define a new group of retrotransposable elements. *Mol Genet Genomics* **265**: 711-20.
- Volff J. N., Kondo M., and Schartl M. (2003). Medaka dmY/dmrt1Y is not the universal primary sex-determining gene in fish. *Trends Genet* **19**: 196-9.
- Volff J. N., Korting C., Altschmied J., Duschl J., Sweeney K., Wichert K., Froschauer A., and Schartl M. (2001). Jule from the fish *Xiphophorus* is the first complete vertebrate Ty3/Gypsy retrotransposon from the Mag family. *Mol Biol Evol* **18**: 101-11.
- Volff J. N., Korting C., Froschauer A., Sweeney K., and Schartl M. (2001). Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. *J Mol Evol* **52**: 351-60.
- Volff J. N., Korting C., Froschauer A., Zhou Q., Wilde B., Schultheis C., Selz Y., Sweeney K., Duschl J., Wichert K., Altschmied J., and Schartl M. (2003). The Xmrk oncogene can escape nonfunctionalization in a highly unstable subtelomeric region of the genome of the fish *Xiphophorus*. *Genomics* **82**: 470-9.
- Volff J. N., Korting C., Meyer A., and Schartl M. (2001). Evolution and discontinuous distribution of Rex3 retrotransposons in fish. *Mol Biol Evol* **18**: 427-31.
- Volff J. N., Korting C., and Schartl M. (2000). Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon Rex1 with varying success in invading fish genomes. *Mol Biol Evol* **17**: 1673-84.
- Volff J. N., Korting C., Sweeney K., and Schartl M. (1999). The non-LTR retrotransposon Rex3 from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Mol Biol Evol* **16**: 1427-38.
- Volff J. N., Lehrach H., Reinhardt R., and Chourrout D. (2004). Retroelement dynamics and a novel type of chordate retrovirus-like element in the miniature genome of the tunicate *Oikopleura dioica*. *Mol Biol Evol* **21**: 2022-33.

- Volff J. N., and Schartl M. (2001). Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica* **111**: 101-10.
- Volff J. N., and Schartl M. (2002). Sex determination and sex chromosome evolution in the medaka, *Oryzias latipes*, and the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Cytogenet Genome Res* **99**: 170-7.
- Volff J. N., and Schartl M. (2003). Evolution of signal transduction by gene and genome duplication in fish. *J Struct Funct Genomics* **3**: 139-50.
- Volff J. N., Zarkower D., Bardwell V. J., and Schartl M. (2003). Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans. *J Mol Evol* **57 Suppl 1**: S241-9.
- Walter R. B., Rains J. D., Russell J. E., Guerra T. M., Daniels C., Johnston D. A., Kumar J., Wheeler A., Kelnar K., Khanolkar V. A., Williams E. L., Hornecker J. L., Hollek L., Mamerow M. M., Pedroza A., and Kazianis S. (2004). A microsatellite genetic linkage map for *Xiphophorus*. *Genetics* **168**: 363-72.
- Walter R. B., Rains J. D., Russell J. E., Guerra T. M., Daniels C., Johnston D. A., Kumar J., Wheeler A., Kelnar K., Khanolkar V. A., Williams E. L., Hornecker J. L., Hollek L., Mamerow M. M., Pedroza A., and Kazianis S. (2004). A microsatellite genetic linkage map for *Xiphophorus*. *Genetics* **168**: 363-72.
- Waters P. D., Delbridge M. L., Deakin J. E., El-Mogharbel N., Kirby P. J., Carvalho-Silva D. R., and Graves J. A. (2005). Autosomal location of genes from the conserved mammalian X in the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*): implications for mammalian sex chromosome evolution. *Chromosome Res* **13**: 401-10.
- Waters P. D., Duffy B., Frost C. J., Delbridge M. L., and Graves J. A. (2001). The human Y chromosome derives largely from a single autosomal region added to the sex chromosomes 80-130 million years ago. *Cytogenet Cell Genet* **92**: 74-9.
- Weis S., and Schartl M. (1998). The macromelanophore locus and the melanoma oncogene *Xmrk* are separate genetic entities in the genome of *Xiphophorus*. *Genetics* **149**: 1909-20.
- Wilkins A. S. (1995). Moving up the hierarchy: a hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. *Bioessays* **17**: 71-7.
- Wilson E. B. (1911). The sex chromosomes. *Arch Mikrosk Anat Entwicklungsmech* **77**: 249-271.
- Wittbrodt J., Adam D., Malitschek B., Maueler W., Raulf F., Telling A., Robertson S. M., and Schartl M. (1989). Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing *Tu* locus in *Xiphophorus*. *Nature* **341**: 415-21.
- Wittbrodt J., Lammers R., Malitschek B., Ullrich A., and Schartl M. (1992). The *Xmrk* receptor tyrosine kinase is activated in *Xiphophorus* malignant melanoma. *Embo J* **11**: 4239-46.
- Wittbrodt J., Shima A., and Schartl M. (2002). Medaka--a model organism from the far East. *Nat Rev Genet* **3**: 53-64.
- Wolpert L., Beddington R., Brockes J., and T. J. (1999). *Entwicklungsbiologie*. Spektrum Verlag.
- Zarkower D. (2001). Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat Rev Genet* **2**: 175-85.
- Zhou Q. (2005). Molecular Analysis of the Sex-Determining Region of the Y

Chromosome in the Platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Dissertation*.  
Zhou Q., Froschauer A., Schultheis C., Schmidt C., Bienert P., and Volf J. (2006).  
Helitron transposons on the sex chromosomes of the platyfish *Xiphophorus maculatus* and their evolution in animal genomes. *Zebrafish* **3**: 39-52.

### 3. Publikationsliste

#### 3.1. Rezensierte Fachzeitschriften

**2006**

Schultheis C., Q. Zhou, A. Froschauer, I. Nanda, Y. Selz, C. Schmidt, S. Matschl, M. Wenning, A.-M. Veith, M. Naciri, R. Hanel, I. Braasch, A. Dettai, A. Böhne, C. Ozouf-Costaz, B. Ségurens, A. Couloux, S. Bernard-Samain, M. Schmid, M. Scharrtl, J.-N. Volff (2006). Molecular analysis of the sex-determining region of the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Zebrafish* 3: 299-309.

Veith A.-M., M. Schäfer, N. Klüver, C. Schmidt, C. Schultheis, M. Scharrtl, C. Winkler, J.-N. Volff (2006). Tissue-specific expression of *dmrt* genes in embryos and adults of the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Zebrafish* 3: 325-337.

Zhou Q., A. Froschauer, C. Schultheis, C. Schmidt, P. Bienert, M. Wenning, A. Dettai, J.-N. Volff (2006). Helitron transposons on the sex chromosomes of the platyfish *Xiphophorus maculatus* and their evolution in animal genomes. *Zebrafish* 3: 39-52.

**2005**

Brandt J., S. Schrauth, A.-M. Veith, A. Froschauer, T. Haneke, C. Schultheis, M. Gessler, C. Leimeister, J.-N. Volff (2005). Transposable elements as a source of genetic innovation: ex-pression and evolution of a family of retrotransposon-derived neogenes in mammals. *Gene* 345: 101-111.

**2003**

Volff J.-N., C. Körting, A. Froschauer, Q. Zhou, B. Wilde, C. Schultheis, Y. Selz, K. Sweeney, J. Duschl, K. Wichert, J. Altschmied, M. Scharrtl (2003). The *Xmrk* oncogene can escape non-functionalization in a highly unstable subtelomeric region of the genome of the fish *Xiphophorus*. *Genomics* 82: 470-479.\*

#### 3.2 Fachbücher und nicht rezensierte Fachzeitschriften

**2006**

Dettai A., L. Bouneau, C. Fischer, C. Schultheis, C. Schmidt, Q. Zhou, J.-P. Coutanceau, C. Ozouf-Costaz, J.-N. Volff. FISH analysis of fish transposable elements: tracking down mobile DNA in teleost genomes. *In Fish Cytogenetics*; E. Pisano, C. Ozouf-Costaz, F. Foresti, B.G. Kapoor (Eds.), Science Publisher Inc., Enfield (USA) (im Druck).

**2005**

Schultheis C., A. Dettai, J.-N. Volff (2005). Mobile DNA und Transposition: Evolution, Mechanismen und Anwendungen. *BIOspektrum* 4/2005: 428-429 (Meeting report).

**2003**

Volff J.-N., A. Froschauer, C. Körting, W. Bernhardt, I. Nanda, C. Schultheis, M. Schmid, M. Scharrtl (2003). Genome fluidity in the fish *Xiphophorus*. *In Aquatic Genomics*; N. Shimizu, T. Aoki, I. Hirono, F. Takashima (Eds.), Springer Verlag, Tokyo, pp. 185-194.

## 4. Vorträge und Konferenzbeiträge

### 4.1 Vorträge:

#### 2006

Le Tour de sex chromosome evolution – bicycling in the sex-determining region of the platyfish *Xiphophorus maculatus*.

„European Commission’s Research Infrastructure Action via Synthesys Project“, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France (CS, talk).

#### 2005

Transposable elements and sex chromosome evolution in the platyfish.

Frühjahrsakademie 2005 der Gesellschaft für Genetik, Wittenberg, Germany (CS, talk).

### 4.2 Posterpräsentationen:

#### 2006

Schultheis C., A.-M. Veith, Y. Selz, Q. Zhou, A. Froschauer, C. Schmidt, S. Matschl, A. Böhne, I. Braasch, M. Rathmann, A. Dettai, J.-N. Volff (2006). Positionelle Klonierung des Gens für Geschlechtsbestimmung im Platyfisch *Xiphophorus*. Biofuture Meeting, Berlin, Germany (JNV, poster).

Schultheis C., A. Böhne, Y. Selz, C. Schmidt, Q. Zhou, A. Froschauer, I. Braasch, S. Matschl, A. Dettai, C. Ozouf-Costaz, B. Ségurens, A. Couloux, S. Bernard-Samain, M. Scharl, J.-N. Volff (2006). Diversity of sexual development in fish: molecular and functional analysis of the sex-determining region of the platyfish *Xiphophorus maculatus*. First and founding meeting of the European society for Evolutionary Developmental biology (EED), Prague, Czech Republic (CS, poster).

Selz Y., A. Froschauer, C. Hoffmann, Q. Zhou, C. Schmidt, C. Schultheis, I. Braasch, A. Böhne, M. Scharl, J.-N. Volff (2006). Two types of melanocortin receptors are overexpressed in melanoma in the fish *Xiphophorus*. Perspectives in Melanoma X and the Third International Melanoma Research Congress, Noordwijk, The Netherlands (YS, poster).

#### 2005

Zhou Q., C. Schultheis, A. Froschauer, A.-M. Veith, C. Körting, Y. Selz, J. Brandt, M. Wenning, A. Dettai, J.-N. Volff (2005). Positionelle Klonierung des Gens für Geschlechtsbestimmung im Platyfisch *Xiphophorus*. Biofuture Meeting, Berlin, Germany (JNV, poster).

Schultheis C., Q. Zhou, C. Körting, Y. Selz, M. Scharl, J.-N. Volff, A. Froschauer (2005). A physical map of the *Xmrk*-SD region of the *Xiphophorus maculatus* sex chromosomes. 4th European Zebrafish Meeting, Dresden, Germany (AF, poster).

Schultheis C., A. Froschauer, Q. Zhou, C. Körting, Y. Selz, M. Scharl, J.-N. Volff (2005). Convergent evolution of sex chromosomes in human and platyfish.

Graduiertentreffen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft Studiengruppe Evolutionsbiologie, Würzburg, Germany (CS, poster).

Selz Y., A. Froschauer, C. Hoffmann, Q. Zhou, C. Körting, W. Bernhardt, C. Schultheis, M. Scharl, J.-N. Volff (2005). Birth of a sex-chromosomal gene family: amplification and functional evolution of type 4 melanocortin receptor genes in the platyfish *Xiphophorus*. Graduiertentreffen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft Studiengruppe Evolutionsbiologie, Würzburg, Germany (YS, poster).

### 2003

Zhou Q., A.-M. Veith, C. Körting, C. Schultheis, Y. Selz, M. Vucic, R. Hanel, P. Bienert, M. Naciri, A. Froschauer, J.-N. Volff (2003). Positionelle Klonierung des Gens für Geschlechtsbestimmung im Platyfisch *Xiphophorus*. Biofuture Meeting, Berlin, Germany (JNV, poster).

Froschauer A., C. Schultheis, Q. Zhou, C. Körting, M. Vucic, Y. Selz, R. Hanel, M. Naciri, A.-M. Veith, I. Nanda, M. Schmid, M. Scharl, J.-N. Volff (2003). Genomic instability in the *Xmrk* oncogene region of the melanoma fish model *Xiphophorus*. 12th International AEK Cancer Congress, Würzburg, Germany (AF, poster).

Selz Y., A. Froschauer, Q. Zhou, C. Körting, C. Schultheis, R. Hanel, W. Bernhardt, M. Scharl, J.-N. Volff (2003). Multicopy melanocortin receptor gene at the melanoma locus in the platyfish *Xiphophorus maculatus*. 12th International AEK Cancer Congress, Würzburg, Germany (YS, poster).

Schultheis C., A. Froschauer, C. Körting, Q. Zhou, M. Vucic, A.-M. Veith, M. Scharl, J.-N. Volff (2003). Conserved synteny between the sex-determining region of the platyfish *Xiphophorus maculatus* and a region of human chromosome 2 involved in sex determination. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Genetik, Kassel, Germany (CS, poster).

Zhou Q., A. Froschauer, C. Körting, C. Schultheis, M. Vucic, A.-M. Veith, M. Mösl, I. Nanda, M. Schmid, M. Scharl, J.-N. Volff (2003). Molecular analysis of the sex-determining region of the Y chromosome in the platyfish *Xiphophorus maculatus*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Genetik, Kassel, Germany (QZ, poster).

Veith A.-M., C. Winkler, A. Froschauer, M. Kondo, U. Hornung, C. Körting, C. Schultheis, Y. Selz, M. Scharl, J.-N. Volff (2003). Molecular analysis of the *dmrt* gene family in fish. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Genetik, Kassel, Germany (AMV, poster).

Selz Y., A. Froschauer, Q. Zhou, C. Körting, R. Hanel, W. Bernhardt, C. Schultheis, M. Scharl, J.-N. Volff (2003). Serial duplications of the melanocortin receptor gene *mc4r* in the platyfish *Xiphophorus maculatus* with regard to melanoma formation and sexual maturity. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Genetik, Kassel, Germany (YS, poster).

Schultheis C., A.-M. Veith, A. Froschauer, C. Körting, Q. Zhou, M. Vucic, Y. Selz, K. Schmitter, M. Scharl, J.-N. Volff (2003). "Variation at the top"- The search for novel sex



determination genes with the platyfish *Xiphophorus maculatus* as a model organism. 1st european conference of poeciliid biologists, Zürich, Switzerland (CS, poster).

Zhou Q., A. Froschauer, C. Körting, C. Schultheis, M. Wenning, P. Bienert, M. Mösl, M. Schartl, J.-N. Volff (2003). Construction and initial analysis of a bacterial artificial chromosome (BAC) contig of the sex-determining region of the Y chromosome of the platyfish *Xiphophorus maculatus*. 1st european conference of poeciliid biologists, Zürich, Switzerland (QZ, poster).

**2002**

Selz Y., A. Froschauer, Q. Zhou, C. Körting, R. Hanel, W. Bernhardt, C. Schultheis, M. Schartl, J.-N. Volff (2002). Serial duplications of a melanocortin receptor gene at the melanoma locus of the platyfish *Xiphophorus maculatus*. 6th Signal Transduction Society Meeting "Signal Transduction - Receptors, Mediators and Genes", Weimar, Germany (YS, poster).

## 5. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Christina Schultheis
Geburtsdatum	13. 07. 1977
Geburtsort	Fulda
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

1985 – 1988	Johannes-Hack-Schule, Grund-und Hauptschule, Petersberg
1988 – 1997	Rabanus-Maurus-Schule (Domgymnasium), Fulda Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

### Hochschulausbildung

1997 – 2003	Studium der Biologie an der Julius Maximilians Universität, Würzburg; Prüfungsfächer: Zell- und Entwicklungsbiologie (Hauptfach), Biochemie (Nebenfach), Mikrobiologie (Nebenfach)
2002 – 2003	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Physiologische Chemie I der Julius Maximilians Universität Würzburg bei Prof. Dr. Manfred Scharl Thema: „Molekulare Analyse der Geschlechtsbestimmungsregion der Gonosomen des Platyfisches <i>Xiphophorus maculatus</i> .“
Seit 2003	Dissertation am Lehrstuhl für Physiologische Chemie I der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg bei Prof. Dr. Manfred Scharl. Thema: „Die geschlechtsbestimmende Region des Platyfisches <i>Xiphophorus maculatus</i> auf den Geschlechtschromosomen X und Y: Molekulare Analyse der genomischen Struktur und molekulargenetische Untersuchung von Genkandidaten.“

## 6. Ehrenwörtliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt.

Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe früher, außer den in dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 20. September 2007

Christina Schultheis



