Identifizierung und molekulare Analyse *Xmrk*-gekoppelter Gene in der geschlechtsbestimmenden Region des Genoms von *Xiphophorus maculatus*

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

vorgelegt von
Alexander Froschauer
aus
Ludwigshafen/Rhein

Würzburg, 2003

Eingereicht am: 14.08.2003

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Gross (stellvertr. Vorsitzender)

Gutachter: Prof. Dr. M. Schartl

Gutachter: Prof. Dr. M. Schmid

Tag des Promotionskolloquiums: 22.10.2003

" [...], we are optimistic about the future
because history has shown that we
can't stop thinking about sex."

Clarkson, M.J. & Harley, V.R. (1999), *Trends Endocrinol Metab* **13** (3) 106-11.

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Personen beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Manfred Schartl für das in mich gesetzte Vertrauen und die wissenschaftliche Leitung des Projekts. Seine vielen theoretischen und praktischen Hilfestellungen haben die Grundlage für diese Dissertation gelegt.

Ich danke Prof. Dr. Michael Schmid für die Übernahme des Korreferats und die Kooperation mit dem Institut für Humangenetik der Universität Würzburg.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Jean-Nicolas Volff für seine unermüdliche Arbeit, die weit über wissenschaftliche Anleitung, Motivation und unentbehrliche Anregungen hinausging. Wir sind einen weiten Weg zusammen gegangen, vielen Dank für die Freundschaft.
Ihm und Cornelia Körting, der ich besonders für unzählige Hilfestellungen und ihre Freundschaft danken will, habe ich den guten Start des Projekts und die erfolgreiche Fortführung zu verdanken. Darin schließe ich auch die anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Volff mit ein, namentlich Tina Schultheis, Yvonne Selz, Anne-Marie Veith, Marina Vucic und Qingchun Zhou.

Die Mitglieder des Lehrstuhls Physiologische Chemie I kann ich hier nicht alle nennen, aber besonders danke ich Ute Hornung, Dr. Christoph Winkler, Dr. Claudia Wellbrock, Dr. Mariko Kondo, Hugo Schwind und Dr. Dunja Lamatsch.

Dr. Indrajit Nanda gilt mein herzlicher Dank für seine Kooperationsbereitschaft, praktische Hilfe und wissenschaftlichen Diskussionen.

Die Basis dieser Arbeit, nämlich die Erstellung der BAC (Bacterial Artificial Chromosome)-Bibliothek von *Xiphophorus maculatus*, wurde ermöglicht durch die Zusammenarbeit mit Prof. Takashi Aoki und Dr. Takayuki Katagiri (Tokyo University of Fisheries) und Prof. Nobuyoshi Shimizu und Dr. Shuichi Asakawa (Keio School of Medicine, Tokyo). Ihnen gilt mein höchster Dank, auch und besonders für die herzliche Aufnahme in Japan.

Bei Christin Froschauer bedanke ich mich für ihre Unterstützung und ihr Verständnis während der vielen Stunden, die wir nicht zusammen verbringen konnten.

Dieses Projekt wurde gefördert durch das BioFuture Programm des BMBF (an J.-N. Volff), den Sonderforschungsbereich 465 der DFG (an M. Schartl und J.-N. Volff), das FAIR Projekt PL 97-3796 der EU und den Fonds der Chemischen Industrie (an M. Schartl).

Inhalt

1. EINLEITUNG 1

1.1 *XIPHOPHORUS* ALS MODELLORGANISMUS FÜR MELANOMENTSTEHUNG 1

1.2 DAS ONKOGEN *XMRK* ENTSPRICHT DEM LOCUS *TU* 3

1.3 *XMRK* UND *EGFRB* SIND ENG GEKOPPELT MIT DEM GESCHLECHTSBESTIMMUNGSLOCUS *SD* IN *X. MACULATUS* 5

1.4 GESCHLECHTSBESTIMMUNG IN *X. MACULATUS* 6

1.5 MECHANISMEN DER GESCHLECHTSBESTIMMUNG 7

1.5.1 Geschlechtsbestimmung in Säugern 7

1.5.2 Geschlechtsbestimmung in Fischen 8

1.5.3 Geschlechtsbestimmung im Medaka (Oryzias latipes) 9

1.6 KLASSEN DER MELANOCORTIN-REZEPTOREN 9

1.7 DIE ROLLE VON MC4R IM ENERGIEHAUSHALT UND IN DER PIGMENTIERUNG 10

1.8 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 11

2. MATERIAL 13

2.1 FISCHE 13

2.2 GENOMISCHE BIBLIOTHEKEN 13

2.3 FISCHZELLLINIEN 14

2.4 BAKTERIENSTÄMME UND VEKTOREN 14

2.5 ENZYME 14

2.6 MEDIEN, ZUSÄTZE UND PUFFERLÖSUNGEN 15

2.7 SONSTIGE CHEMIKALIEN 15

2.8 OLIGONUKLEOTID-PRIMER 15

2.9 GERÄTE, HARD- UND SOFTWARE 15

3. METHODEN 17

3.1 ERSTELLUNG DER GENOMISCHEN BAC-BIBLIOTHEK VON *X. MACULATUS* 17

3.1.1 DNA-Isolierung zur Erstellung der BAC-Bibliothek 17

3.1.2 Partieller Restriktionsverdau der hochmolekularen DNA 18

3.1.3 Größenselektion der Insert-DNA 19

3.1.4 Ligation und Transformation 21

3.1.5 Größe der Bibliothek, Erstellung und Lagerung von Kopien 21

3.1.6 Membranen 22

3.1.7 Kolonie-Stocks 22

3.2 DNA-ISOLIERUNG 22

3.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Fischen 22

3.2.2 Isolierung genomischer DNA aus Feldproben 23

3.2.3 Isolierung kleiner Mengen genomischer DNA aus Flossen 23

3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab 23

3.2.5 Isolierung von Cosmid- und BAC-DNA im kleinen Maßstab 24

3.2.6 Isolierung von Plasmid-, Cosmid- und BAC-DNA im mittleren Maßstab 24

3.3 BESTIMMUNG DER DNA/ RNA-KONZENTRATION 25

3.3.1 Spektralphotometrische Bestimmung der DNA/ RNA-Konzentration 25

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA mittels Agarose-Gel 25

3.4 SPALTUNG DER DNA DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN 25

3.5 PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION 25

3.6 DNA-GELELEKTROPHORESE 26
3.6.1 Standardbedingungen dieser Arbeit *26*
3.6.2 Pulsgelelektrophorese (PFGE) *26*
3.6.3 Fotografische Analyse der DNA *27*

3.7 ISOLIERUNG DER DNA AUS AGAROSE-GELEN 27

3.8 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) 27
3.8.1 Standard-PCR *27*
3.8.2 Linker-PCR *28*

3.9 LIGATION 29

3.10 TRANSFORMATION 29

3.11 LAGERUNG VON BAKTERIEN 30

3.12 SEQUENZANALYSEN 30
3.12.1 Sequenzierung mit A.L.F.™ *30*
3.12.2 Sequenzierung mit CEQ™ 2000 ..... *31*

3.13 SEQUENZIERUNG MITTELS TRANSPOSON-MUTAGENESE 31

3.14 SEQUENZIERUNG VON ZUFÄLLIG AUSGEWÄHLTEN SUBKLONEN EINER URSPRUNGS-DNA 32

3.15 SOUTHERN-BLOT-HYBRIDISIERUNG 33
3.15.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden *33*
3.15.2 Alkalischer Transfer von DNA auf eine Nylon-Membran *33*
3.15.3 DNA-DNA Hybridisierung *34*

3.16 PRÄPARATION VON GESAMT-RNA AUS GEWEBEN 35

3.17 ANALYSE DER GENEXPRESSION MITTELS RT-PCR 35

4. ERGEBNISSE 37

4.1 ANALYSE UND ERWEITERUNG DER *XMRK*- UND *EGFRB*-COSMID-CONTIGS VON *X. MACULATUS* 37
4.1.1 Stand zu Beginn dieser Arbeit *37*
4.1.2 Repetitive Elemente charakterisieren die Xmrk-Region *37*
4.1.3 Pseudogene der Xmrk-Region *39*
4.1.4 Erweiterung der Cosmid-Contigs der egfrb-Region *41*

4.2 CHROMOSOMEN-WALKING IN DER *SD*-REGION DES PLATYS MITTELS BACS 45
4.2.1 Analyse der BAC-Bibliothek und Startpunkte des Walkings *45*
4.2.2 Aufbau und Erweiterung der BAC-Contigs der Xmrk-Region *46*
4.2.3 Potentielle Gene der Xmrk-Region *50*
4.2.4 Probleme bei der Erweiterung des Xmrk-Contigs *51*
4.2.5 Aufbau und Erweiterung der BAC-Contigs der egfrb-Region *52*
4.2.6 Abschätzung des Abstands zwischen Xmrk- und egfrb-Contig *55*
4.2.7 Aufbau des ps-criptY-Contigs des Y-Chromosoms *56*
4.2.8 Noch nicht eindeutig zugeordnete BAC-Contigs *57*

4.3 GENOMISCHE STRUKTUR DER *DMRT*-GENE *DMRT2* UND *DMRT4* 60

4.4 ANALYSE DER *CRIPT*-(PSEUDO-)GENE VON *X. MACULATUS* 62
4.4.1 Struktur der cript-(Pseudo-)Gene von X. maculatus *63*
4.4.2 Chromosomale Lokalisierung von cript und ps-criptY *64*
4.4.3 Sequenz des Cosmids 012 K09 (33 kb, ps-criptY) *66*
4.4.4 Expressionsanalyse der cript-(Pseudo-)Gene von X. maculatus *68*

4.5 MELANOCORTINREZEPTOR-GENE IN *X. MACULATUS* 70
4.5.1 Tandemartige Duplikation von mc4r-Genen in X. maculatus *70*
4.5.2 Strukturelle Eigenschaften *72*
4.5.3 Expression der zwei Hauptgruppen von mc4r *73*
4.5.4 Nachweis der Duplikation von mc4r in wildtypischen X. maculatus *75*

5. DISKUSSION **77**

5.1 *X. MACULATUS* ALS MODELLSYSTEM FÜR GENETISCHE FAKTOREN DER MELANOMENTSTEHUNG UND GESCHLECHTSBESTIMMUNG 77

5.1.1 Die Genomgröße von X. maculatus *77*

5.1.2 Erstellung und Analyse geschlechtschromosomaler Cosmid-Contigs *78*

5.1.3 Erstellung und Analyse geschlechtschromosomaler BAC-Contigs *79*

5.2 DUPLIKATIONSEREIGNISSE IN DER *XMRK-SD*-REGION UND GENETISCHE INSTABILITÄT 82

5.3 POSITIONIERUNG VON NEUEN MOLEKULAREN MARKERN 83

5.4 ABSCHÄTZUNG DES ABSOLUTEN GENOMISCHEN ABSTANDS VON *XMRK* UND *EGFRB* 84

5.5 *DMRT1* ALS URSPRÜNGLICHES GEN DER GESCHLECHTSBESTIMMUNG IN VERTEBRATEN? 86

5.6 ANALYSE VON *CRIPT, PS-CRIPTY* UND *PS-CRIPT1* 87

5.7 MELANOCORTIN-REZEPTORGENE: KANDIDATEN FÜR *MDL* UND *P*? 89

6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK **93**

7. SUMMARY AND PERSPECTIVES **95**

8. ANHANG **97**

9. ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN **109**

10. LITERATUR **111**

PUBLIKATIONEN **121**

LEBENSLAUF **124**

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG **125**

1. Einleitung

Fische der Gattung *Xiphophorus* sind ein lange bekanntes Modellsystem zur Analyse der Bedeutung genetischer Faktoren bei der Melanomentstehung. Das dafür verantwortliche Onkogen ist eng gekoppelt mit anderen Genloci, die Eigenschaften wie den Melanom-Phänotyp, sexuell dimorphe Pigmentierungsmuster, Geschlechtsbestimmung und den Zeitpunkt der sexuellen Reife des Individuums bestimmen. Somit kann die Untersuchung eines relativ kurzen Abschnitts des Genoms Aufschluss über weitere an der Tumorgenese beteiligte Gene und grundlegende Fragen wie die der genetischen Geschlechtsbestimmung und sexuellen Reifung in Fischen geben.

1.1 *Xiphophorus* als Modellorganismus für Melanomentstehung

Die Gattung *Xiphophorus* (HECKEL 1848) umfasst 23 Süßwasserfischarten (Meyer & Schartl, 2002), deren Verbreitungsgebiet in Zentralamerika vom nördlichen Mexiko bis Guatemala liegt. Bereits Anfang des 20sten Jahrhunderts waren die namensgebende Gruppe der Schwertträger und die Platys aufgrund ihrer prächtigen Farben und eindrucksvollen Formen als Zierfische sehr beliebt. *Xiphophorus*-Arten sind untereinander kreuzbar und produzieren fertile Nachkommen. Schon in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben Gordon und Kosswig unabhängig voneinander die Entstehung von vererbten Melanomen in bestimmten Hybriden von *Xiphophorus* (Gordon, 1927; Kosswig, 1928). Die Melanome entstehen aus sogenannten Makromelanophoren, besonders großen melaninhaltigen Pigmentzellen der Haut mit einem Durchmesser von 200-500 µm, deren dendritische Fortsätze übereinander wachsen und somit weniger einer dichteabhängigen Wachstumskontrolle zu unterliegen scheinen. Im Gegensatz zu Mikromelanophoren, die mit einem Durchmesser von 30-100 µm für die einheitlich graue Körperfärbung verantwortlich sind und ebenfalls bestimmte Fleckenmuster ("tail spot pattern, body spot pattern") bilden können, werden Makromelanophoren nicht von allen *Xiphophorus*-Arten gebildet und sind auch innerhalb natürlicher Populationen einer Art in nur 1-40% der Individuen vorhanden (Kallman, 1975).

Ein typisches Kreuzungsschema, das zur Entstehung maligner Hauttumore führt, ist in Abbildung 1 gezeigt. Durch die Kreuzung des Platys *Xiphophorus maculatus* (Makromelanophorenmuster *Sd*, "Spotted dorsal") mit dem Schwertträger *Xiphophorus helleri* (keine Makromelanophoren) entsteht in der Tochtergeneration (F_1) zunächst ein Phänotyp mit einem verstärkten, von den Makromelanophoren gebildeten Pigmentmuster an der

Rückenflosse bis hin zum Auftreten benigner Melanome. Die Lokalisation entspricht dabei der der Pigmentflecken der Platy-Mutter. Die Rückkreuzung dieser Tiere mit *X. helleri* führt zur ersten Rückkreuzungsgeneration (BC_1), in der sich die Phänotypen entsprechend den Regeln für zwei unabhängig segregierende Loci aufspalten (Ahuja & Anders, 1976): 50% der Individuen zeigen keine Makromelanophorenmuster, 25% entsprechen der F_1-Generation und 25% entwickeln maligne Melanome. Durch diese Rückkreuzung wird vermutlich der dominante Tumor-induzierende Locus *Tu* von einem Regulator-Locus *R* (früher "*Diff*") isoliert, was in 25% der Nachkommen zur Ausprägung des Tumor-Phänotyps des dominanten Locus *Tu* führt (Abb. 1). Kreuzungsexperimente mit Individuen der BC_1-Generation bestätigen dieses Modell. Die weitere Rückkreuzung von Individuen mit benignen Tumoren mit *X. helleri* führt zur selben Aufspaltung der Phänotypen wie sie von F_1 zu BC_1 zu beobachten ist, während in weiteren Rückkreuzungen von Individuen mit malignen Tumoren mit *X. helleri* in jeweils 50% der Nachkommen maligne bzw. gar keine Melanome auftreten. Die Rückkreuzung mit *X. maculatus* hingegen führt nach mehreren Generationen wieder zum für den Platy typischen Fleckenmuster (Anders *et al.*, 1984; Anders *et al.*, 1990).

Diese Interpretation der Kreuzungsdaten beschreibt *R* als Regulator im Sinne eines Repressors des Tumor-Phänotyps im Genom von *X. maculatus*. Alternativ lässt sich *R* jedoch auch als Aktivator von *Tu* im Genom von *X. helleri* interpretieren, der durch die Kreuzung in die Hybriden eingeführt wird und dadurch den Tumor-Phänotyp, möglicherweise abhängig von der Gendosis, induziert (Schartl, 1995).

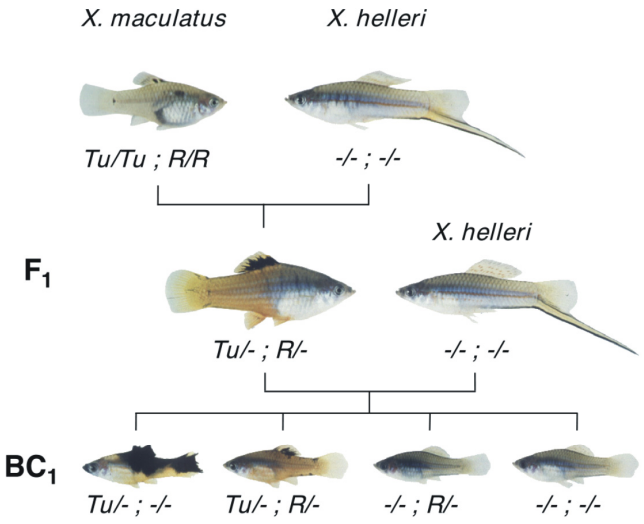

Abbildung 1: Kreuzungsschema zur Bildung maligner Melanome in Hybriden von *Xiphophorus* (Erläuterung siehe Text). *Tu*: Tumor-Locus, *R*: Regulator (Schartl & Schartl, 1990).

1.2 Das Onkogen *Xmrk* entspricht dem Locus *Tu*

Dem gonosomalen *Tu*-Locus konnte ein neues Rezeptortyrosinkinase-Gen zugeordnet werden, das *Xmrk* (*Xiphophorus* melanoma receptor kinase) genannt wurde und große Ähnlichkeit zu Rezeptortyrosinkinasen vom Typ I zeigt (Übersicht in Schartl, 1995; Volff & Schartl, 2003). Expressionsstudien und die Analyse von Mutanten bewiesen das onkogene Potential von *Xmrk* (Schartl, 1988; Wittbrodt *et al.*, 1989; Schartl, 1990; Schartl *et al.*, 1999).

In Rückkreuzungsbastarden wurden in verschiedenen Laboratorien Mutanten gefunden, die das X-Chromosom (X^{Sd}-*Xmrk*) aus *X. maculatus* im genetischen Hintergrund von *X. helleri* trugen, die aber keine Melanome mehr ausbildeten (Wittbrodt *et al.*, 1989). In der Mutante *lof*-1 (*lof*: "loss of function") wurde das offene Leseraster von *Xmrk* durch die Insertion eines LTR-Retrotransposons (*TX-1*) unterbrochen. Obwohl *TX-1* keinen intakten offenen Leserahmen aufweist, also nicht autonom ist, ist es offensichtlich aktiv und in allen getesteten Vertretern der Poeciliidae verbreitet (>50-100 Kopien pro Genom), nicht jedoch außerhalb der Familie. Die Mutante *lof*-2 hat *Xmrk* durch Deletion komplett verloren. Der Locus für rote und gelbe Pigmentierungsmuster (*RY,* Abb. 2) ist davon nicht betroffen, allerdings werden auch keine Makromelanophoren mehr gebildet. Da das Gen für den die Makromelanophoren bestimmenden Locus (*Mdl,* Abb. 2) noch nicht bekannt ist, könnte die Deletion also auch *Mdl* betreffen (Schartl *et al.*, 1999). Eine dritte Mutante (*lof*-3) mit dem gleichen Phänotyp ist noch nicht untersucht (Schartl *et al.*, 1999).

Das Onkogen *Xmrk* (früher "ONC-*Xmrk*") entstand vor ca. 5 Millionen Jahren durch Duplikation aus dem Proto-Onkogen *egfrb* (früher "INV-*Xmrk*" aufgrund seiner "invariant band" in der Analyse von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen, vgl. Abb. 6), das in allen *Xiphophorus*-Arten zu finden ist (Schartl, 1990; Volff & Schartl, 2003). Es wurde vorgeschlagen, dass eine vom sogenannten *D*-Locus abgeleitete Sequenz, die in *X. maculatus* direkt stromaufwärts der 5' untranslatierten Region von *Xmrk* aber nicht von *egfrb* liegt, die transkriptionelle Kontrolle des Onkogens veränderte (Adam *et al.*, 1993). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass auch stromaufwärts des kodierenden Bereichs von *egfrb* liegende Sequenzen in die Duplikation eingeschlossen waren und anschließend unterschiedliche Rekombinationsereignisse in verschiedenen Arten auch die potentiellen Promotor-Bereiche von *Xmrk* unterschiedlich veränderten (Volff *et al*., 2003b).

Der *Xmrk*-Promotor von *X. maculatus* enthält im Gegensatz zum *egfrb*-Promotor ein aktivierendes GC-Box Element, das den Transkriptionsfaktor Sp1 binden kann (Baudler *et*

al., 1997). Er ist in hohem Maße methyliert in nicht-transformierten Geweben und deutlich schwächer methyliert im Tumorgewebe von Rückkreuzungsfischen. Der *Xmrk*-Promotor kann in einigen Tumorzellen sogar völlig demethyliert sein, wie es in der Melanomzelllinie PSM ("Platy Swordtail Melanoma") der Fall ist. Im Gegensatz dazu ist der *egfrb*-Promotor in den Zellen gesunder Organe nicht methyliert, aber dafür in der Melanomzelllinie PSM, was für eine differenzielle Regulation der Transkription des Onkogens *Xmrk* und des Proto-Onkogens *egfrb* über den Methylierungsgrad ihrer Promotoren spricht (Altschmied *et al.*, 1997a).

Während die Expression von *egfrb* in allen Organen von *X. maculatus* und Rückkreuzungshybriden mit *X. helleri* nachgewiesen werden konnte, ist die Expression von *Xmrk* in benignen und malignen Melanomen stark erhöht im Vergleich zu *egfrb.* In den gesunden Organen lässt sich nur mittels sensitiver PCR-Methoden eine extrem schwache Expression von *Xmrk* nachweisen (Mäueler *et al.*, 1993; Schartl *et al.*, 1999). Die positive Korrelation zwischen der Expression von *Xmrk* und der Malignität von erblichen Tumoren in *Xiphophorus*-Hybriden unterstreicht die Rolle von *Xmrk* als Auslöser der Tumorbildung. Dafür sprechen auch Ergebnisse nach der ektopischen Expression des Onkogens *Xmrk* und einer chimären Rezeptortyrosinkinase in Embryonen einer anderen Fischart, des Medaka (*Oryzias latipes*). Die chimäre RTK besteht aus dem intrazellulären Teil von Xmrk und den extrazellulären und Transmembrandomänen des menschlichen EGF-Rezeptors (HER), der durch Koinjektion seines Liganden (hTGFalpha) aktiviert werden kann. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass *Xmrk* schon nach kurzer Latenzzeit und in hohem Maße zur gewebsspezifischen Bildung von Tumoren führt, und zwar in einer Rate, die mit der der aktivierten chimären RTK vergleichbar ist (Winkler *et al.*, 1994). Da die nicht aktivierte chimäre RTK überhaupt nicht zur Tumorgenese führte, wurde geschlossen, dass neben zelltypischen Signalkaskaden, die an der Tumorgenese beteiligt sind, auch aktivierende Mutationen von *Xmrk* oder in den Medaka-Embryonen vorhandene Liganden eine Rolle spielen könnten. Die Rolle von Liganden konnte in diesem System nicht eindeutig geklärt werden. Allerdings zeigen Untersuchungen in Zelllinien, dass bestimmte Mutationen in *Xmrk* zur Bildung von konstitutiven Dimeren und Liganden-unabhängiger Aktivierung führen (Wittbrodt *et al.*, 1992; Dimitrijevic *et al.*, 1998; Gomez *et al.*, 2001). Dies deutet darauf hin, dass der Ligand keine ursächliche Rolle spielt.

1.3 *Xmrk* und *egfrb* sind eng gekoppelt mit dem Geschlechts-bestimmungslocus *SD* in *X. maculatus*

Es war schon vor der Identifizierung von *Xmrk* bekannt, dass *Tu* auf den Geschlechts-chromosomen von *Xiphophorus maculatus* liegt. Entgegen der früheren Annahme, *Tu* steuere auch die Entwicklung der Makromelanophorenmuster (Anders, 1991), konnte nach der molekularen Analyse von *Xmrk* der eng gekoppelte Locus *Mdl* ("Macromelanophore determining locus") als separater Locus stromaufwärts von *Xmrk* nachgewiesen werden (Weis & Schartl, 1998).

Neben *Mdl* sind noch andere Loci (Übersicht in Gutbrod & Schartl, 1999) mit dem *Xmrk*-Locus gekoppelt (Abb. 2), nämlich *SD* ("sex-determining locus"), der das Geschlecht der Fische bestimmt, und *RY* ("red-yellow"), ein weiterer Locus für Pigmentmuster strom-abwärts von *Xmrk*, der rote, gelbe und bräunliche Pigmentmuster der Iris, des Körpers und der Flossen bestimmt. Der Zeitpunkt der sexuellen Reife eines Individuums wird vom postulierten Locus *P* ("pituitary" or "puberty" gene) bestimmt (Kallman & Schreibman, 1973; Schreibman *et al.*, 1994), welcher zwar mit *Xmrk* gekoppelt ist, jedoch nicht relativ zu den anderen Loci positioniert werden konnte (Gutbrod & Schartl, 1999).

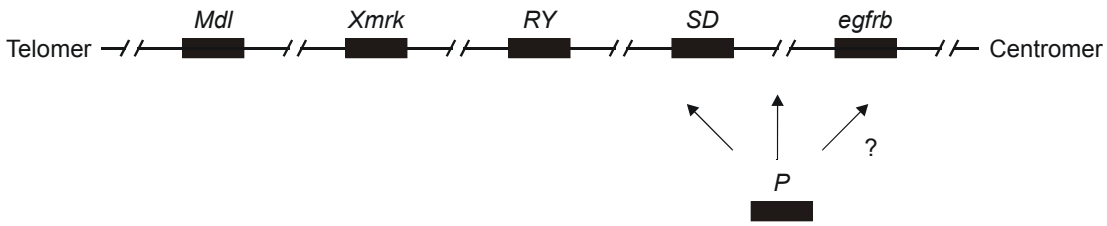

Abbildung 2: Postulierte Abfolge der mit dem Geschlechtsbestimmungslocus *SD* gekoppelten Gene und Loci in *X. maculatus*. Die Abfolge ist vom Telomer zum Centromer in Orientierung zu *Xmrk* (5' → 3') gezeichnet. *Mdl*: Macromelanophore-determining locus, *Xmrk*: *Xiphophorus* melanoma receptor kinase, *RY*: red-yellow pigment pattern locus, *SD*: sex-determining locus, *P*: puberty locus, *egfrb*: epidermal growth factor receptor b (siehe Text); verändert nach Gutbrod & Schartl (1999).

Die extrem geringe Rekombinationshäufigkeit zwischen den in Abbildung 2 gezeigten Markern, die in verschiedenen Untersuchungen immer unter 1% lag, beschränkt den genetischen Abstand zwischen *Xmrk* und *egfrb* auf 0,6 centiMorgan (Gutbrod & Schartl, 1999). Eine von *Xmrk* gewonnene Probe (Cosmid 036 K05) konnte durch FISH

(Fluorescence *in situ* hybridisation) der subtelomerischen Region zweier homomorpher, telocentrischer Chromosomen zugeordnet werden (Nanda *et al.*, 2000). Falls die Rekombinationshäufigkeit nicht eingeschränkt ist, z.B. durch eine zytologisch nicht sichtbare Differenzierung der Gonosomen in *X. maculatus*, könnte der physikalische Abstand zwischen *Xmrk* und *egfrb* weniger als 1 Mb betragen.

1.4 Geschlechtsbestimmung in *X. maculatus*

Fische der Gattung *Xiphophorus* stellen eins der am besten untersuchten Systeme zur genetischen Geschlechtsbestimmung in Fischen dar (Übersicht in Kallman, 1984; Volff & Schartl, 2001). Innerhalb der Art *X. maculatus* existieren drei Geschlechtschromosomen (W, X, Y), deren Kombinationen miteinander zu männlicher oder weiblicher Heterogametie führen können. Männliche Fische können XY und YY sein, weibliche XX, XW oder YW, allerdings scheint das W-Chromosom in manchen natürlichen Populationen nicht vorhanden zu sein, z.B. in Populationen des Rio Jamapa-Systems.

Nach der Hypothese von Kallman besitzen alle drei Geschlechtschromosomen den Locus *SD*. Auf dem W-Chromosom existieren sog. Operatoren, die die Funktion des das männliche Geschlecht bestimmenden Faktors *SD* unterdrücken. Diese Operatoren können unterschiedliche Promotoren oder regulatorische Elemente in verschiedenen Allelen von *SD* sein oder sogar ein Locus auf dem W-Chromosom, der die Funktion von *SD* unterdrückt. Ein alternatives Modell von Volff & Schartl (2001) schlägt einen Dosiseffekt von *SD* vor: Ein dosis-sensitives Gen könnte in null (W), einer (X) oder zwei Kopien (Y) vorliegen und im Fall von null bis zwei Kopien (WW, WX, XX) im Genom von *X. maculatus* zur Entwicklung des weiblichen Geschlechts führen und im Fall von drei oder vier Kopien (XY, YY) zum männlichen. Dieses Modell impliziert gleichzeitig einen Mechanismus zur Entstehung dieser drei Chromosomen, der die drei Chromosomen quasi ineinander umwandeln kann. Durch die Duplikation oder Deletion einer Kopie dieses Gens oder auch die Zerstörung seiner Funktion durch andere Ereignisse wie Mutationen oder Insertion eines Retroelements, wie sie schon für *Xmrk* beschrieben wurden (Schartl *et al.*, 1999), könnte die Anzahl (funktioneller) Kopien verändert werden.

Das geschlechtsbestimmende Gen von *X. maculatus* ist jedoch noch unbekannt. Erst nach seiner Identifizierung können funktionelle Studien die beschriebenen Modelle zur Natur von *SD* bestätigen oder widerlegen.

1.5 Mechanismen der Geschlechtsbestimmung

Welche Gene kommen als Kandidaten für den Geschlechtsbestimmungslocus in *X. maculatus* in Frage? Ein Vergleich mit Geschlechtsbestimmungssystemen anderer Arten und den daran beteiligten Genen erfordert zunächst die Definition ihrer Rolle im Mechanismus der Entwicklung zum einen oder anderen Geschlecht. Geschlechtsbestimmende Gene sind solche, die die Entwicklung der undifferenzierten Gonade in die männliche oder weibliche Gonade initiieren, wofür die Anwesenheit eines Mastergens wie *Sry* (Sex-determining region on Y chromosome, Sinclair *et al.*, 1990) in Mensch und Maus auf dem Y-Chromosom ein Paradebeispiel darstellt. Sie werden im zeitlichen Ablauf gefolgt von Genen, die die Differenzierung der Gonade bis hin zum Umbau des Urogenitalsystems und die Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale steuern. Speziell im Hinblick auf Fertilitätsstörungen sind auch Gene zu benennen, deren Einfluss auf die Reproduktionsfähigkeit des Individuums untrennbar mit der Fortpflanzung verbunden sind, die jedoch nicht geschlechtsbestimmend wirken (Hurst & Randerson, 1999).

Es wurde vorgeschlagen, dass geschlechtsbestimmende Gene, die an der Spitze der Kaskade stehen, eher im Lauf der Evolution ausgetauscht werden als Gene, die weiter unten in der Kaskade liegen (Übersicht in Marin & Baker, 1998; Zarkower, 2001; Graham *et al.*, 2003). Aufgrund der komplexen Wechselwirkungen innerhalb der Geschlechtsbestimmungskaskade kann die Fixierung eines neu entstandenen Mastergens, das oberhalb aller anderen physiologischen Prozesse der Differenzierung beider Geschlechter steht, vor allem im Hinblick auf die Fertilität der Individuen und ihrer Nachkommen, leichter erfolgen als die Übernahme dieser Funktion durch bereits vorhandene Gene. Diese besitzen mitunter schon pleiotrope Funktionen in beiden Geschlechtern und müssten diese neue Funktion zeitgleich bzw. parallel zu ihren bereits vorhandenen entwickeln, ohne die Fertilität oder somatische Prozesse im einen oder anderen Geschlecht zu beeinflussen.

1.5.1 Geschlechtsbestimmung in Säugern

Sry ist als Mastergen der Geschlechtsbestimmung in Säugern vor ca. 140 Millionen Jahren entstanden und hat die Regulation der männlichen Geschlechtsbestimmung übernommen, möglicherweise durch Regulation von *Sox9* (Canning & Lovell-Badge, 2002). Interessanterweise ist Sry kaum konserviert in verschiedenen Arten, mit Ausnahme der HMG (High mobility group) Domäne. Die HMG-Domäne bindet an spezifische DNA-Sequenzen der Doppelhelix und biegt sie in einem wiederum von der Sequenz abhängigen Winkel

(Pontiggia *et al.*, 1994). Zeitpunkt und Höhe der Expression von *Sry* ist in verschiedenen Arten wie Mensch und Maus entscheidend für seine Funktion, allerdings ist die Expression nicht in allen Arten gewebespezifisch. So ist die Expression von *Sry* in der Maus auf die Genitalleiste und das fötale Gehirn beschränkt, in Mensch und Beuteltieren aber in vielen Geweben nachzuweisen (Übersicht in Koopman *et al.*, 2001).

Vielfältige Mechanismen auf den Ebenen der Gene und Chromosomen wie Inversionen, Translokationen und Deletionen etablierten die heute bekannten heteromorphen Gonosomen des Menschen und der anderen placentalen Säuger (Übersicht in Graves, 1998; Graves *et al.*, 1998; Lahn *et al.*, 2001). Trotzdem ist dieser Mechanismus nicht in allen Säugern fixiert, wie Varianten des X-Chromosoms (X*) im Waldlemming *Myopus schisticolor*, die zu X*Y-Weibchen führen, und Untersuchungen an der Persischen Wühlmaus *Ellobius lutescens*, die kein Y-Chromosom und *Sry*-Gen besitzt, zeigen (Graves, 2002; Just *et al.*, 2002).

1.5.2 Geschlechtsbestimmung in Fischen

Mit Ausnahme des Medaka (Kapitel 1.5.3) ist über die Geschlechtsbestimmungsmechanismen in Fischen, vor allem deren molekularen Grundlagen, bisher relativ wenig bekannt. Fische zeigen eine erstaunliche Vielfalt geschlechtsbestimmender Mechanismen: Genetische und umweltabhängige Geschlechtsbestimmung sind weit verbreitet, ebenso alle Arten der Zwittrigkeit wie simultaner, protandrischer und gynandrischer Hermaphroditismus und sogar gynogenetische Fortpflanzung. Das Spektrum von umweltabhängigen Geschlechtsbestimmungssystemen reicht von Faktoren wie Temperatur, Photoperiode und pH-Wert bis zu sozialen Faktoren (Übersicht in Baroiller *et al.*, 1999).

Wie *Xiphophorus* innerhalb derselben Gattung zeigt, kann die genetische Geschlechtsbestimmung in Fischen auf männlicher (XX/XY) oder weiblicher (WZ/ZZ) Heterogametie beruhen (*X. maculatus*), oder sie kann zusätzlich autosomalen Faktoren unterliegen (*X. milleri*) oder polyfaktoriell sein (*X. helleri*) (Kallman, 1984; Volff & Schartl, 2001). Nicht nur die Präsenz dieser gut untersuchten Mechanismen innerhalb einer Gattung und die damit verbundene Möglichkeit, in Hybriden potentielle geschlechtsbestimmende Gene untersuchen zu können, sondern auch das Fehlen von Informationen über die Geschlechtsbestimmung der wichtigen Modellorganismen *Danio rerio* und *Takifugu rubripes*, machen *Xiphophorus* zu einem wichtigen alternativen Modell.

1.5.3 Geschlechtsbestimmung im Medaka (*Oryzias latipes*)

War zu Beginn dieser Arbeit noch kein geschlechtsbestimmendes Gen innerhalb der Fische bekannt, konnte kürzlich das erste von *Sry* unterschiedliche, geschlechtsbestimmende Gen innerhalb der Vertebraten nachgewiesen werden. Im Medaka (*Oryzias latipes*) wurde zeitgleich durch positionelle Klonierung des Y-chromosomalen Bereichs und Analyse von Mutanten der Geschlechtsbestimmung *Dmrt1bY* (auch *DMY* und *dmrt1Y* genannt) als wahrscheinliches Mastergen der Geschlechtbestimmung im Medaka identifiziert (Matsuda *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2002). *Dmrt1bY* liegt in einer nur 250 kb großen, Y-spezifischen Region. Trotzdem scheint dieser Mechanismus beschränkt zu sein auf nur einige Stämme/ Populationen der Art *O. latipes* (Kondo *et al.*, 2003) und seine nächstverwandte Art *O. curvinotus* (Matsuda *et al.*, 2003). Dies lässt vermuten, dass *Dmrt1bY* quasi am Anfang seiner Herrschaft über die Geschlechtsbestimmungskaskade in diesen beiden Arten steht. Die molekularphylogenetische Untersuchung von *Dmrt1bY* zeigt, dass dieses Gen evolutionär sehr jung ist. *Dmrt1bY* entstand durch Duplikation des autosomalen Gens *Dmrt1a* (*Dmrt1*) und ist in seiner Rolle scheinbar auf den Genus *Oryzias* beschränkt. Auch wenn eine unabhängige Duplikation von *Dmrt1* in anderen Fischarten nicht ausgeschlossen werden kann, ist *Dmrt1bY* nicht das universelle geschlechtsbestimmende Gen der Fische (Kondo *et al.*, 2003; Veith *et al.*, 2003; Volff *et al.*, 2003a).

1.6 Klassen der Melanocortin-Rezeptoren

Melanocortin-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen. Fünf Klassen (Mc1r bis Mc5r) sind in Säugern und Fischen beschrieben (Logan *et al.*, 2003). Ihre Liganden sind Melanocyten-stimulierende Hormone (alpha-, beta- und gamma-MSH) und Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), die durch post-translationelle Spaltung des Pro-Opiomelanocortins (POMC) gebildet werden. Die Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Affinität zu alpha-, beta- und gamma-MSH, einen Sonderfall stellt Mc2r dar, der ACTH mit höchster Affinität bindet und MSH nicht. Antagonistisch wirken Agouti und Agouti-related Protein (AGRP, Jordan & Jackson, 1998). Die Rezeptoren unterscheiden sich außer in ihren Affinitäten zu den verschiedenen Liganden bzw. Antagonisten auch in ihrem Expressionsmuster (Übersicht in Wikberg *et al.*, 2000).

Die Klasse der Melanocortin-Rezeptoren von Typ 1 (Mc1r) spielt in höheren Vertebraten eine wichtige Rolle in der Pigmentierung der Haut und in Entzündungsprozessen. Mc1r bindet mit höchster Affinität alpha-MSH, aber auch ACTH, die beide in der Epidermis

nach UV-Bestrahlung vermehrt gebildet werden. Antagonistisch auf Mc1r wirkt Agouti. Entsprechend seiner Rolle in der Pigmentierung wird MC1R hauptsächlich in der Haut exprimiert (Wikberg *et al.*, 2000). Mc2r wird ebenfalls in der Haut exprimiert, hauptsächlich jedoch in der Nebennierenrinde. In Mäusen wurde Mc2r auch in Fettzellen gefunden, nicht jedoch im Menschen. Zusätzlich weisen weitere Expressionsmuster im Huhn auf zusätzliche Funktionen außerhalb der Säuger hin. Mc2r bindet speziell ACTH und keinen der anderen Liganden (Schiöth *et al.*, 2003). Mc3r und Mc4r werden in Säugern in verschiedenen Gehirnregionen exprimiert, wo diese Rezeptoren in die Regulation des Energiehaushalts eingreifen. Knockout-Experimente an Mäusen zeigen, dass der Verlust von Mc3r eine Verschiebung der mageren Körpermasse zu erhöhtem Fettanteil bewirkt, die Tiere aber nicht übergewichtig sind. Im Gegensatz dazu führen Mutationen von Mc4r in Maus und Mensch zu Übergewicht, was eine nicht-redundante Rolle dieser beiden Rezeptoren vermuten lässt (Yeo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002). Mc5r wird in einer Vielzahl von Geweben und im Gehirn von Säugern exprimiert und soll eine Rolle in der Sekretion exokriner Drüsen spielen. Dieser Rezeptor bindet hauptsächlich alpha-MSH aber keinen der Antagonisten (Wikberg *et al.*, 2000).

1.7 Die Rolle von Mc4r im Energiehaushalt und in der Pigmentierung

Obwohl sich funktionelle Analysen der Melanocortin-Rezeptoren in der Literatur bisher hauptsächlich auf Säuger beschränkten, zeigt die zunehmende Zahl an Veröffentlichungen, dass diese Rezeptoren in anderen Wirbeltierklassen andere oder zusätzliche Funktionen ausüben können. Die Klasse der Melanocortin-Rezeptoren von Typ 4 (MC4R) spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushalts (Jordan & Jackson, 1998; Jackson, 1999; Yeo *et al.*, 2003), aber auch im sexuellen Verhalten und erektilen Funktion des Penis von Ratten und Mäusen (Van der Ploeg *et al.*, 2002). Konsequenterweise wird *Mc4r* in Säugern hauptsächlich im zentralen Nervensystem und Gehirnregionen wie dem Hypothalamus exprimiert (Schiöth & Watanobe, 2002). Im Zebrafisch allerdings wird *Mc4r* auch in Auge, Ovar und Gastrointestinaltrakt exprimiert (Ringholm *et al.*, 2002). Nach der Analyse von Huhn und Goldfisch, die ebenfalls Expression von *Mc4r* in peripheren Organen und differenzielle Expressionsmuster in verschiedenen Gehirnteilen zeigen, wurde postuliert, dass die auf das ZNS beschränkte Expression in Säugern eine funktionelle Spezialisierung der Säuger darstellt (Cerda-Reverter *et al.*, 2003).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ein umfassendes Verständnis molekularbiologischer Vorgänge ist erst durch die Identifizierung der daran beteiligten Faktoren möglich. In *Xiphophorus maculatus* liegen das dominante Onkogen *Xmrk* und das entsprechende Proto-Onkogen *egfrb* in einem relativ kleinen Bereich auf den Geschlechtschromosomen, der so vielfältige Loci wie den Locus für Geschlechtsbestimmung (*SD*), den Locus für den Zeitpunkt der sexuellen Reife (*P*) und solche für Pigmentierungsmuster (*Mdl, RY*) enthält.

Die extrem geringe Rekombinationshäufigkeit (Gutbrod & Schartl, 1999) dieser Marker beschränkt diese Region auf einen genetischen Abstand von ca. 0,6 centiMorgan. Obwohl auch zytologisch scheinbar homomorphe Geschlechtschromosomen Mechanismen zur Einschränkung der Rekombination unterliegen können, wurde der Abstand zwischen *Xmrk* und *egfrb* auf weniger als eine Megabase geschätzt.

Ziel dieser Arbeit war es, die enge Kopplung der beschriebenen Loci in dieser Region des Genoms von *X. maculatus* für eine positionelle Klonierung der noch unbekannten Gene dieser Loci zu nutzen. Beginnend mit den bereits molekular charakterisierten Genen *Xmrk* und *egfrb* sollte mittels der Methode des sog. Chromosomen-Walkings der Aufbau von Cosmid- oder BAC- (Bacterial Artificial Chromosome) Contigs (contigous sets of clones) erfolgen, die die gesamte Region überspannen. Anschließend sollten durch strategisches Sequenzieren und Datenbankvergleiche Gene identifiziert werden, die eine Rolle in einem der beschriebenen Vorgänge (Malignität der Melanome, Pigmentierung, Geschlechts-bestimmung, Pubertät) haben könnten und sie gezielt daraufhin zu analysieren. Außerdem sollte es möglich sein Gene, die durch ihre Funktion in anderen Organismen als Kandidaten für solche Systeme in Frage kommen, gezielt und schnell dieser Region zuzuordnen oder auszuschließen, was besonders im Hinblick auf das geschlechts-bestimmende Gen von Vorteil wäre. Zusätzlich bietet das Modellsystem *Xiphophorus* auch die Möglichkeit, die an *X. maculatus* gewonnenen Erkenntnisse in anderen bereits genetisch gut untersuchten Stämmen oder Arten zu vergleichen und zu verifizieren, was speziell in Hinblick auf die hohe Variabilität der bereits charakterisierten Loci der Tumorentwicklung und Geschlechtsbestimmung in dieser Gattung von Vorteil ist.

2. Material

2.1 Fische

Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Fische der Art *Xiphophorus maculatus* stammten vorwiegend aus geschlossenen Zuchten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Schartl, Physiologische Chemie I, Biozentrum der Universität Würzburg. Zusätzlich wurden Wildfänge von *X. maculatus* untersucht, die während einer Exkursion in Mexiko im Februar 2002 gemacht wurden. An dieser Exkursion beteiligten sich Prof. Dr. Manfred Schartl, Dr. Dunja Lamatsch, Ute Hornung und ich selbst.

Tabelle 1: Genotypen der verwendeten Fische; M: Männchen, W: Weibchen. Die geschlechtschromosomal vererbten Makromelanophorenmuster *Sd* ("Spotted dorsal") und *Sr* ("Stripe sided") und Xantho-/ Erythrophorenmuster *Ar* ("Anal fin red") und *Dr* ("Dorsal red") sind für die X- und Y-Chromosomen angegeben. Die Allele des Proto-Onkogens *egfrb* sind nach ihrer alten Bezeichnung in *X. maculatus* INV1 (X-Allel) und INV2 (Y-Allel) angegeben. * Inzucht-Stamm, abgeleitet aus dem Stamm Jp163A (Kallman, 1975). ** Unterpopulation von WLC1235 mit rekombinantem X-Chromosom.

Population	Stamm-Nummer	Genotyp
Xiphophorus maculatus Rio Jamapa	WLC1274*, "Schröder“	M: $X^{DrSd/INV1}/Y^{ArSr/INV2}$ W: $X^{DrSd/INV1}/X^{DrSd/INV1}$
Xiphophorus maculatus Rio Jamapa	WLC1352, "RJ“	M: $X^{DrSd/INV1}/Y^{ArSr/INV2}$ W: $X^{DrSd/INV1}/X^{DrSd/INV1}$
Xiphophorus maculatus Rio Jamapa	WLC1235, "ArDr“	M: $X^{DrSd/INV1}/Y^{ArSr/INV2}$ W: $X^{DrSd/INV1}/X^{DrSd/INV1}$
Xiphophorus maculatus Rio Jamapa,	WLC1235, "MAD**/ WAD** “	MAD: $X^{DrSd/INV2}/Y^{ArSr/INV2}$ WAD: $X^{DrSd/INV1}/X^{DrSd/INV2}$
BC_n *X.mac/ X.hell*	WLC407	W: X^{DrSd} in *X. helleri*
Xiphophorus helleri	WLC1337, "hIII“	

2.2 Genomische Bibliotheken

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zwei genomische Bibliotheken von *X. maculatus* verwendet. Die erste ist eine Cosmid-Bibliothek, die von Silke Weis in Zusammenarbeit mit Carola Burgtorf erstellt wurde (Burgtorf *et al.*, 1998; Vente *et al.*, 1999) und eine durchschnittliche Insertgröße von 35-40 kb hat. Sie enthält ca. 48 000 Klone und hat eine geschätzte 2,7fache haploide Abdeckung des Genoms von *X. maculatus*.

Aufgrund methodischer Schwierigkeiten mit dieser Bibliothek, die im Kapitel 4.1 beschrieben werden, wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Takashi Aoki und Dr. Takayuki Katagiri (Tokyo University of Fisheries) und Prof. Nobuyoshi Shimizu und Dr. Shuichi Asakawa (Keio School of Medicine, Tokyo) eine BAC- (Bacterial Artificial Chromosome) Bibliothek erstellt (Froschauer *et al.*, 2002). Da dieses Projekt einen wichtigen Teil dieser Doktorarbeit darstellt, wird es in Kapitel 3.1 separat beschrieben.

2.3 Fischzelllinien

Die Zelllinie PSM ("Platy Swordtail Melanoma", Wakamatsu, 1981) stammt aus einem amelanotischen Melanom eines Hybrids von *Xiphophorus maculatus* und *Xiphophorus helleri*. A2 ist eine spontan immortalisierte Zelllinie aus Embryonen von *Xiphophorus xiphidium* (Kuhn *et al.*, 1979). Beide Zelllinien wurden von Petra Fischer (Physiologische Chemie I, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

2.4 Bakterienstämme und Vektoren

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurden *Escherichia coli* XL1-blue (Bullock *et al.*, 1989), *E. coli* DH5α (Sambrook *et al.*, 1989) und Electromaxx® *E. coli* DH10β, (INVITROGEN™) verwendet, als Vektoren pBluescript II KS+/- (STRATAGENE, Amsterdam) und pBAC-*lac* (Asakawa *et al.*, 1997).
Die zur Sequenzierung mittels Transposon-Mutagenese (Kap. 3.13) verwendeten Bakterienstämme *E. coli* JM109 F' Lac[::TnSeq2] und *E. coli* HB101 sowie der Vektor pJOE2114 (Fischer *et al.*, 1996) wurden von Dr. Josef Altenbuchner (Universität Stuttgart) zur Verfügung gestellt.

2.5 Enzyme

Superscript™ II Reverse Transkriptase, *Taq* DNA Polymerase, Large Fragment of Polymerase I (Klenow-Polymerase) und Restriktionsendonukleasen wurden von INVITROGEN, Karlsruhe, bezogen, mit Ausnahme von *Sca*I und *Eco*47III (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot).
T4 DNA Ligase, DNaseI (RNase-frei), und alkalische Phosphatase wurden von ROCHE DIAGNOSTICS GMBH, Mannheim bezogen, Proteinase K und RNase A von MERCK KGAA, Darmstadt.

2.6 Medien, Zusätze und Pufferlösungen

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle Medien, Zusätze und Pufferlösungen nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (50 µg/ml), Chloramphenicol (12,5 µg/ml), Kanamycin (30 µg/ml), Streptomycin (200 µg/ml), Tetracyclin (15 µg/ml).

2.7 Sonstige Chemikalien

Nicht separat aufgeführte Chemikalien waren von höchster Reinheit und wurden von folgenden Firmen bezogen: MERCK KGAA, Darmstadt; PHARMACIA GMBH, Erlangen; ROTH CHEMIE GMBH, Karlsruhe; SERVA ELECTROPHORESIS GMBH, Heidelberg; SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH, Taufkirchen.

2.8 Oligonukleotid-Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von INVITROGEN™ bezogen (Custom Primers) und sind in Tabelle A3 im Anhang aufgeführt. Die Primer wurden als 19-21mere so entworfen, dass ihre Schmelztemperatur T_m ($T_m \approx$ [4* (Anzahl G bzw. C) + 2* (Anzahl A bzw. T)]°C) möglichst zwischen 55 und 62°C betrug.

2.9 Geräte, Hard- und Software

In dieser Arbeit verwendete Geräte werden in den entsprechenden Methoden genannt. Die maximale Zentrifugalbeschleunigung der verwendeten Tischzentrifugen (EPPENDORF® 5415C, HERAEUS® Biofuge pico) ist als Mittelwert von 20.000 g angegeben.

Text- und Bildbearbeitung erfolgten auf IBM-kompatiblen Rechnern von ASUS™ und DELL™ mit MICROSOFT® Office 2000 und COREL ESSENTIALS® 9.0. Sequenzanalysen wurden mit dem Wisconsin Package Version 10.3, Accelrys Inc., San Diego, CA und der darin enthaltenen PAUP4* Software (Swofford, 2003) durchgeführt, die auf UNIX-basierten Zentralrechnern im Rechenzentrum der Universität Würzburg installiert sind.

Zur Sequenzanalyse wurden Datenbanken zum Sequenzvergleich (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/; http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk/blast/) und die NIX-Software verwendet (http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Webapp/nix/). Wenn ein Gen oder Protein in der Referenz-Sequenzdatenbank des NCBI (RefSeq) aufgeführt war, wurde prinzipiell die dort verwendete Zugangsnummer angegeben, z.B. (RefSeq NP_000070).

3. Methoden

3.1 Erstellung der genomischen BAC-Bibliothek von *X. maculatus*

3.1.1 DNA-Isolierung zur Erstellung der BAC-Bibliothek

Zur Erstellung der BAC-Bibliothek wurden nur männliche Individuen (XY-Genotyp) des Stammes *X. maculatus* WLC1274 (Tab. 1) herangezogen, die von Cornelia Körting mittels PCR aus "Fin Clip"-DNA (Kap. 3.2.3) genotypisiert wurden (vgl. Abb. 27).

Die Gehirne von jeweils fünf Individuen wurden isoliert, in 500 µl eiskaltem Fisch-PBS (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 6 mM NaH_2PO_4, pH 7,3) aufgenommen und in einem Glashomogenisator mit eng sitzendem Glaspistill sehr vorsichtig zerkleinert, um die Scherung der DNA zu minimieren. Dabei wurde das Bestehen kleiner Zellklumpen in Kauf genommen. Das Homogenat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 50°C warmer LMP-Agarose (Agarose Low Melt, ROTH®) gemischt und in auf Eis gekühlten Formen zu 100 µl großen Blöckchen gegossen. Nach Erhärten der Agarose wurden die Blöckchen in ESP-Puffer (0,5 M EDTA, 1% Na-Lauroyl-Sarcosinat, 2 mg/ml Proteinase K) überführt und insgesamt 48 h bei 50°C inkubiert. In den ersten Stunden wurden die Inkubationsgefäße regelmäßig gewendet, danach nur noch nach jeweils 2-8 h, und der Puffer wurde nach 24 h gewechselt. Zur Inaktivierung der Proteinase, die den nachfolgenden Restriktionsverdau beeinflussen kann, wurden die Blöckchen für 30 min bei Raumtemperatur in TE mit PMSF (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 230µM PMSF) gewaschen, zur Entfernung des PMSF 3 Mal bei 50°C in TE. Die Blöckchen wurden in 0,5 M EDTA, pH 8 bei 4°C gelagert und bei Raumtemperatur transportiert.

Zur Qualitätskontrolle der DNA wurde aus jeder Präparation ein Blöckchen DNA vertikal halbiert und ohne bzw. nach Restriktionsverdau mittels Pulsgelelektrophorese (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis) getestet. Abbildung 3 A zeigt ein solches Gel, das während der Etablierung der Methode gemacht wurde. Die Methode wurde erfolgreich etabliert, da die DNA in hochmolekularer Form vorlag (Kontrolle) und vollständig verdaubar war (10 U/ml *Hin*dIII).

Alle Arbeitsschritte wurden mit abgeschnittenen Pipettenspitzen durchgeführt, um Scherkräfte zu minimieren, verwendete Spatel und Messer wurden abgeflammt und die PFGE-Apparatur zum Abbau eventuell noch verbliebener DNA vor jedem Lauf mit 2 N HCl und H_2O gespült.

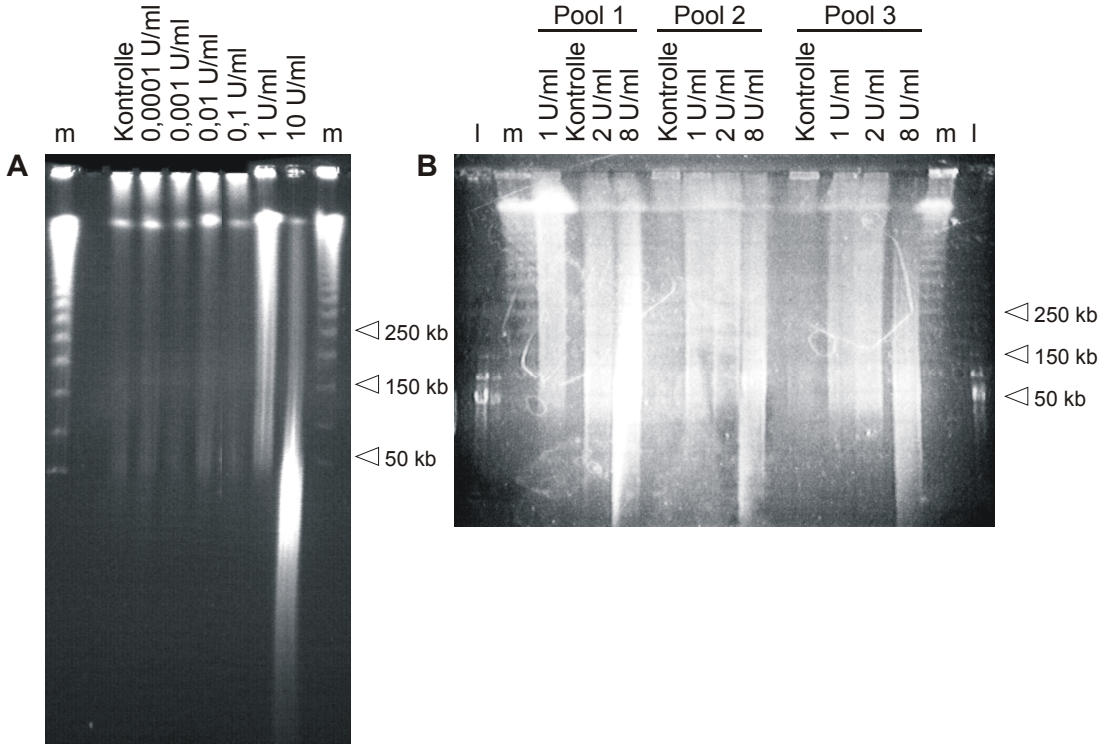

Abbildung 3: (A) PFGE-Analyse hochmolekularer DNA von *X. maculatus* ohne und nach *Hin*dIII-Verdau. Der Restriktionsverdau erfolgte mit den angegebenen Enzymkonzentrationen für 2 Stunden bei 37°C. Laufbedingungen (STRATAGENE RAGE™): 3-150 sec Intervalle, exponentiell steigend, 220-150 V Spannung, logarithmisch fallend, 20 h Laufzeit bei 10°C. (B) Partieller Verdau der hochmolekularen DNA von *X. maculatus* (Stamm WLC1274, je fünf Individuen bildeten Pool 1-3). Enzymkonzentrationen (*Hin*dIII) sind angegeben, Inkubationszeit 1 Stunde. Laufbedingungen (CHEF DR® II, BIORAD™): 5-50 sec Intervalle, 6 V/cm, 20 h, 14°C. Kontrollen: Inkubation der DNA ohne Enzym; l: lambda-Concatemere (Präparation Dr. T. Katagiri); m: lambda-Concatemere (Promega-Markers® Lambda-Ladders).

3.1.2 Partieller Restriktionsverdau der hochmolekularen DNA

Zur Reduzierung der EDTA-Konzentration wurden die DNA-Blöckchen 30 min in einer Petrischale in TE-Puffer gewaschen. In parallelen Ansätzen von das Restriktionsenzym *Hin*dIII nicht aktivierendem Restriktionspuffer (10 mM Tris-Cl, 50 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA) mit steigenden Enzymkonzentrationen (1-4 U in 500 µl) wurden die DNA-Blöckchen zur vollständigen Diffusion Ü/N bei 4°C inkubiert und nach Zugabe des *Hin*dIII-aktivierenden $MgCl_2$ in der Endkonzentration 10 mM 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20% Ladepuffer (90 mM EDTA, 0,25% Brom-Phenolblau) gestoppt. Die erforderliche Enzymkonzentration zum Erhalt der gewünschten Insertgröße (Kap. 3.1.3) wurde für jede DNA-Präparation separat bestimmt (Abb. 3 B).

Zur Erstellung der BAC-Bibliothek wurden die DNA-Präparationen 1 und 3 von *X. maculatus* WLC1274 nach Partialverdau mit 8 U/ml *Hin*dIII verwendet.

3.1.3 Größenselektion der Insert-DNA

Ein entscheidender Punkt bei der Konstruktion einer BAC-Bibliothek ist die Größenselektion der Insert-DNA. Zum einen lassen sich kleinere Konstrukte besser transformieren, was zu einem Ungleichgewicht der Insertgröße in der Bibliothek führt und die erwünschte Abdeckung des Genoms in Frage stellen würde (Dr. T. Katagiri, persönliche Mitteilung), zum anderen können rekombinante Inserte (Ligation zweier DNA-Fragmente vor der Klonierung in den Vektor oder Deletionen innerhalb eines Inserts nachher) leichter erkannt werden, wenn ihre Größe nicht die gewählten Parameter erfüllt. Wir planten eine Insertgröße zwischen 150 und 250 kb für die Bibliothek.

Zur Größenselektion der DNA wurden 3 Agarose-Gele mittels PFGE (CHEF DR® II, BIORAD™) analysiert und bearbeitet. Nach jedem Lauf wurde die jeweils äußerste Spur des Gels abgeschnitten, mit Ethidiumbromid gefärbt und vermessen (Abb. 4 A, C u. D)

Das erste 1% NMP-Agarose-Gel (Normal Melting Point, Geliertemperatur ca. 36 °C) diente zur Entfernung kleiner DNA-Fragmente aus der Präparation. Ein sehr kurzer Lauf (5-20 sec Intervalle, 6 V/cm, 5 h, 14°C) sollte verhindern, dass Fragmente aus dem Gel laufen und im Pufferstrom der Maschine wieder ins Gel transportiert werden (Abb. 4 A). Der Bereich des Gels mit DNA-Fragmenten kleiner als 50 kb wurde abgeschnitten, zur Kontrolle des Restriktionsverdaus gefärbt (Abb. 4 B) und verworfen. Das zweite NMP-Agarose-Gel wurde um den Rest des ersten Gels gegossen und stellte die eigentliche Größenselektion dar (5-20 sec Intervalle, 6 V/cm, 19 h, 14°C). Der Bereich zwischen 150 und 250 kb wurde bestimmt und zur Kontrolle des Partialverdaus auch eine Spur DNA gefärbt (Abb. 4 C). Der Bereich des Gels mit Fragmenten von 150-250 kb wurde in umgekehrter Orientierung in das dritte Agarose-Gel, das zur besseren DNA-Isolierung aus 1% LMP-Agarose (Low Melting Point, Geliertemperatur unter 31 °C) bestand, eingegossen und diente zur Konzentration der Insert-DNA (Abb. 4 D). Die Laufbedingungen waren die Summe der Laufzeiten der beiden vorigen Gele (5-20 sec Intervalle, 6 V/cm, 24 h, 14°C).

Zur Isolation der DNA aus der LMP-Agarose wurden Gelstücke von 400 mg in Reaktionsgefäße überführt und nach Zugabe von 200 mg NaI Ü/N bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Dialyse des NaI wurde das geschmolzene Gel auf ein Membran pipettiert (MILLIPORE™ White, 0,025 µm Porengröße), die auf vorgewärmtem TE-Puffer schwamm. Die LMP-Agarose wurde durch tropfenweise Zugabe von Gelase (EPICENTRE™, 1 U in 30 µl TE-Puffer) in mehreren Schritten verdaut. Zunächst wurde mit 1 U Gelase 15 min bei 47°C inkubiert und dieser Schritt mit 2 U Gelase wiederholt. Anschließend wurde die

DNA in ein Reaktionsgefäß überführt und nach erneuter Zugabe von 2 U Gelase 2 h bei 47°C inkubiert. Die DNA-Präparation blieb nun flüssig und wurde nach einem Test-Gel zur Konzentrationsbestimmung (Abb. 4 E) bei 4°C gelagert.

Bei einer zweiten DNA-Isolierung wurde nur die DNA-Präparation 3 (Pool 3, Abb. 3 B) verwendet und neben der oben beschriebenen Insertgröße wurden auch Fragmente von 50-100 kb und 100-150 kb von Dr. Takayuki Katagiri isoliert (siehe 3.1.7).

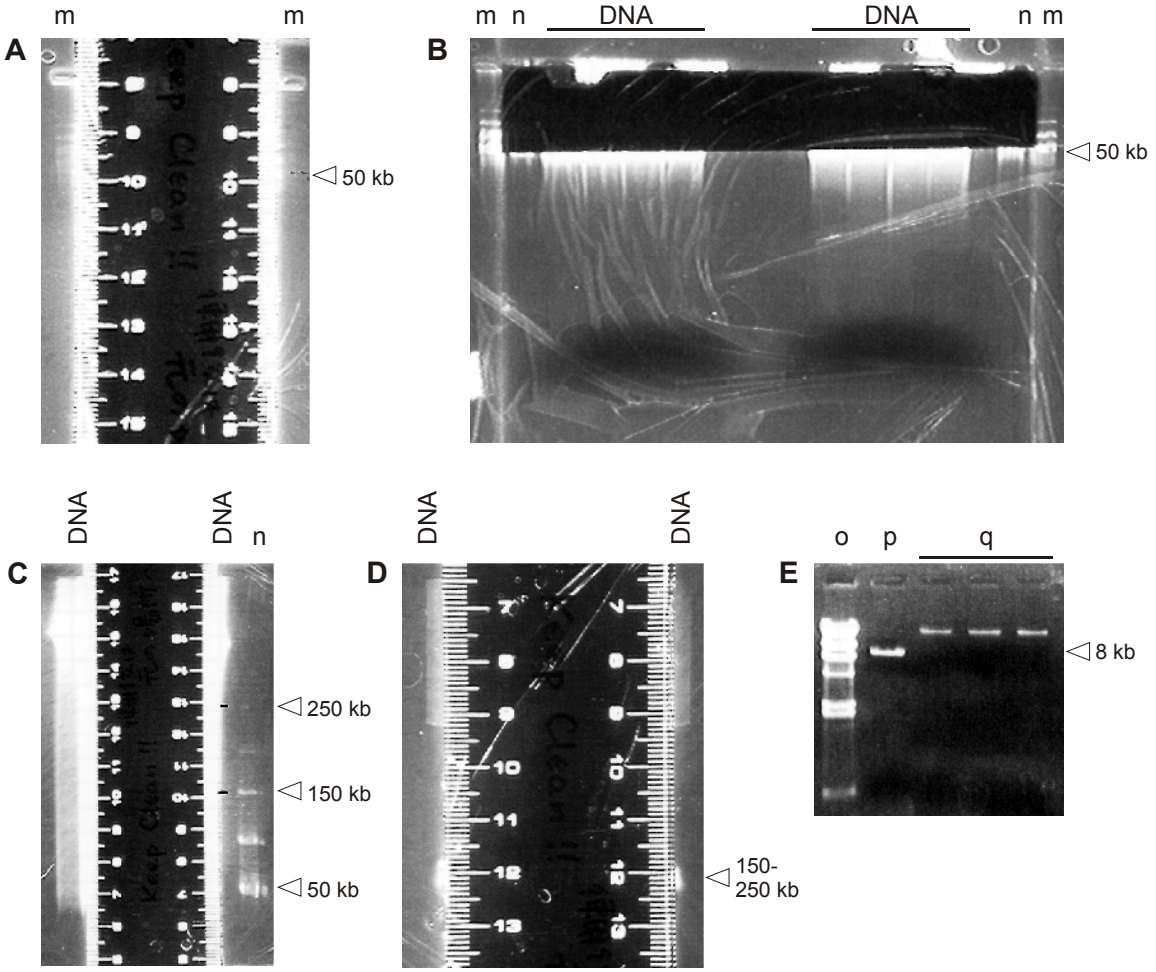

Abbildung 4: Analyse von PFGE-Gelen zur Größenselektion der partiell verdauten hochmolekularen DNA. (A) Erstes Gel zur Abtrennung von DNA-Fragmenten kleiner als 50 kb, die äußere Marker-Spur gefärbt und vermessen. (B) Färbung der Teile des ersten Gels, die verworfen wurden. (C) Zweites Gel zur Auftrennung der Fragmente von 150-250 kb, die äußere Marker-Spur und ein Teil der DNA-Spur zur Kontrolle des Partialverdaus gefärbt und vermessen. (D) Drittes Gel zur Konzentration der Fragmente in einem kleinen Bereich, ein Teil der DNA-Spur gefärbt und vermessen. (E) Agarose-Gel zur Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA. Elektrophorese-Bedingungen siehe Text. **m** äußere und **n** innere Marker-Spur (lambda-Concatemere), **o** Lambda-*Hin*dIII-Marker, **p** Vektor pBAC-lac, **q** Insert-DNA nach Aufreinigung.

3.1.4 Ligation und Transformation

Das optimale Verhältnis von Insert-DNA zum dephosphorylierten Vektor pBAC-lac wurde für die Ligation experimentell bestimmt. In einem Ansatz von 20 µl wurden 0,2 µl Vektor und 10 µl DNA mit 0,05 U Ligase (MBI FERMENTAS™) im mitgelieferten Puffer in einem Thermocycler ligiert (10-20* [0'30'' bei 25°C/ 30'00'' bei 4°C/ 30'00'' bei 14°C]).

Vor der Transformation wurde die DNA zur Äquilibrierung auf eine auf TE-Puffer (2 mM Tris-Cl, 200 µM EDTA) schwimmende Membran getropft und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

10 µl des Ligationsansatzes wurden in 1 mm Küvetten auf Eis mit 35 µl elektrokompetenten Zellen (Electromaxx®, *E. coli* DH10β, INVITROGEN™) gemischt und mittels des Gene Pulser® (BIORAD™) transformiert (2,00 kV, 25 µF capacitance, low range 200, high range ∞). Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) wurden die Zellen 40 min zur Regeneration bei 37°C inkubiert, mit 5 ml SOC-Medium und 500 µl IPTG/Xgal (je 2% w/v in Dimethyl-Formamid) gemischt und auf LB-Agar-Platten durch verschütteln und trocknen des Mediums ausplattiert.

3.1.5 Größe der Bibliothek, Erstellung und Lagerung von Kopien

Der Vektor pBAC-*lac* erlaubt eine blau/ weiß-Selektionierung der Kolonien mit Insert. Ein über eine Kamera gesteuerter Roboterarm erkannte die helleren weißen Kolonien, pickte insgesamt 49.920 Kolonien und impfte damit 130 384well-Platten (50 µl LB-Medium pro Vertiefung, 12,5 µg/ml Chloramphenicol, 10% (w/v) Glycerin) an. Die optische Kontrolle und Bedienung des Roboters ließen eine geschätzte Fehlerquote von weniger als 5% Kolonien ohne Insert zu. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C wurden 2 Kopien der Bibliothek erstellt, ebenfalls über Nacht inkubiert und bei –80°C eingefroren. Bei diesem Schritt kann es vorkommen, dass nicht alle Klone in den Platten anwachsen, dieser Fehler betrug nach optischer Kontrolle weniger als 1% (0-4 leere Vertiefungen pro 384well-Platte). Die Original-Platten werden zur Zeit in der Keio School of Medicine, Tokyo, Japan, gelagert, beide Kopien in der Physiologischen Chemie I, Würzburg. Eine Kopie, die speziell zur Erstellung der Kolonie-Filter am RZPD, Berlin (siehe 3.1.6) angefertigt wurde, wird noch dort gelagert.

3.1.6 Membranen

Die HD-Membranen (High Density colony array on nylon membranes) zur Southern-Blot-Hybridisierungsanalyse wurden vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin (RZPD, http://www.rzpd.de/) erstellt. 15 Sätze von jeweils zwei Membranen stehen zur Durchmusterung in Würzburg zur Verfügung.

3.1.7 Kolonie-Stocks

Die in 3.1.3 erwähnten weiteren DNA-Isolierungen wurden ebenfalls ligiert und transformiert. Etwa 70-100.000 Kolonien mit einer Insertgröße von 50-100 kb und etwa 30-50.000 Kolonien mit Inserten von 100-150 kb wurden in LB-Medium mit 10% Glycerin aufgenommen und bei –80°C eingefroren. Die Kolonie-Stocks werden in Würzburg gelagert, der Titer ist noch nicht bestimmt.

3.2 DNA-Isolierung

3.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Fischen

Diese Methode wurde modifiziert nach Blin & Stafford (1976). Die Fische wurden 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) wurde 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 3 h bei 80°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die auf Raumtemperatur abgekühlte Suspension wurde 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 wurde zur Phasentrennung 10 min bei 2.500 Upm (HETTICH® Rotina) zentrifugiert. Anschließend wurde nochmals 1 Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, 15 min inkubiert und erneut zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein autoklaviertes Reagenzglas überführt, mit einem Volumen 2-Propanol versetzt und durch leichtes Schütteln vorsichtig gemischt. Die sichtbar ausfallende hochmolekulare DNA wurde um einen Glasstab gewickelt, in 70% Ethanol getaucht und in TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8) rückgelöst. Für Individuen von *X. maculatus* wurde als Ausgangsvolumen 1,5 ml Lysepuffer verwendet und die DNA in 500 µl TE rückgelöst.

3.2.2 Isolierung genomischer DNA aus Feldproben

Diese Methode wurde von Altschmied *et al.* (1997b) beschrieben. Das Gewebe wurde in fünffachem Volumen Puffer (200 mM NaCl, 500 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, 100 µg/ml Proteinase K) homogenisiert, typischerweise in 1,5 ml Reaktionsgefäßen von EPPENDORF® mit passendem Teflon-Pistill. Der Transport der Proben erfolgte bei Umgebungstemperatur, die Lagerung bei –20°C. Vor der DNA-Isolation wurde das Volumen auf 4,5 ml mit dH_2O aufgefüllt, dann erfolgte die DNA-Isolierung nach dem unter 3.2.1 beschriebenen Protokoll.

3.2.3 Isolierung kleiner Mengen genomischer DNA aus Flossen

Diese sog. "Fin Clip"-Methode wurde von Altschmied *et al.* (1997b) beschrieben und erlaubt PCR-Analysen von Individuen bei nur minimalen Verletzungen. Ein Fisch wurde vorsichtig mit der nassen Hand fixiert, um die Schleimschicht seiner Haut nicht zu verletzen, und ein Teil seiner Rückenflosse wurde abgeschnitten. Das Flossengewebe konnte nun in 70% Ethanol transportiert, bei –20°C gelagert oder direkt verwendet werden. Zur DNA-Isolation wurde die Flosse in 100 µl Puffer 1 (100 mM NaCl, 0,5% (w/v) Sarcosyl) zerkleinert, typischerweise in 1,5 ml Reaktionsgefäßen von EPPENDORF® mit passendem Teflon-Pistill. Die Suspension wurde 15 min bei 95°C inkubiert und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit 100 µl Puffer 2 (20% w/v Chelex) versetzt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln wurde wiederum 15 min bei 95°C inkubiert und die DNA bei –20°C gelagert.

Für PCR-Analysen wurde die aufgetaute Suspension 1 min bei 20.000 g zentrifugiert und 2-5 µl des Überstandes pro Reaktion eingesetzt.

3.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

Die hier beschriebene Methode ist verglichen mit anderen Methoden wie CTAB (Del Sal *et al.*, 1989) zeitaufwendiger, allerdings ist die Qualität der gewonnenen DNA sehr gut und die DNA kann direkt für Sequenzierungen eingesetzt werden.

Die Bakterien einer Ü/N-Kultur (5 ml) wurden durch Zentrifugation (6000 g für 10 min) sedimentiert und das Pellet in 200 µl Resuspensionspuffer (50 mM Glucose, 25 mM Tris-Cl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 400 µl alkalischem Lysepuffer (0,2 N NaOH, 1% SDS) versetzt, durch Schütteln gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer (7,5 M NH_4OAc) wurde wiederum 5 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 20.000 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit 500 µl Isopropanol versetzt und 10 min bei 20.000 g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde die DNA in 300 µl 2 M NH_4OAc rückgelöst, verbliebener Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt, der Überstand wiederum in ein neues Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 200 µl Isopropanol und Zentrifugation gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, pH 8) rückgelöst.

3.2.5 Isolierung von Cosmid- und BAC-DNA im kleinen Maßstab

Die Präparation von Cosmid- und BAC-DNA im kleinen Maßstab erfolgte mittels alkalischer Lyse und anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion.

Die Bakterien einer Ü/N-Kultur (5 ml) wurden durch Zentrifugation (6000 g für 10 min) sedimentiert und das Pellet in 300 µl Resuspensionspuffer (50 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, pH 8, 100 µg/ml RNase A) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 300 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 (3 M NaOAc, pH 5,2) wurde 10 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 20.000 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit 450 µl Phenol und 450 µl Chloroform versetzt, durch Schütteln gemischt und 10 min bei 20.000 g zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde durch Zugabe von 900 µl Isopropanol und Zentrifugation (10 min bei 20.000 g) gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, pH 8) rückgelöst.

3.2.6 Isolierung von Plasmid-, Cosmid- und BAC-DNA im mittleren Maßstab

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

War die Analyse eines BACs mittels zufälliger Subklonierung ("Shotgun") und anschließender Sequenzierung beabsichtigt, wurde 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 fast völlig eliminiert werden konnte.

3.3 Bestimmung der DNA/ RNA-Konzentration

3.3.1 Spektralphotometrische Bestimmung der DNA/ RNA-Konzentration

Der DNA- oder RNA-Gehalt einer Lösung wurde mit dem Spektralphotometer GeneQuant® RNA/DNA Calculator (PHARMACIA BIOTECH™) gemessen. DNA und RNA haben ein Absorptionsmaximum von 260 nm und der Messwert kann unter Berücksichtigung der Konstanten $OD_{260} = 1$ für 50 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA und des Verdünnungsfaktors errechnet werden. Zusätzlich misst das Gerät die Absorption bei 280 und 320 nm, um Kontaminationen mit Proteinen oder Phenol festzustellen. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} sollte 1,8-2,0 betragen in einer proteinfreien Lösung. Auch wenn diese Methode Abweichungen unterliegt (Wilfinger *et al.*, 1997), lieferte sie schnell relativ gute Ergebnisse.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA mittels Agarose-Gel

War eine DNA-Lösung nicht frei von RNA oder die Konzentration zu gering für die spektralphotometrische Bestimmung, z.B. nach der Gelextraktion eines DNA-Fragments, wurde die Konzentration durch die optische Kontrolle eines DNA-Gels der Probe und eines Standards (die 1,6 kb-Bande des 1 kb DNA Ladder von INVITROGEN™ entspricht 10% der eingesetzten DNA-Menge) geschätzt. Für Southern Analysen wurde ein Test-Gel der verwendeten DNA zur Angleichung auf möglichst gleiche DNA-Konzentrationen im Versuch ausgewertet.

3.4 Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung der DNA mit kommerziellen Restriktionsendonukleasen wurden die empfohlenen Puffer und Inkubationstemperaturen verwendet. Dabei wurde 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 wurden 1-5 U Enzym pro µg DNA verwendet und 1-2 h inkubiert.

3.5 Phenol-Chloroform-Extraktion

Mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion können Proteine aus einer DNA-Lösung entfernt werden. Sie ist daher Bestandteil vieler Protokolle zur DNA-Extraktion aus

Bakterien oder eukaryotischen Zellen oder Geweben, wird aber auch verwendet, um bei der Manipulation von DNA unerwünschte Enzyme wie Restriktionsenzyme oder alkalische Phosphatase vor der weiteren Verwendung der DNA zu entfernen.
Dazu wurden einem 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 wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die DNA mit 1 Volumen Isopropanol und 0,1 Volumen 3 M NaOAc (pH 5,4) gefällt und zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und in geeignetem Puffer oder dH_2O rückgelöst.

3.6 DNA-Gelelektrophorese

Linearisierte DNA kann in verschiedenen Gelmatrices im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt und ihre Größe mittels eines Standards bestimmt werden.

3.6.1 Standardbedingungen dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden Agarose-Gele in Konzentrationen von 0,6-1,6% verwendet. Dazu wurde die Agarose (Roti®-garose, ROTH) in den Laufpuffer TAE (40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8) aufgenommen, durch aufkochen der Emulsion geschmolzen und nach abkühlen auf ca. 60-65°C in den Gelschlitten gegossen. Nach Erstarren der Agarose bei Raumtemperatur wurde 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 bei 1,5 V/cm für 20 h bis 5 V/cm für 2 h.

3.6.2 Pulsgelelektrophorese (PFGE)

Mit der Pulsgelelektrophorese (Pulsed Field Gel Elektrophoresis, PFGE) lassen sich DNA-Fragmente bis zu mehreren Mb nach ihrer Größe trennen (Schwartz & Cantor, 1984; Anand, 1986). Bei dieser speziellen Form der Gelelektrophorese wechselt die Orientierung des elektrischen Feldes meist im Winkel von 120° um die Längsachse des Gels mit zunehmenden Zeitintervallen und Spannung. Dies verhindert die Längsausrichtung großer DNA-Moleküle im elektrischen Feld, die sonst ab einer bestimmten Größe dasselbe Laufverhalten zeigen (Southern *et al.*, 1987).
In dieser Arbeit wurde das STRATAGENE RAGE™ (Rotating Agarose Gel Electrophoresis System) verwendet, die Einstellung aller Parameter erfolgte nach dem Protokoll des

Herstellers (Programm C4: 3-160 sec Intervalle, exponentiell steigend, 220-150 V Spannung, logarithmisch fallend, 20 h bei 10°C).

3.6.3 Fotografische Analyse der DNA

Um die DNA in einem Gel sichtbar zu machen, wurde dieses für 5-15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) unter leichtem Schütteln inkubiert, 5-15 min in Wasser entfärbt, unter UV-Licht analysiert und fotografiert.

3.7 Isolierung der DNA aus Agarose-Gelen

DNA-Fragmente wurden 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 wurden kommerzielle Kits verwendet wie QIAEX® II Gel Extraction Kit (QIAGEN) und Concert™ Rapid Gel Extraction System (INVITROGEN).

Sowohl die Quetsch-Methode, bei der das zuvor gefrorene Agarose-Blöckchen zwischen zwei Fingern in ein Reaktionsgefäß ausgepresst wird und Agarose-Reste durch Zentrifugation pelletiert werden (Thuring *et al.*, 1975), als auch die Zentrifugation über Glaswolle (Heery *et al.*, 1990), erwiesen sich als wenig zuverlässig.

3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Thermostabile Polymerasen erlauben die automatisierte und exponentielle Vervielfältigung von spezifischen DNA-Fragmenten (Saiki *et al.*, 1985). Nach einer anfänglichen Denaturierung der Ausgangs-DNA bei 94°C, bei der sich die beiden DNA-Stränge trennen, folgen 30-40 Zyklen von Denaturierung (94°C), Anlagerung der spezifischen Oligonukleotid-Primer (50-65°C, Annealing) und Verlängerung der durch die Primer initiierten Stränge (72°C, Elongation). Ein abschließender Schritt der Elongation bei 72°C stellt sicher, dass nur teilweise synthetisierte Stränge beendet werden.

3.8.1 Standard-PCR

Als Matrize dienten 100 ng genomische DNA oder 2,5 ng Plasmid-DNA. Die Ausgangs-DNA wurde in einem 50 µl Ansatz in PCR-Puffer (20 mM Tris-Cl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl2, 0,1% Triton X-100, 2 mg/ml BSA), 10 pmol jedes Primers, 10 mmol jedes Nukleotids, und 1 U Taq-Polymerase (von Prof. Dr. M. Gessler, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt) auf Eis gemischt und unmittelbar danach in der vorgeheizten PCR-

Maschine inkubiert. Für einige Primerkombinationen wurde dem Ansatz 5% DMSO zugegeben, das die Effizienz der PCR für GC-reiche Matrizen erhöht. Ein typisches Programm war 1* [3'00'' bei 95°C], 35* [0'45'' bei 95°C/ 0'45'' bei 55 °C/ 1'30'' bei 72°C], 1* [5'00'' bei 72°C], 4°C.

Dabei ist zu beachten, dass abhängig von den technischen Eigenschaften der PCR-Maschine (Temperaturkontrolle im Reaktionsgefäß oder über Algorithmus, Heiz- bzw. Kühlgeschwindigkeit), den verwendeten Primern und dem zu amplifizierenden Fragment die Bedingungen der PCR angepasst werden mussten.

3.8.2 Linker-PCR

Diese Methode dient zur Amplifikation unbekannter, an der Klonierungsstelle von Cosmiden, BACs oder YACs anschließender Sequenzen und wurde nach Riley *et al.* (1990) verändert. Solche sogenannten Endproben stellen aufgrund ihrer Lage am äußersten Rand eines Inserts die für das Genome-Walking interessantesten Hybridisierungs-Sonden dar und können ohne weitere Analyse ihrer Sequenz direkt aus der DNA eines Klons hergestellt werden.

Dazu wurde die DNA des Klons mit mehreren stumpf schneidenden Restriktionsenzymen in parallelen Ansätzen verdaut, mit Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in dH_2O aufgenommen. Anschließend wurde ein partiell doppelstränginger Linker-Mix (1 µM LIS1 + 1 µM LIS2, zum Annealing auf 68°C erwärmt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, bei –20°C gelagert) ligiert. Die anschließende PCR wurde mit 20 pmol eines Vektor-spezifischen Primers und 2 pmol LIS1 (Tabelle 2), dem längeren Oligonukleotid des Linker-Mixes durchgeführt, was zur bevorzugten Amplifikation von Fragmenten mit Vektoranteil führt. Meistens wurden die fünf folgenden Enzyme verwendet: *Rsa*I, *Hae*III, *Eco*RV, *Hin*cII und *Pvu*II. War mit diesem Ansatz keine Endprobe zu gewinnen oder war die gewünschte Größe von 400-1.000 bp unter- oder überschritten, wurden auch *Alu*I (nicht für BACs, da es in der Klonierungsstelle schneidet und somit den Vektor vollständig entfernt), *Sca*I, *Sma*I, *Stu*I, *Dra*I und *Eco*47III verwendet. Die PCR-Bedingungen der Linker-PCR waren 1* [3'00'' bei 95°C], 35* [0'30'' bei 95°C/ 0'30'' bei 60 °C/ 1'00'' bei 72°C], 1* [5'00'' bei 72°C], 4°C.

Tabelle 2: 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
FOR(-47)	5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC G-3'	Primer für Vektor pBAC-lac
FOR-Hind	5'-AAA ACG ACG GCC AGT GCC AAG-3'	Primer für Vektor pBAC-lac
REV(-48)	5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'	Primer für Vektor pBAC-lac
REV-Hind	5'-GTC GAC CTG CAG GCA TGC AAG-3'	Primer für Vektor pBAC-lac
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

3.9 Ligation

Zur Ligation von DNA wurden die T4 DNA Ligase und Puffer nach Angaben des Herstellers verwendet und mindestens 4 h bei 16°C inkubiert. Bei der Klonierung eines Fragments in einen Vektor wurde dieser nach dem Restriktionsverdau zusätzlich mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um die Religation des Vektors zu verhindern.

3.10 Transformation

Die Herstellung transformationskompetenter Bakterien beruht auf der Methode von Hanahan (1995). Aus einer Ü/N-Kultur des gewünschten Bakterienstamms wurde eine neue Kultur in 50 ml SOB angeimpft und 3-4 h bis zu einer Dichte von 0,4-0,7 (OD_{600}) inkubiert. Die Bakterien wurden durch vorsichtiges zentrifugieren (5 min bei 3.500 rpm, HETTICH® Rotina) pelletiert, in 4-5 ml TFB (100 mM KCl, 45 mM MnCl2, 10 mM CaCl2, 10 mM K-MES, pH 6,3) resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 2-4 ml TFB aufgenommen. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden zwei Mal 35 µl 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 wurden 200 µl 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 wurden sie nochmals 2 min auf Eis gekühlt, dann mit 800 µl SOB oder LB versetzt und zur Regeneration unter sehr vorsichtigem Schütteln für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen auf selektiven Agar-Platten ausplattiert.

3.11 Lagerung von Bakterien

Bakterien können bei Konzentration von 8-20% (v/v) Glycerin im Medium bei -80°C nahezu unbegrenzt gelagert werden. Dazu wurde zu 500 µl einer Übernachtkultur Bakterien 1 Volumen Glycerin (40% in H_2O) gegeben, gemischt bei -80°C eingefroren. Für einen neuen Ansatz dieser Kultur wurden Zellen aus der gefrorenen Kultur mit einer Impföse vorsichtig abgekratzt und auf einer Agar-Platte ausgestrichen oder mit ihnen eine Ü/N-Kultur angeimpft.

3.12 Sequenzanalysen

Die DNA-Sequenzierung nach der Dideoxy- oder Kettenabbruchmethode (Sanger, 1981) ist trotz vielfältiger Weiterentwicklungen prinzipiell unverändert geblieben. Nach der Denaturierung der DNA und der Anlagerung eines Primers 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 relativ viel DNA benötigt wird (bis zu 1 µg Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkt). Zu diesem Zweck wird die zu sequenzierende DNA mittels PCR oder nach Klonierung in Bakterien vermehrt. Plasmide bieten hierbei den Vorteil, dass immer die gleichen Primer mit standardisierten Methoden verwendet werden können.

Die Bestimmung der Nukleotidsequenz erfolgt in denaturierenden Gelen, in automatisierten Verfahren werden Fluoreszenzfarbstoffe, die an die Sequenzierprimer oder Nukleotide gekoppelt sind, durch Laserstrahlen angeregt und die gemessene Fluoreszenz elektronisch gespeichert und ausgewertet.

3.12.1 Sequenzierung mit A.L.F.™

Zu Beginn dieser Arbeit wurden alle Sequenzierungen mit dem A.L.F.™ DNA Sequencer (PHARMACIA™) durchgeführt, womit Sequenzen bis zu 1.000 nt erzeugt werden konnten. Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde der Thermo Sequenase cycle sequencing with 7-deaza-dGTP Kit (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH™) mit fluoreszent markierten Primern (MWG BIOTECH™) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.12.2 Sequenzierung mit CEQ™ 2000

Nach der Anschaffung des Sequenzers CEQ™ 2000XL wurden alle Sequenzierungen mit diesem Gerät durchgeführt. Die einfachere Handhabung und der höhere Durchsatz sind die Vorteile gegenüber dem A.L.F.™. Plasmid-DNA und PCR-Produkte wurden mit unmarkierten Primern und dem CEQ™ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick-Start Kit (BECKMAN COULTER™) sequenziert. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden nur 6 µl DTCS Premix pro Reaktion eingesetzt.

PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung mit dem PCR Product Pre-Sequencing Reagent Pack (AMERSHAM BIOSCIENCES™) behandelt. Darin enthalten sind eine Exonuklease zum Abbau der Primer und eine alkalische Phosphatase zur Dephosphorylierung der Nukleotide, da überschüssige Primer und Nukleotide der PCR die Sequenzier-Reaktion behindern würden.

3.13 Sequenzierung mittels Transposon-Mutagenese

Diese Methode nach Fischer *et al.* (1996) ermöglicht es, große DNA-Fragmente unter Verwendung nur eines Primers zu sequenzieren. Der dazu verwendete Vektor pJOE2114 trägt invers angeordnete Schnittstellen und DNA-Sequenzen (*res*-sites), die die Resolvase zur Auflösung des Fusionsprodukts aus dem Plasmid und dem Transposon TnSeq2 benötigt. Zwischen diesen langen palindromischen Sequenzen liegt ein Fragment als Platzhalter, das durch das gewünschte Insert ersetzt wird, da die Replikation des Vektors ohne Insert zwischen den Palindromen in *E. coli* nicht möglich ist. Das Transposon TnSeq2, das aus Tn*1721* aufgrund seiner niedrigen Insertionsspezifität konstruiert wurde und die neu eingefügten Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Sca*I und die M13 Bindungsstelle enthält, gehört zur Familie der Tn*3*-Transposons, die ein Fusionsprodukt mit der Zielsequenz bilden und nach der Replikation ihrer eigenen Sequenz das Fusionsprodukt zwischen der ursprünglichen und der neu synthetisierten *res*-site mit Hilfe der Resolvase auflösen.

Nach der Klonierung eines DNA-Fragments in pJOE2114 und Vermehrung in *E. coli* XL1-blue wurde die Plasmid-DNA gewonnen und in *E. coli* JM108 F' Lac (trägt ein F' Plasmid mit Tetracyclin-Resistenz und dem Transposon TnSeq2) transformiert. Die Inkubation erfolgte Ü/N auf Agar-Platten mit Ampicillin zur Selektion der Transformanten bei 30°C. Bei dieser Temperatur bilden sich unter anderen Fusionsprodukten auch solche aus F'::TnSeq2 und pJOE2114.

Der Bakterienrasen wurde mit 5 ml LB-Medium abgeschwemmt und eine Gesamtmenge von 100 µl mit einer Ü/N-Kultur *E. coli* HB101 als Konjugations-Rezipient im Verhältnis 1:1 gemischt, nachdem von beiden Kulturen die optische Dichte bestimmt wurde (OD_{600}). Zur Konjugation von JM108 F' Lac mit *E. coli* HB101 wurde Ü/N in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotika bei 30°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen wird das Fusionsprodukt aufgelöst und die Resolvase katalysiert außerdem die Deletion des Transposons, vermittelt über die *res*-site des Transposons und die *res*-site des Vektors pJOE2114 mit derselben Orientierung. Nach der Deletion bleiben nur die oben genannten Restriktionsschnittstellen und die Primerbindungsstelle zurück. Zur Selektion von Bakterien, auf die ein Fusionsprodukt übertragen wurde, wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-4}) dieser Kultur auf Agar-Platten mit Streptomycin (*E. coli* HB101 ist Streptomycin-resistent) und Ampicillin (pJOE2114 trägt ein Ampicillin-Resistenzgen) ausplattiert.
Die invers angeordneten Schnittstellen erlauben die Analyse des Inserts bezüglich seiner Größe durch einen Restriktionsverdau mit *Eco*RI unabhängig vom für die Klonierung eingesetzten Restriktionsenzym, die Analyse der Orientierung der Transposoninsertion erfolgt durch einen Restriktionsverdau mit *Sca*I. Nach Erstellung einer Insertionskarte wurden Klone ausgewählt und sequenziert, die eine möglichst gute Überlappung der zu erwartenden Sequenzen mit Längen von 500-1.000 bp zeigten. Jede Base des Inserts wurde durch 2-5 verschiedene Sequenzierungen bestimmt.

3.14 Sequenzierung von zufällig ausgewählten Subklonen einer Ursprungs-DNA

Diese Methode erlaubt eine Sequenzierung zufälliger Abschnitte der verwendeten Ursprungs-DNA. Ziel dieser "Shotgun"-Strategie ist die Erzeugung von überlappenden Sequenzen. Dazu wurde die DNA entweder mit bestimmten Restriktionsenzymen vollständig oder partiell verdaut und in einen Vektor (pBSII KS+) kloniert oder durch Scherung fragmentiert und kloniert (Nebulizer™ QIAGEN). Da die Scherung der DNA eine zufälligere Verteilung der Fragmente liefert als enzymatische Methoden, können in nur einem Arbeitsschritt überlappende Sequenzen gewonnen werden.

3.15 Southern-Blot-Hybridisierung

3.15.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Als Sonden wurden DNA-Fragmente unterschiedlicher Herkunft verwendet, die durch Gelelektrophorese isoliert und aufgereinigt wurden. PCR-Produkte wurden mittels Linker-PCR generiert oder nach Sequenzanalyse mit spezifischen Primern zu einer Zielsequenz amplifiziert. Klonierte Fragmente wurden mittels geeigneter Restriktionsenzyme aus dem Vektor geschnitten, um die Vektoranteile in der Sonde zu minimieren.

50-100 ng DNA-Sonde wurden 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 $MgCl_2$, 0,35% Mercaptoethanol, 100 µM dATP, 100 µM dGTP, 100 µM dTTP, OD 27/ml Hexanukleotide ($pd(N)_6$, AMERSHAM™)] wurde zur Anlagerung der zufällig synthetisierten Hexanukleotide auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl BSA (5 mg/ml), 3 µl [α^{32}P]dCTP (Nominalaktivität 30 µCi, HARTMANN ANALYTIC™) und 4 U Klenow-Polymerase wurde 2 h bei 37°C inkubiert.

Zur Kontrolle des radioaktiven Einbaus wurden nicht eingebaute Nukleotide durch Zentrifugation über eine Sephadex-G50 Spin Säule abgetrennt und die Probe im Szintillationszähler (MR 300, KONTRON) vermessen.

3.15.2 Alkalischer Transfer von DNA auf eine Nylon-Membran

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

Das Agarose-Gel wurde 2 Mal für 15 min in 0,25 M HCl unter leichtem Schütteln inkubiert, was durch Depurinierung die Übertragung großer DNA-Fragmente erleichtert. Dann erfolgte zur Denaturierung der DNA die Inkubation in 0,5 M NaOH/ 1,5 M NaCl. Das Gel wurde dann umgekehrt auf eine Glasplatte gelegt, die zuvor im selben Puffer äquilibrierte Membran aufgelegt und darauf zwei getränkte Lagen Gel-Blotting-Papier (SCHLEICHER & SCHÜLL™). Zur Erzeugung des Kapillarstroms folgten 10-15 Lagen trockenes Gel-Blotting-Papier und mehrere Lagen Zellstoffpapier. Eine Glasplatte wurde zur Beschwerung aufgelegt.

Für den schnellen Transfer von Plasmid-, Cosmid-, oder BAC-DNA genügten zwei Stunden, der im Gel enthaltene Puffer (250-300 ml/ 400 cm^2) reichte aus.

Für den Transfer genomischer DNA wurde das Gel auf 2-3 Lagen Saugpapier gelegt, deren Enden in Transferpuffer (0,2 N NaOH) hingen und so einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom aufrecht erhielten. Der Transfer der DNA erfolgte für mindestens 6 h oder Ü/N.

Nach dem Transfer wurden die Geltaschen mit Bleistift auf der Membran eingezeichnet, und zur kovalenten Bindung der DNA die noch feuchte Membran mit UV-Licht bestrahlt (150 mJ, 254 nm, Gs Gene Linker®, BIORAD™). Die Membran wurde getrocknet und trocken zwischen Saugpapier gelagert.

3.15.3 DNA-DNA Hybridisierung

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Membran erfolgte 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 bei 42°C in einem rotierenden Gefäß. Die Hybridisierung erfolgt in 5-10 ml frischem Hybridisierungspuffer nach Zugabe der durch kochen denaturierten Sonde (Kap. 3.15.1) ebenfalls Ü/N.

Die Spezifität der Hybridisierung wurde durch verschiedene Waschschritte analysiert: Nach der Entfernung des Hybridisierungspuffers mit 10 ml 2 x SSC/ 1% SDS für 15 min im rotierenden Gefäß folgten Waschschritte 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 Waschschritt wurde die Hybridisierung mit einem Röntgenfilm und einer das Signal verstärkenden Folie detektiert.

Zur Entfernung der Sonde wurde die Membran in 0,1 x SSC/ 1% SDS bei 68-72°C für 30 min gewaschen. Gelang dies nicht, wurde die Membran bis zum Abklingen der Strahlung gelagert. Stringentere Waschschritte anderer Protokolle wurden getestet, führten aber häufig zu schlechten Ergebnissen bei der erneuten Hybridisierung der Membran.

3.16 Präparation von Gesamt-RNA aus Geweben

Die Gewebe eines oder mehrerer Individuen wurden unmittelbar nach der Isolation in Reaktionsgefäßen auf Trockeneis gefroren und bei –80°C gelagert oder direkt verwendet. Die RNA-Präparation erfolgte mit maximal 100 mg Gewebe pro ml TRIzol™ (INVITROGEN) nach Angaben des Herstellers. Für Leber-, Tumor- und Ovariengewebe wurden maximal 50 mg Gewebe eingesetzt, da der hohe Fett- bzw. Proteinanteil die RNA-Isolierung beeinträchtigt. Nach Homogenisierung der Gewebe im IKA® Ultra Turrax bei 30.000 Upm wurde nach dem Protokoll vorgegangen und die RNA in 175 µl DEPC-H_2O rückgelöst. Nach DNaseI-Behandlung und LiCl-Fällung wurde die RNA in DEPC-H_2O rückgelöst und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt.

3.17 Analyse der Genexpression mittels RT-PCR

2 µg Gesamt-RNA wurden mit reverser Transkriptase (Superscript™ II RT, INVITROGEN) nach Angaben des Herstellers in cDNA revers transkribiert, nach dem Protokoll für den Einsatz zufällig synthetisierter Primer (Random Primers, INVITROGEN).

Zur Kontrolle der Reaktion wurde eine 1:10 Verdünnung der cDNA hergestellt und die Expression von Aktin (Primerkombination Act1 + Act2, Tab. A3) mittels PCR analysiert. Die Verdünnung und die geringe Anzahl von Zyklen sollte nach der optischen Analyse eines Agarose-Gels zeigen, ob gleich viel cDNA in den verschiedenen Ansätzen war.

Die PCR zum Nachweis der Expression spezifischer Gene erfolgte mit 1-2 µl der RT-Reaktion als Matrize. Die Bedingungen der PCR wurden den Gen-spezifischen Primern angepasst. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Zugabe der reversen Transkriptase eingesetzt, um Kontamination der RNA mit genomischer DNA auszuschließen.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse und Erweiterung der *Xmrk*- und *egfrb*-Cosmid-Contigs von *X. maculatus*

4.1.1 Stand zu Beginn dieser Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits Cosmide identifiziert und mittels PCR- und RFLP (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus)-Analysen zu den X- und Y-Allelen von *Xmrk* und *egfrb* zugeordnet worden (Tab. 3 und Abb. 5). Diese Arbeiten wurden von Dr. Joachim Altschmied (Phagen), Silke Weis, Dr. Kimberley Sweeney, Katrin Wichert und Dr. Jean-Nicolas Volff durchgeführt und sind zum Teil noch nicht veröffentlicht. Die Bezeichnung der Cosmide ist vereinfacht und gibt ihre Position in der Cosmid-Bibliothek an, zusammengesetzt aus der Plattennummer und den Koordinaten auf der Platte, z.B. 139 M07 (offizielle Bezeichnung des RZPD: MP MGc 120 M07 139).

Tabelle 3: Chromosomale Lokalisierung der zu Beginn dieser Arbeit bereits identifizierten Cosmide und Phagen.

Chromosom	Position	Cosmide/ Phagen
X	*Xmrk*	Phage 11 und 12
X	*Xmrk*	036 K05, 091 L11, 099 M02
Y	*Xmrk*	036 M08, 133 G08, 140 H13, 139 M07
Y	stromaufwärts von *Xmrk*	089 E19, 097 D18
X oder Y	stromabwärts von *Xmrk*	005 F06
X	*egfrb*	069 G17
X oder Y	stromaufwärts von *egfrb*	049 H06
Y	*egfrb*	008 G01, 106 M20, 013 P21
Y	stromaufwärts von *egfrb*	093 C16

4.1.2 Repetitive Elemente charakterisieren die *Xmrk*-Region

Zunächst wurden Restriktionskarten der bereits identifizierten Cosmide erstellt bzw. ergänzt und die Endfragmente und Überlappung der Cosmide mittels Linker-PCR und Southern-Blot-Analysen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 zusammengefasst.

Die hohe Dichte repetitiver Elemente stromaufwärts von *Xmrk* machte es unmöglich, neue überlappende Cosmide dieser Region mittels Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek zu identifizieren. So sind beispielsweise die am weitesten stromaufwärts von *Xmrk* gelegenen

Sequenzen des Contigs repetitiv (pGEM Sac10 auf dem X-Chromosoms und die Endproben 089 E19-SP6 und 097 D18-T7 auf dem Y-Chromosom, Abb. 5). Zudem charakterisieren ausgedehnte Ansammlungen der *XIR*-Sequenzwiederholung diese Region (Froschauer *et al.*, 2001; Volff *et al.*, 2003b). Roushdy *et al.* beschreiben die wiederholte Sequenz *XIR* als LTR (Long Terminal Repeat) eines nicht-autonomen, mutmaßlichen Retrovirus von *Xiphophorus* (Roushdy *et al.*, 1999).

Obwohl eine von Katrin Wichert durchgeführte Analyse von Klonen, die sowohl mit einer Sonde des *XIR*-Elements (entsprechend pROST 27, Nanda *et al.*, 2000) und der Sonde pGEM Sac10 (1,3 kb-Fragment des Phagen 12, Abb. 5) gleich stark hybridisierten, zur Isolation der Cosmide 089 E19 und 097 D18 führte, blieben weitere Ansätze dieser Art erfolglos. In Tabelle A1 im Anhang sind Cosmide aufgeführt, die nach vergleichender Analyse mehrerer Hybridisierungen ausgewählt wurden, jedoch nicht in das Contig integriert werden konnten (für eine Beschreibung der verwendeten Sonden siehe Tab. A1).

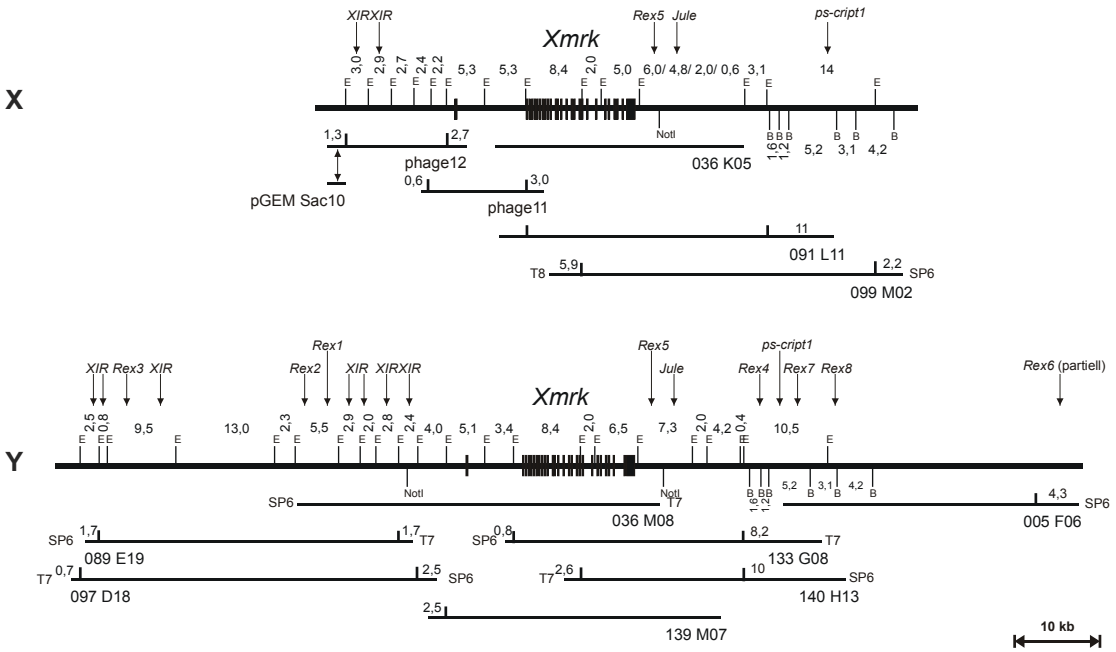

Abbildung 5: Restriktionskarten und Cosmide der *Xmrk*-Region. Dickere Linien repräsentieren das X- und Y-Chromosom, *Eco*RI-Fragmente (E) sind oberhalb, *Bam*HI-Fragmente (B) unterhalb der Chromosomen notiert. Endfragmente (*Eco*RI) der Cosmide sind mit ihrer Größe kenntlich gemacht. Ist die Reihenfolge mehrerer Fragmente nicht eindeutig bestimmt, ist ihre Größe durch Querstriche getrennt angegeben (alle Angaben in kb). Repetitive Elemente, Gene und Pseudogene innerhalb der Fragmente sind oberhalb angegeben (vgl. Text).

Neben *XIR* wurden eine Vielfalt an Retroelementen in der *Xmrk*-Region identifiziert (Abb. 5 und 6). Sequenzanalysen der Cosmide wiesen stromaufwärts von *Xmrk* die Nicht-LTR-Retrotransposons *Rex1, Rex2* und *Rex3* nach (Volff *et al.*, 2000; Volff *et al.*, 2003b; Volff *et al.*, 1999). Stromabwärts von *Xmrk* machen repetitive Sequenzen sogar über 80% der analysierten 33 kb genomischer Sequenz aus (Abb. 6). Dazu gehören das *Ty3/Gypsy*-ähnliche LTR-Retrotransposon *Jule* (Volff *et al.*, 2001a), das nur 55 nt stromabwärts des Polyadenylierungs-Signals von *Xmrk* liegt und seinerseits durch *Rex5*, ein Nicht-LTR-Retrotransposon (Volff *et al.*, 2003b) unterbrochen ist. Ein endogener Retrovirus *Rex4* sowie zwei weitere *Ty3/Gypsy*-ähnliche LTR-Retrotransposons, *Rex7* und *Rex8*, schließen sich an (Volff *et al.*, 2003b). Auch das am weitesten stromabwärts von *Xmrk* liegende Fragment des Cosmid-Klons 005 F06 enthält einen Teil des Nicht-LTR-Retrotransposons *Rex6*, das eine Endonuklease mit Ähnlichkeit zu Restriktionsendonukleasen codiert (Volff *et al.*, 2001b).

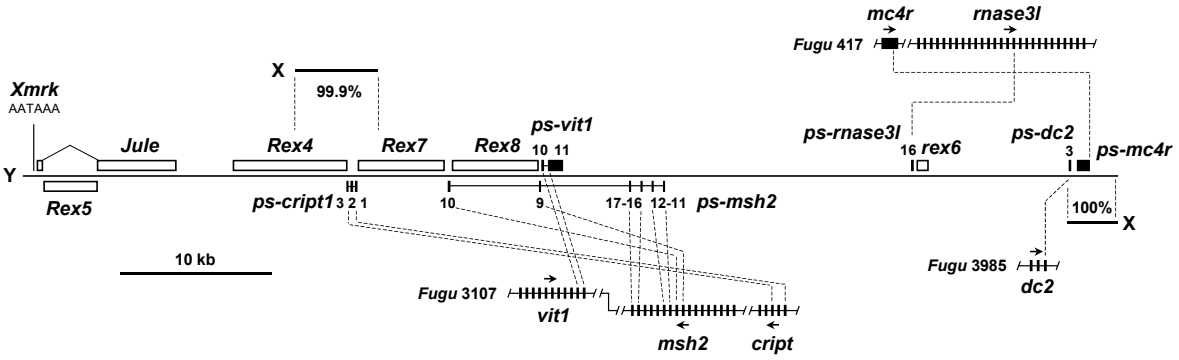

Abbildung 6: Retroelemente und Pseudogene (Kap. 4.1.3) stromabwärts von *Xmrk*. Das Polyadenylierungs-Signal von *Xmrk* ist angegeben (AATAAA). Oberhalb der das Y-Chromosom repräsentierenden Linie sind Pseudogene und Retroelemente angegeben mit derselben Leserichtung wie *Xmrk*, unterhalb die entgegengesetzter Leserichtung. Die Exons der Pseudogene sind schematisiert dargestellt (Größe nicht proportional) und entsprechend den Daten des Fugu-Genomprojekts nummeriert (http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk/; die Nummer der Scaffolds ist angegeben). Die Daten zu den Pseudogenen *ps-dc2* und *ps-mc4r* stammen aus Untersuchungen der BAC-Contigs (Kap. 4.2.2). (X) markiert Bereiche des X-Chromosoms, deren Nukleotidsequenzen zu den angegeben Prozent identisch sind mit denen des Y-Chromosoms. Abbildung nach Volff *et al.*, 2003b.

4.1.3 Pseudogene der *Xmrk*-Region

Stromabwärts von *Xmrk* wurden vor der Erstellung und Verwendung der BAC-Bibliothek mehrere Pseudogene identifiziert, die durch genomische Umlagerungen so stark zerstört sind, dass zum Teil nur noch wenige Exons vorhanden sind (Tab. 4 und Abb. 6).

Tabelle 4: Pseudogene der *Xmrk*-Region und Position ihrer funktionellen Orthologe in Mensch und Fugu. Tabelle nach Volff *et al.*, 2003b.

Name	Menschliches Genom	Fugu-Genom	Produkt der funktionellen Gene
ps-cript	2p21	scaffold_3107	Postsynaptisches Protein
ps-msh2	2p22-p21	scaffold_3107	DNA-Reparatur Protein
ps-vit1	2p21-p16	scaffold_3107	Zinkfinger Protein
ps-rnase3l	5p13	scaffold_417	Ribonuklease
ps-mc4r	18q22	scaffold_417	Melanocortin-Rezeptor

Das Pseudogen *ps-cript1* zeigt Homologie zu den ersten drei Exons des menschlichen *CRIPT*-Gens und liegt in umgekehrter Leserichtung nahe an *Xmrk* (Abb. 6). Cript ist ein hoch konserviertes Protein in Säugern und Pflanzen, dessen genaue Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Allerdings konnte gezeigt werden, dass CRIPT in die Bindung von PSD-95-Proteinen an das Cytoskelett in Nervenzellen involviert ist. Die Familie der PSD-95-Proteine wiederum beeinflusst die Organisation von Neurotransmitter-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran (Niethammer *et al.*, 1998; Passafaro *et al.*, 1999).

Ps-vit1 besteht aus zwei noch vorhanden Exons. *VIT1* im Menschen ist assoziiert mit einer durch fortschreitende Depigmentierung gekennzeichneten Hautkrankheit, der sog. Vitiligo (Le Poole *et al.*, 2001). *Ps-vit1* ist umgeben von den noch vorhandenen Exons von *ps-msh2*, deren Reihenfolge stark durcheinander gewürfelt ist (Abb. 6). In Säugern ist Msh2 in DNA-Reparaturmechanismen wie die DNA-Reparatur nach UV-Stress (Scherer *et al.*, 2000), "Mismatch"-Reparatur und die Stabilität von Mikrosatelliten involviert (Degtyareva *et al.*, 2002).

Besonders interessant ist, dass *cript, vit1* und *msh2* eine Syntenie-Gruppe im Mensch (Chromosom 2p) und Fugu bilden (scaffold_3107), sowie *rnase3l* und *mc4r* im Fugu (scaffold_417) aber nicht im Mensch. Es war anzunehmen, dass noch funktionelle Kopien dieser Gene in einer syntenischen Gruppe im Genom von *X. maculatus* vorhanden sind. Allerdings war nicht klar, ob diese Gruppe auf den Autosomen oder Gonosomen lokalisiert ist. Zur Untersuchung dieser Fragen wurde eine Sonde von *ps-cript1* generiert und zur Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek verwendet. Es konnten jedoch keine neuen Cosmide der *Xmrk*-Region isoliert werden. Gefunden wurde allerdings das Y-spezifische Cosmid 012 K09 und potentiell auf Autosomen lokalisierte Kopien. Die Ergebnisse zur Analyse dieser (Pseudo-)Gene sind in Kap. 4.4 dargestellt.

Eine Sonde des Pseudogens *ps-rnase3l* wurde ebenfalls zur Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek verwendet, um das Chromosomen-Walking voranzutreiben. Proteine der RNaseIII-Familie sind involviert in vielfältige Mechanismen der RNA-Prozessierung von ribosomaler RNA, kleiner nukleärer RNA und Spaltung doppelsträngiger RNA (Wu *et al.*, 2000; Lamontagne *et al.*, 2001). Die isolierten Cosmide sind in Tabelle A1 im Anhang aufgeführt, werden aber nicht weiter beschrieben, da der Großteil der Analysen unter Verwendung der neu eingeführten BAC-Bibliothek erfolgte und in Kapitel 4.2 behandelt wird.

Die Cosmide 079 D16 und 144 N21 wurden von Silke Weis mit einer Sonde des Endfragments 036 M08-SP6 isoliert und zunächst als stromaufwärts von *Xmrk* gelegen positioniert. RFLP-Analysen und Southern-Blot-Hybridisierungen ihrer Endproben in dieser Arbeit konnten dies jedoch nicht bestätigen (Daten nicht gezeigt). Allerdings führte ihre partielle Sequenzierung durch Cornelia Körting zur Identifizierung eines Melanocortin-Rezeptorgens (*mc4r*) von *X. maculatus*, was sowohl im Hinblick auf das Chromosomen-Walking (Kap. 4.2.2) als auch zur Analyse von *mc4r* als Kandidatengen der *Xmrk-SD*-Region von großer Bedeutung war (Kap. 4.5).

4.1.4 Erweiterung der Cosmid-Contigs der *egfrb*-Region

Zunächst wurden Restriktionskarten der bereits identifizierten Cosmide erstellt bzw. ergänzt und die Endfragmente und Überlappung der Cosmide mittels Linker-PCR und Southern-Blot-Analysen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 zusammengefasst.

Als problematisch erwies sich die Zuordnung mancher Cosmide zum X- oder Y-Chromosom. Die Endprobe 093 C16-T8 war die einzige in dieser Arbeit analysierte Sonde, die stromaufwärts von *egfrb* einen RFLP zwischen dem X- und Y-Chromosom zeigte. Die Southern-Blot-Analyse eines Doppelverdaus hybridisiert mit 093 C16-*Alu*I-T8 zeigte unterschiedlich große interne *Bam*HI-Fragmente in Cosmid 069 G17 des X- Chromosoms und Cosmid 008 G01 des Y-Chromosoms (Abb. 8 A), was durch die Analyse genomischer DNA bestätigt werden konnte (nicht gezeigt). Im Falle der genomischen Cosmid-Bibliothek von *X. maculatus* (Partialverdau mit *Mbo*I, kloniert in Lawrist7, Burgtorf *et al.*, 1998) beträgt der Vektoranteil in einem Endfragment nach *Eco*RI-Verdau maximal 300 bp. Da 093 C16-T8 mindestens 2 kb größer ist als das interne Fragment von 069 G17 (X) und kleiner als das interne Fragment von 008 G01 (Y), wurde Cosmid 093 C16 dem Y-Chromosom zugeordnet.

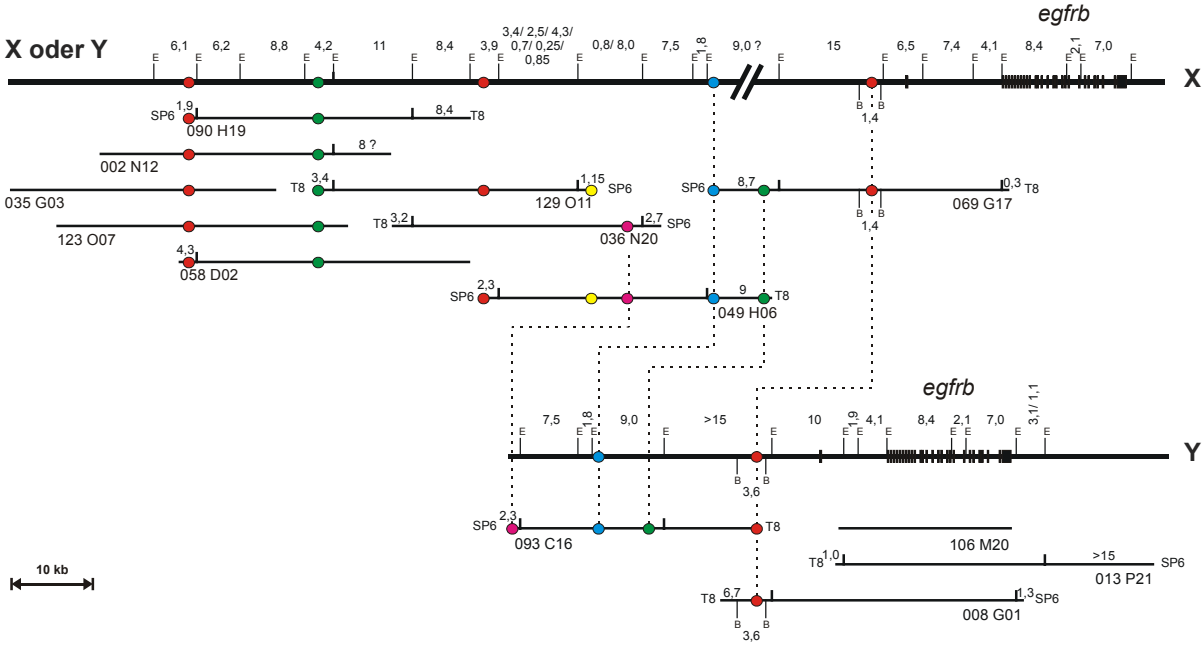

Abbildung 7: Restriktionskarten und Cosmide der *egfrb*-Region. Dickere Linien repräsentieren das X- und Y-Chromosom, der nicht eindeutig einem Gonosom zugeordnete Bereich ist mit "X oder Y" gekennzeichnet (vgl. Text). *Eco*RI-Fragmente (E) sind oberhalb, *Bam*HI-Fragmente (B) unterhalb der Chromosomen notiert. Endfragmente (*Eco*RI) der Cosmide sind mit ihrer Größe kenntlich gemacht. Ist die Reihenfolge mehrerer Fragmente unklar, ist ihre Größe durch Querstriche getrennt angegeben (alle Angaben in kb). Zur besseren Übersicht sind nur die für das Chromosomen-Walking relevanten Endproben als farbige Kreise notiert (vgl. Text). Auf den Chromosomen sind nur die mit diesen Sonden auch auf genomischer DNA nachgewiesenen Fragmente derselben Größe notiert.

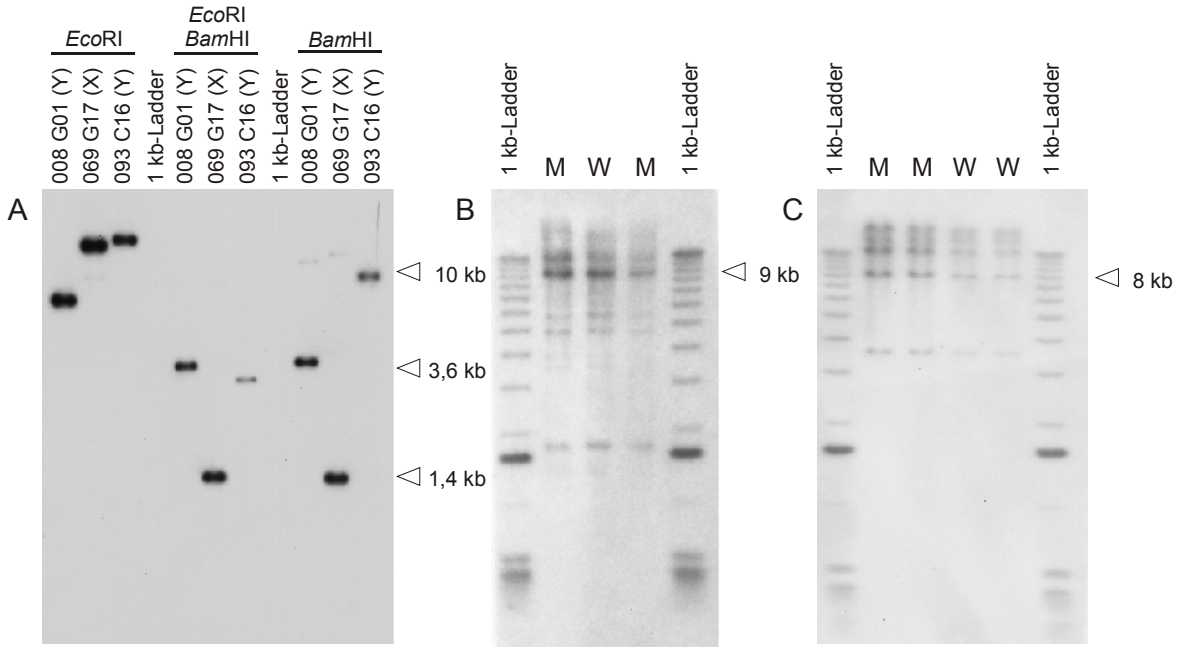

Abbildung 8: Southern-Blot-Analysen von Endproben der Cosmide der *egfrb*-Region. (A) Sonde 093 C16-T8 hybridisiert auf Cosmide stromaufwärts von *egfrb*. Der Doppelverdau zeigt unterschiedliche interne Restriktionsschnittstellen (*Bam*HI) auf dem X- (Cosmid 069 G17) und dem Y-Chromosom (Cosmid 008 G01). (B) Sonde 069 G17-*Sca*I-T8 zeigt keinen RFLP (*Eco*RI) auf genomischer DNA zwischen männlichen (M) und weiblichen (W) Individuen von *X. maculatus*, ebenso Sonde 093 C16-*Alu*I-SP6 (C).

Cosmid 049 H06 wurde von Katrin Wichert mit der Endprobe 069 G17-*Eco*RV-SP6 isoliert und zunächst dem X-Chromosom zugeordnet. Allerdings überlappen 049 H06 und 069 G17 nur mit ihren jeweiligen *Eco*RI-Endfragmenten und beide Endproben (049 H06-T8 und 069 G17-SP6) hybridisieren auch mit einem internen *Eco*RI-Fragment von Cosmid 093 C16 des Y-Chromosoms (9 kb, siehe grüne und blaue Kreise in Abb. 7). Deshalb ließ sich nicht bestimmen, ob dieses Cosmid dem X- oder Y-Chromosom zuzuordnen ist.

Im folgenden wurden vier Durchmusterungen der Cosmid-Bibliothek durchgeführt, unter Verwendung von Endproben als Sonden (Tab. 5). In Abbildung 7 sind die zum Chromosomen-Walking verwendeten Endproben und die Überlappung der Cosmide gezeigt, nicht jedoch Cosmide, die aufgrund von Southern-Blot-Analysen mittels Endproben als nicht zum Contig gehörig ausgeschlossen werden konnten (z.B. 094 K23), sie sind in Tabelle A1 im Anhang aufgeführt.

Wichtig ist, dass die verwendeten Sonden stromaufwärts von *egfrb* und den Cosmiden 069 G17 (X) und 093 C16 (Y) keine RFLPs zwischen dem X- und Y-Chromosom zeigten. Die Abbildungen 8 B und C zeigen exemplarisch die aus diesen beiden Cosmiden generierten Sonden, hybridisiert auf genomische DNA von *X. maculatus*. Somit konnte nicht eindeutig bestimmt werden, ob die neu identifizierten Cosmide (Abb. 7) allein dem X-Chromosom zuzuordnen sind oder ob eine sehr ähnliche Region auf beiden Geschlechtschromosomen stromaufwärts von *egfrb* liegt. Die Endprobe 090 H19-PvuII-SP6, die die zum Zeitpunkt der Einführung der BAC-Bibliothek am weitesten stromaufwärts von *egfrb* (100 kb von Exon 1) gelegene, mittels Southern-Blot-Hybridisierung analysierte Sonde darstellt, wurde auch zur Analyse der BAC-Contigs verwendet (Kapitel 4.2.5 und Abb. 15).

Zusammenfassend konnte ein Cosmid-Contig stromaufwärts von *egfrb* erstellt werden, das eine genomische Region von mehr als 100 kb (gemessen von Exon 1 von *egfrb*) überspannt, jedoch konnte nicht eindeutig bewiesen werden, ob die identifizierten Cosmide allein dem X- oder auch dem Y-Chromosom zuzuordnen sind.

Die Analyse der stromabwärts von *egfrb* (Y) liegenden Sonde 013 P21-*Pvu*II-SP6 zeigte zwar eine Y-spezifische Bande nach Southern-Blot-Hybridisierung genomischer DNA (Daten nicht gezeigt), jedoch wurden weitere Experimente nach Einführung der BAC-Bibliothek nicht durchgeführt.

Tabelle 5: Zur Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek verwendete Endproben (Vektorprimer T8 und SP6) von Cosmiden der *egfrb*-Region. Positive/ negative Kontrollhybridisierung bezeichnet die Hybridisierung eines/ keines Fragments mit der Sonde nach Isolierung und Southern-Blot-Hybridisierung der Cosmid-DNA. In das Contig wurden positive Klone erst nach weiteren Analysen (RFLP, gegenseitige Überlappung und Hybridisierung aller Endproben) aufgenommen. (*) 084 I24 wurde nach RFLP-Analysen und Southern-Blot-Hybridisierung als identisch mit 090 H19 angesehen (Daten nicht gezeigt) und wird deshalb nicht als separater Klon in Abbildungen und Text dieser Arbeit behandelt.

Endprobe	Anzahl der identifizierten Cosmide	positive Kontrollhybridisierung	negative Kontrollhybridisierung	im Contig
049 H06-*Pvu*II-SP6	5	129 O11;	108 L15; 117 O11; 118 I16; 130 I16;	129 O11;
093C16-*Alu*I-SP6	15	005 O11; 018 B12; 027 K11; 029 E17; 036 N20; 042 J10; 054 E06; 054 O03; 065 C08; 091 A16; 093 N03; 129 G02; 132 M14; 140 L22;	083 F05;	036 N20
129 O11-*Eco*RV-T8	15	002 N12; 032 C10; 058 D02; 078 P15; 084 I24; 090 H19; 094 K23; 099 F17; 123 O07; 125 J08; 129 O11; 142 M01;	020 C10; 064 A20; 135 K01;	002 N12; 058 D02; 090 H19; 123 O07;
090 H19-*Pvu*II-SP6	9	002 N12; 035 G03; 058 D02; 084 I24*; 123 O07;	023 G03; 117 G23; 121 F23; 129 G23;	002 N12; 035 G03; 058 D02; 084 I24*; 123 O07;

4.2 Chromosomen-Walking in der *SD*-Region des Platys mittels BACs

4.2.1 Analyse der BAC-Bibliothek und Startpunkte des Walkings

Während der Erstellung der BAC-Bibliothek wurde die durchschnittliche Insertgröße der BAC-Bibliothek geschätzt und kontinuierlich überprüft. Bisher wurden 120 Klone analysiert (Abb. 9, Tabelle A2 im Anhang), deren durchschnittliche Insertgröße ca. 165 kb betrug (min. 50 kb, max. 240 kb).

Als Startpunkt des Chromosomen-Walkings wurde eine cDNA-Sonde von *Xmrk* zur Durchmusterung der BAC-Bibliothek verwendet. Mittels Southern-Blot-Analyse (Abb. 10) und PCR konnten alle Klone den verschiedenen Allelen von *egfrb* und *Xmrk* zugeordnet werden außer BAC A10, der das Allel-spezifische Fragment des ersten Exons und Teile des ersten Introns nicht enthält. BAC A10 konnte durch RFLP-Analyse (*Hin*dIII) und Southern-Blot-Hybridisierungen der Endproben von BAC A5 dem X-Allel von *egfrb* zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt wurden je 5 Klone für beide Allele von *egfrb* und das X-Allel von *Xmrk* isoliert und 6 Klone für das Y-Allel von *Xmrk* (BAC-Klone "A", Abb. 13 und 15).

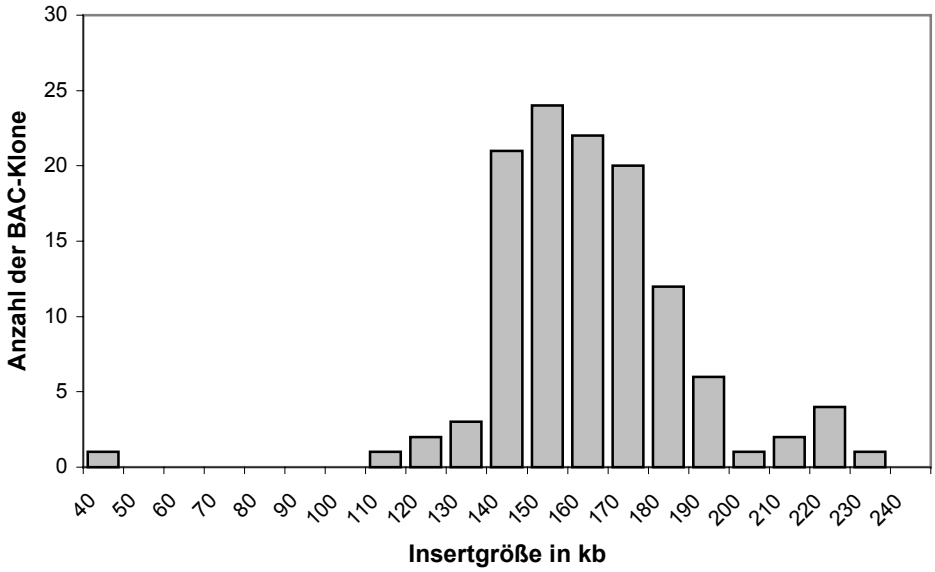

Abbildung 9: Verteilung der Insertgrößen der bisher analysierten Klone aus der genomischen BAC-Bibliothek von *X. maculatus* (A. Froschauer, C. Schultheis und Q. Zhou, nicht veröffentlicht; Froschauer *et al.*, 2002).

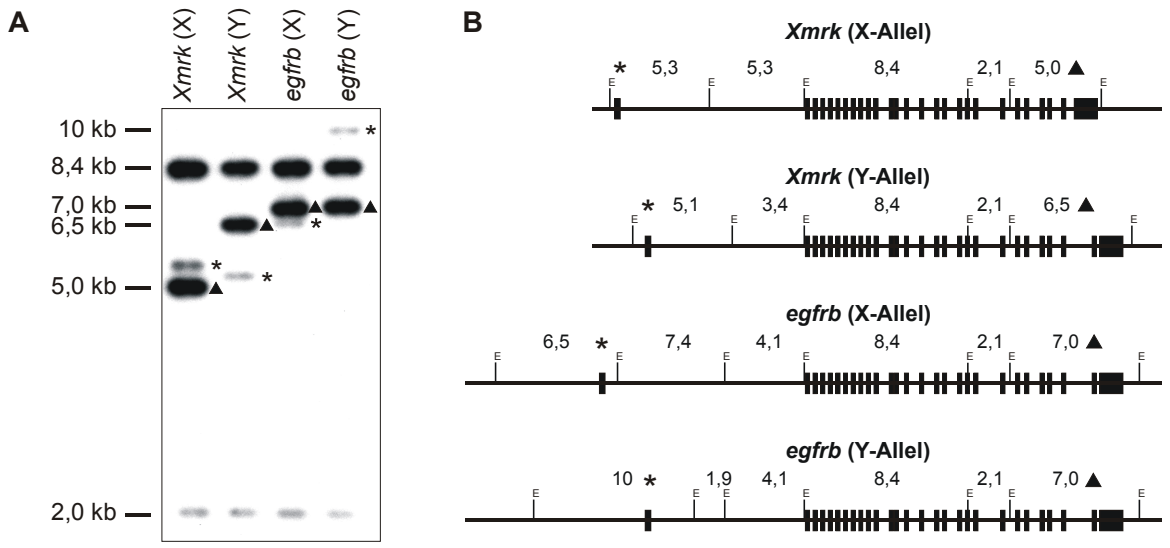

Abbildung 10: RFLP-Analyse von BAC-Klonen, die entweder *Xmrk* oder *egfrb* enthalten. (A) Southern-Blot-Analyse von repräsentativen BAC-Klonen, verdaut mit *Eco*RI und hybridisiert mit der Sonde G4, (partieller ORF von *Xmrk*, von U. Hornung zur Verfügung gestellt). (B) *Eco*RI-Restriktionskarte der Allele von *Xmrk* und *egfrb* in *X. maculatus*, Stamm WLC1274. Sterne und Dreiecke markieren die jeweils differenzierenden Fragmente. Die Größe der Fragmente ist in kb angegeben (Froschauer *et al.*, 2002).

4.2.2 Aufbau und Erweiterung der BAC-Contigs der *Xmrk*-Region

Die Erweiterung des Contigs der *Xmrk*-Region beruhte im wesentlichen auf der Feststellung, dass alle *Xmrk*-enthaltenden BAC-Klone ebenfalls Kopien von *mc4r* und *ps-cript1* (Kap. 4.1.3) enthalten. Nach Durchmusterung der Bibliothek mit entsprechenden Sonden (Tabelle A2 im Anhang) wurden 31 neue BAC-Klone isoliert (BACs "B"), die bis zu vier Kopien *mc4r* enthalten (Abb. 11). 3 Klone (B4, B21, B29) enthalten zusätzlich eine Kopie des Pseudogens *ps-criptY*, BAC B2 *ps-cript1* (Abb. 20).

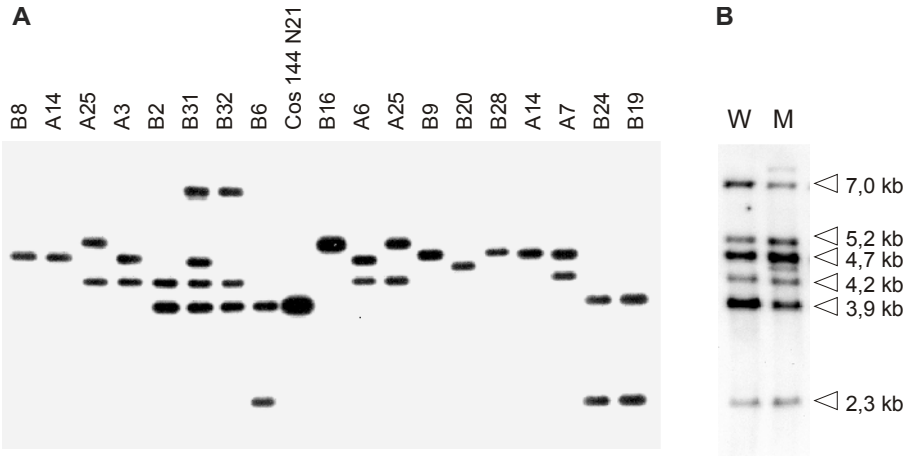

Abbildung 11: Southern-Blot-Analyse von BAC- (A) und genomischer DNA (B) eines männlichen (M) und weiblichen (W) *X. maculatus*, verdaut mit *Hin*dIII, hybridisiert mit der Sonde Xmcr (partieller ORF von *mc4r* aus pROST 53). In (B) ist die Größe der den *Xmrk*-Contigs zugeordneten Fragmenten angegeben.

15 BAC-Klone konnten durch Southern-Blot-Hybridisierung repräsentativer Endproben und Sonden von (Pseudo-)Genen oder repetitiven Elementen (Tab. 6) in das *Xmrk*-Contig eingegliedert werden. Die Reihenfolge der eingezeichneten Marker wurde hierbei aus dem Vorhandensein in überlappenden Klonen geschlossen (Abb. 13).

Hybridisierung mit einer Sonde von *ps-rnase3l* (PCR-Produkt) zeigte, dass dieses Pseudogen ebenfalls mehrfach auf den Geschlechtschromosomen von *X. maculatus* vorhanden ist (Abb. 12). Stromaufwärts von *Xmrk* konnten nach Durchmusterung der BAC-Bibliothek vier neue BAC-Klone (F8, F23, F25, F44) mit diesem Marker in das Contig integriert werden (Abb. 13).

Nach Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit den Sonden B6-*Hin*cII-REV, B33-*Rsa*I-REV und TnH7 (PCR-Produkt, Primerkombination TnH7-F1 und –R1) waren K26, H75 und H25 aufgrund ihrer Hybridisierung mit einer oder mehreren der genannten Proben als Kandidaten ausgewählt worden (Tabelle A2 im Anhang). Christina Schultheis konnte H25 als nicht zum Contig gehörend ausschließen und die Position von BAC K26, H75 und B33 bestimmen (Schultheis, 2003).

Die Contigs der *Xmrk*-Region umfassten zum Ende dieser Arbeit ca. 900 kb des X- und ca. 500 kb des Y-Chromosoms.

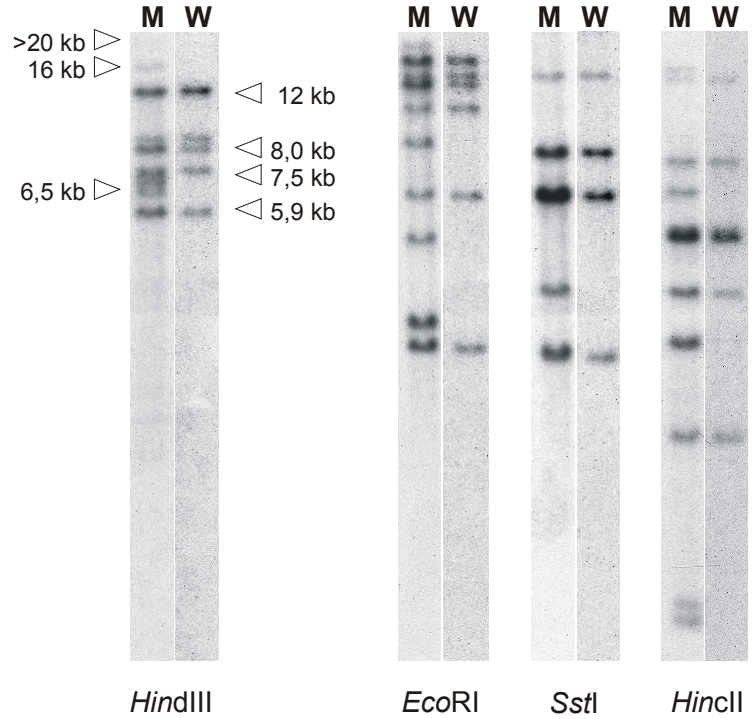

Abbildung 12: Southern-Blot-Analyse genomischer DNA (M: männliche, W: weibliche Individuen; Restriktionsenzym unterhalb angegeben), hybridisiert mit der Sonde RNase3l. Die Sonde entspricht Exon 16 des *rnase3l*-Pseudogens. Fragmente mit angegebener Größe konnten unterschiedlichen Contigs zugeordnet werden (vgl. Abb. 13 und 22).

Tabelle 6: Endsequenzen von BAC-Klonen und Sonden zur Southern-Blot-Hybridisierung, die für die Anordnung der BAC-Klone des *Xmrk*-Contigs eingesetzt wurden (vgl. Abb. 13). Einige der Marker sind an allelischen Positionen auf dem X- und Y-Chromosom zu finden (X+Y), für andere können solche Aussagen noch nicht gemacht werden. Mit * gekennzeichnete Sonden wurden auch zur Durchmusterung der BAC-Bibliothek eingesetzt.

Endprobe/ Andere Sonden	Position des Markers	Bemerkung	Referenz
Xmrk *	Referenzpunkt		Kap. 4.2.1
mc4r *	diverse RFLPs (X+Y)	Y-spezifische Fragmente	Abb. 13, 21, 22, 32
ps-rnase3l *	diverse RFLPs (X+Y)	Y-spezifische Fragmente	Abb. 12, 13, 22
*ps-cript1**	3' *Xmrk* (X+Y), Autosom	Y-spezifisches Fragment	Abb. 13, 20, 21
TnH7 *	3' *Xmrk*, Y-Contig	mind. 1 Kopie gonosomal	Abb. 13, 14, 21
XIR	diverse RFLPs	repetitiv	Abb. 13, 20, 21
Rex6	5' *Xmrk* (X+Y)	partiell auch 3' Xmrk	Abb. 13
A3-*Pvu*II-FOR	3' *Xmrk* (X+Y)	mehrere Fragmente im Contig	Abb. 13
A3-*Hae*III-REV	5' / 3' *Xmrk* (X+Y)	kein RFLP	nicht gezeigt
B32-FOR	3' *Xmrk* (X+Y)	Sequenz *ps-vit1*, 3' *Xmrk*	Abb. 6
B32-*Pvu*II-REV	3' *Xmrk*	mehrere Fragmente im Contig	Abb. 13
B31-FOR	3' *Xmrk*	Sequenz *mc4r*-Fragment	Abb. 13
B31-REV	3' *Xmrk*	Sequenz 3' *Xmrk* (005 F06)	Abb. 5
B23-*Hinc*II-FOR	3' *Xmrk*	mehrere Fragmente im Contig	Abb. 13
B23-*Dra*I-REV	3' *Xmrk*	1 Fragment im Contig	Abb. 13
B6-*Hinc*II-FOR	3' *Xmrk*	mehrere Fragmente im Contig	Abb. 13
B6-*Hinc*II-REV *	3' *Xmrk*	repetitiv, 1 Fragment im Contig	Abb. 13
B33-FOR	3' *Xmrk*	Sequenz *mc4r*-Fragment	Abb. 13
B33-*Pvu*II-REV *	3' *Xmrk*	repetitiv, 2 Fragmente im Contig	Abb. 13
A25-FOR	3' *Xmrk*	Sequenz *mc4r*-Fragment	Abb. 13
F8-*Hae*III-REV	5' *Xmrk*		Abb. 13
A7-RsaI-FOR	3' *Xmrk*		nicht gezeigt
A7-HaeIII-REV	5' *Xmrk*		nicht gezeigt

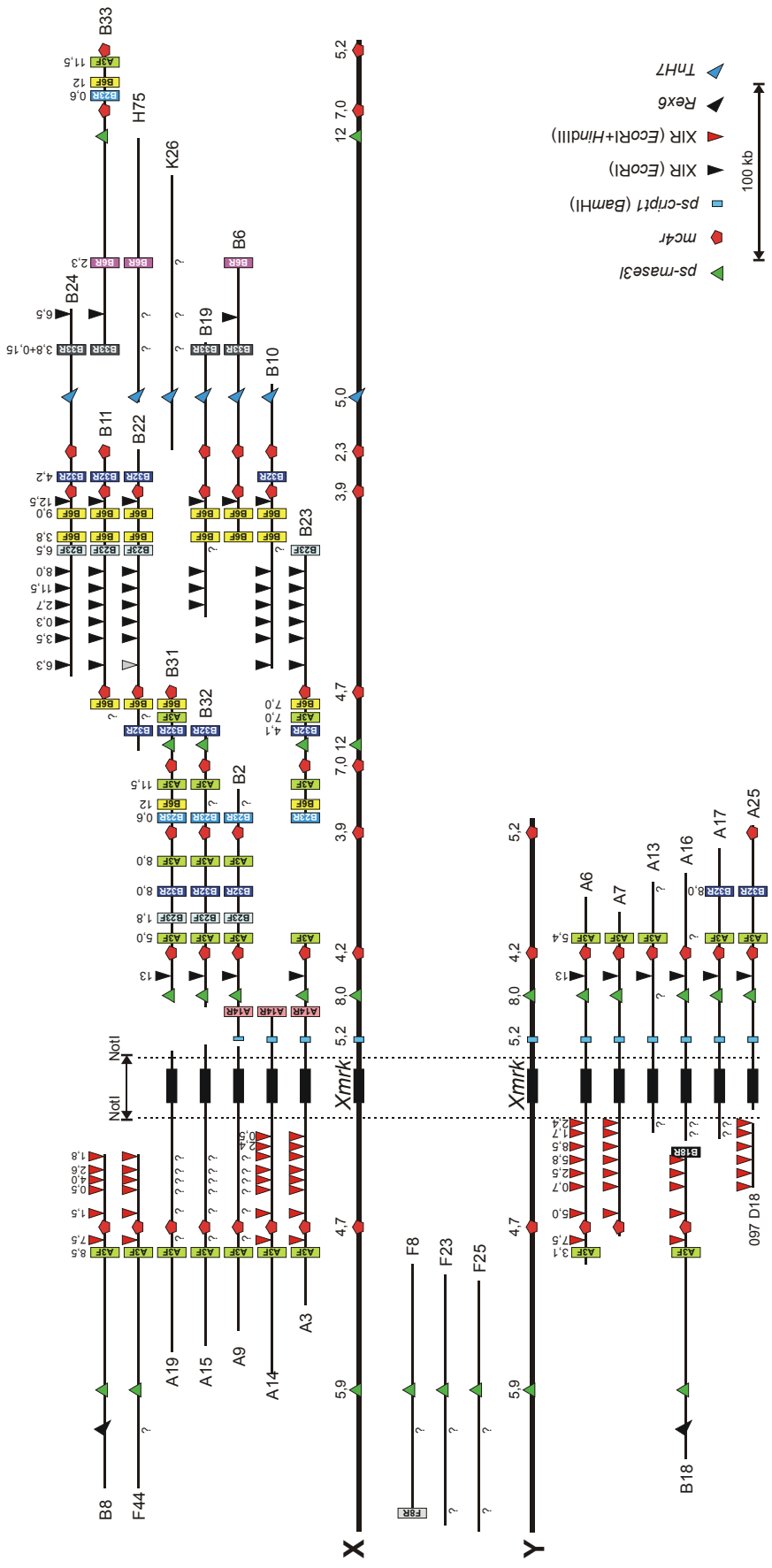

Abbildung 13: Schema der BAC-Klone, die der *Xmrk-Region* zugeordnet werden konnten. Dickere Linien repräsentieren das X- bzw. Y-Chromosom, dazwischen sind BAC-Klone gezeigt, die noch nicht einem der Gonosomen zugeordnet werden konnten. Basierend auf Southern-Blot-Analysen ist die Größe der Fragmente nach *Hin*dIII-Verdau der DNA (Ausnahmen siehe Legende) in kb angegeben. Hybridisierungs-Sonden: G4 (partieller ORF von *Xmrk*), Xmcr (partieller ORF von *mc4r* aus pROST 53), Xcript (PCR-Produkt des Pseudogens ps-*cript1* stromabwärts von *Xmrk*, Primer Xcript-F1 und -R1), RNase3l (PCR-Produkt des Pseudogens *ps-rnase3l*, Primer pROST 72-F1 und -R1), TnH7 (PCR-Produkt des potentiellen Gens *TnH7*, Primer TnH7-F1 und -R1) und Endproben (benannt nach BAC und verwendetem Vektorprimer, F = FOR-Hind, R = REV-Hind). Fragezeichen bezeichnen die Position eines Markers auf einem BAC, der nicht bestimmt wurde. Auf den Gonosomen sind nur Marker eingetragen, die auch durch Southern-Blot-Hybridisierungen genomischer DNA nachgewiesen werden konnten, ihre Reihenfolge wurde aus der Analyse der BAC-Contigs abgeleitet.

4.2.3 Potentielle Gene der *Xmrk*-Region

Durch kontinuierliche Sequenzanalysen von bereits in das *Xmrk*-Contig eingegliederten BAC-Klonen konnten potentielle Gene identifiziert werden, von denen drei näher beschrieben werden sollen.

Tanja Friedrich konnte während ihres F1-Praktikums im Lehrstuhl Physiologische Chemie I durch "Shotgun"-Sequenzierung von BAC B24 (Abb. 13) den offenen Leserahmen eines potentiellen Gens nachweisen, das *TnH7* genannt wurde. Sein konzeptionelles Translationsprodukt ist homolog zum menschlichen ALTE (Ac-Transposon like element, Esposito *et al.*, 1999). Interessanterweise ist dieses Gen auch auf den Geschlechtschromosomen des Menschen lokalisiert, nämlich auf Xp22.33 und Yp11, nahe der pseudoautosomalen Region (PAR). *ALTE* wurde während der Suche nach Genen entdeckt, die der X-Inaktivierung entgehen und codiert zwar für eine Transposase, diese kann jedoch die terminalen Wiederholungssequenzen von *ALTE* nicht mehr binden, möglicherweise aufgrund von dort identifizierten Mutationen. Es wurde spekuliert, ob ALTE eine neue Funktion übernommen hat. In *X. maculatus* konnten drei Kopien von *TnH7* durch Southern-Blot-Hybridisierung genomischer DNA nachgewiesen werden (Abb. 14), von denen eine 5,0 kb-Bande (nach *Hin*dIII-Verdau) auch im *ps-criptY*-Contig nachgewiesen werden konnte (Abb. 21).

Ebenfalls mittels "Shotgun"-Sequenzierung von BAC B24 wurden durch Christina Schultheis zwei weitere potentielle Gene nachgewiesen, deren konzeptionelle Translationsprodukte homolog zu den alpha- und delta-Untereinheiten des menschlichen Acetylcholin-Rezeptors sind. Beide liegen im Menschen eng gekoppelt auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (Pasteris *et al.*, 1993). CHRNA (Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide, RefSeq NP_000070) ist auf 2q24-q32 lokalisiert, CHRND (delta, NP_00742) auf 2q33-q34.

Ein weiteres potentielles Gen, *TMEFF2* (Synonyme: *TR, HPP1, TENB2*; Uchida *et al.*, 1999; Horie *et al.*, 2000), liegt stromaufwärts von *egfrb* (Dr. J.-N. Volff und C. Körting, persönliche Mitteilung) und ist im Menschen auch in der Region 2q32-q33 lokalisiert.

Die Kopplung von *msh2/ cript/ vit* auf dem menschlichen Chromosom 2p16-p21 wurde schon in Kapitel 4.1.3 beschrieben. Diese Ergebnisse deuten also darauf hin, dass ein großer Teil der *Xmrk-SD*-Region von *X. maculatus* Syntenie zum menschlichen Chromosom 2 aufweist.

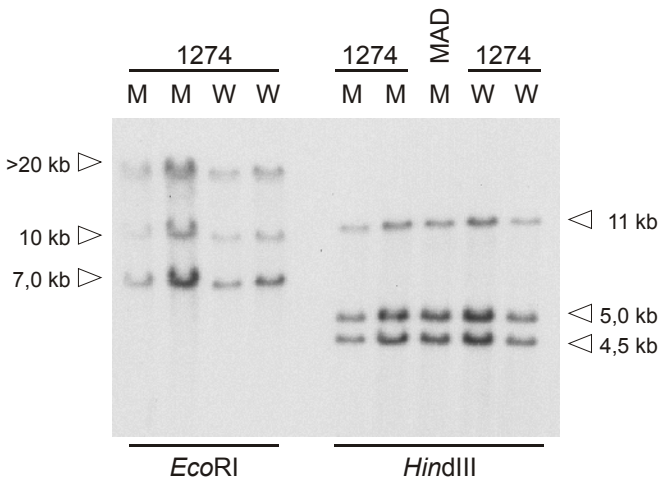

Abbildung 14: Southern-Blot-Analyse genomischer DNA, verdaut mit *Eco*RI oder *Hin*dIII, hybridisiert mit der Sonde TnH7 (PCR-Produkt, Primerkombination TnH7-F1 und -R1, Tab. A3). M: männliche und W: weibliche Individuen. Zu den Stämmen 1274, MAD siehe Tabelle 1.

4.2.4 Probleme bei der Erweiterung des *Xmrk*-Contigs

Nach der auf den Kopien von *mc4r* basierenden Anordnung der Klone erwies sich die Erweiterung der X- und Y-chromosomalen Contigs stromabwärts von *Xmrk* als besonders problematisch: Das jeweils am weitesten stromabwärts von *Xmrk* liegende Fragment in BAC B33 (X) und BAC A25 (Y) enthält *mc4r*, allerdings sind *Hin*dIII-Fragmente dieser Größe von 5,2 kb stark unterrepräsentiert gewesen in zwei Durchmusterungen der BAC-Bibliothek (die erste in dieser Arbeit, die zweite von C. Schultheis durchgeführt). Obwohl auch die überlappenden Klone BAC B7 und BAC B27 *mc4r*-enthaltende Fragmente dieser Größe besitzen (Abb. 32), sind diese nicht identisch mit den Fragmenten von BAC A25 und B33. Deshalb konnten keine weiteren BAC-Klone isoliert werden, die BAC A25 oder B33 überlappen. Dies bedeutet, dass drei Kopien von *mc4r* in nur maximal 2 BAC-Klonen isoliert werden konnten, was deutlich unter der statistischen Abdeckung der BAC-Bibliothek liegt.

Trotzdem lassen neue Ergebnisse eine baldige Erweiterung des *Xmrk*-Contigs auf dem X- und Y-Chromosom zu: Eine von Wolfgang Bernhardt sequenzierte Kopie von *mc4r* in Cosmid 122 E05 ist identisch mit der des Endfragments von BAC B33, und Christina Schultheis konnte zeigen, dass dieses Cosmid das bisherige Ende des Contigs überlappt (Schultheis, 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass BAC B16, der wegen seines zu kleinen Inserts aus den bisherigen Untersuchungen ausgeschlossen worden war, das identische *mc4r*-Fragment enthält wie BAC A25.

4.2.5 Aufbau und Erweiterung der BAC-Contigs der *egfrb*-Region

Zur Erweiterung des Contigs der *egfrb*-Region standen als bekannte Sonden nur die Endproben der Cosmide zu Verfügung. Stromaufwärts des X-Allels wurde die Sonde 090 H19-*Pvu*II-SP6 (Kap. 4.1.4) zur Durchmusterung der BAC-Bibliothek eingesetzt, die auch mit BAC A5 hybridisiert. Es konnten acht Klone isoliert werden, die zu dieser Region gehören. Dr. Reinhold Hanel analysierte darauf hin die Hybridisierungsmuster der Endproben von BAC E3 und BAC E19, konnte jedoch keine Unterschiede zwischen dem X- und Y-Chromosom nachweisen (Abb. 15). Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Cosmide.

Die Endproben von BAC A12, BAC A5 und die Endprobe A10-FOR wurden zur Analyse der Überlappung der Klone des Contigs eingesetzt (Abb. 15). Stromabwärts von *egfrb* wurde die Endprobe A10-FOR zur Durchmusterung der BAC-Bibliothek eingesetzt. Diese Probe enthält Teile eines offenen Leserasters, dessen konzeptionelles Translationsprodukt Homologie zum Zelltod-induzierenden DFFA-ähnlichen Faktor CIDE-A (RefSeq NM_007702; Inohara *et al.*, 1998) von Maus und Mensch zeigt. Southern-Blot-Analysen genomischer DNA zeigten eine geringe Kopienanzahl im Genom von *X. maculatus* und einen RFLP zwischen dem X- und Y-Chromosom (Abb. 16). Die BAC-Klone G1, G4 und E1 konnten identifiziert und dem X- oder Y-Chromosom zugeordnet werden. Die anschließende Analyse der Endproben von BAC E1 führte zur Identifizierung von acht BAC-Klonen (M1-M8), die mittels RFLP-Analyse ebenfalls je einem der Gonosomen zugeordnet werden konnten (Abb. 15 und 16).

Insgesamt konnten ca. 700 kb der *egfrb*-Region abgedeckt werden, wobei stromabwärts mehrere RFLPs zwischen dem X- und Y-Chromosom von *X. maculatus* identifiziert wurden.

Die Analyse genomischer DNA von Fischen des Stammes 1235 "MAD/WAD" (Abb. 16) lieferte außerdem einen ersten Hinweis auf die Orientierung des *egfrb*-Contigs bezüglich des *SD*-Locus: Im Stamm *X. maculatus* WLC1235 (Tab. 1) liegt in einigen Individuen ein rekombinantes Geschlechtschromosom (X*) vor, das das ursprünglich Y-chromosomale Allel von *egfrb* enthält und das ursprünglich X-chromosomale Allel von *Xmrk*. Dieses Chromosom verhält sich wie ein X-Chromosom (X*X weibliche Tiere, "WAD", X*Y männliche, "MAD"), folglich liegt der Bruchpunkt nicht zwischen *Xmrk* und *SD,* sondern zwischen *Xmrk/SD* und den in der *egfrb*-Region analysierten Markern (Abb. 17).

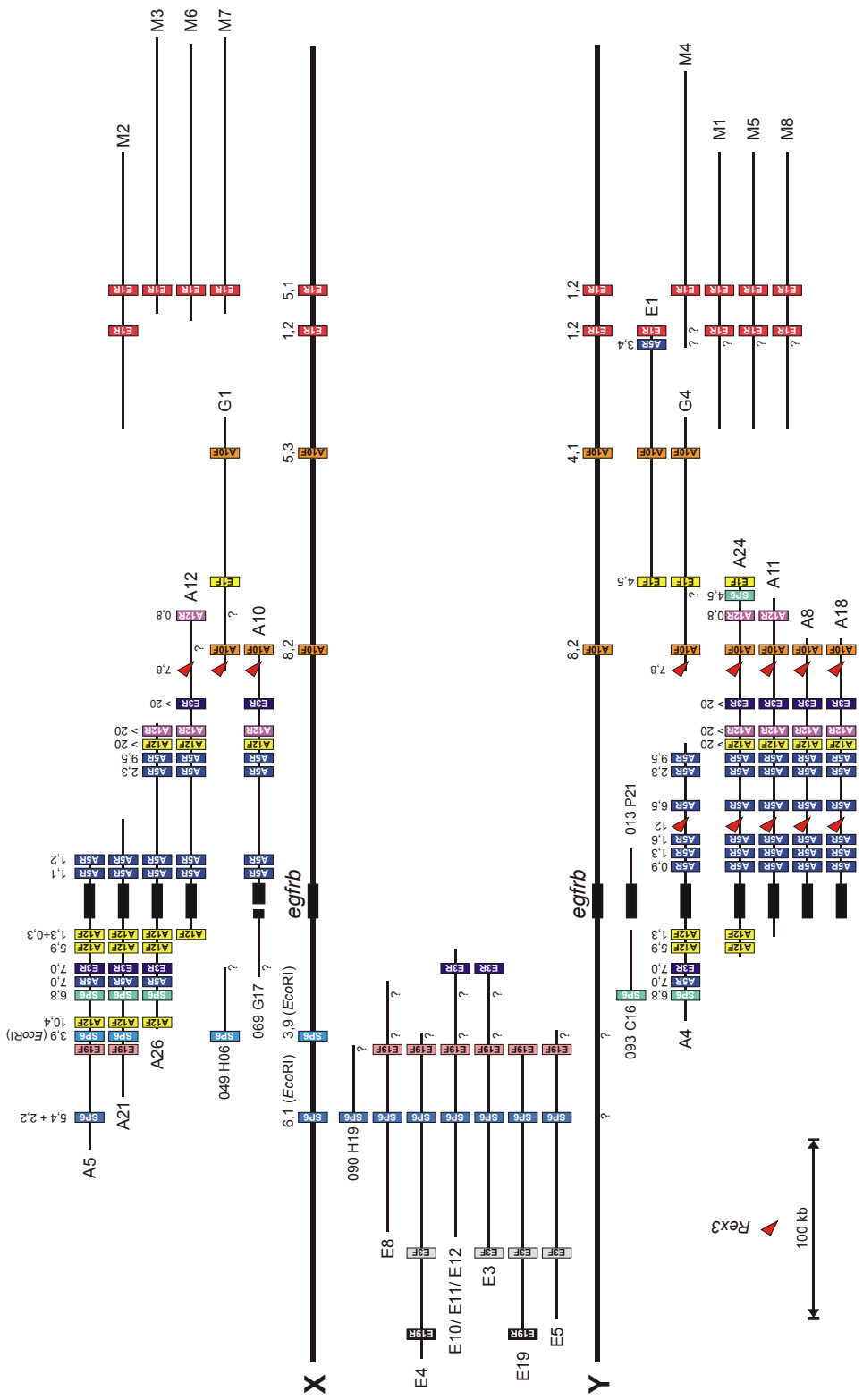

Abbildung 15: Schema der BAC-Klone, die der *egfrb*-Region zugeordnet werden konnten. Dickere Linien repräsentieren das X- bzw. Y-Chromosom, dazwischen sind BAC-Klone gezeigt, die noch nicht einem der Gonosomen zugeordnet werden konnten. Basierend auf Southern-Blot-Analysen ist die Größe der Fragmente nach *Hin*dIII-Verdau der DNA in kb angegeben (Ausnahmen sind angegeben). Hybridisierungs-Sonden: G4 (partieller ORF von *Xmrk*) und Endproben (benannt nach BAC und verwendetem Vektorprimer, F = FOR-Hind, R = REV-Hind bzw. SP6 für gezeigte Cosmide 049 H06 und 090 H19). Fragezeichen bezeichnen die Position eines Markers auf einem BAC, der nicht bestimmt wurde. Auf den Gonosomen sind nur Marker eingetragen, die auch durch Southern-Blot-Hybridisierungen genomischer DNA nachgewiesen werden konnten, ihre Reihenfolge wurde aus der Analyse der BAC-Contigs abgeleitet.

Unter der Annahme, dass die Gonosomen im Bereich des Geschlechtsbestimmungslocus stärker differenziert sind, könnten die beobachteten RFLPs stromabwärts von *egfrb* in Richtung der Geschlechtsbestimmungsregion von *X. maculatus* liegen, da hier im Gegensatz zur stromaufwärts liegenden Region mehrere RFLPs identifiziert wurden. Deshalb ist eine schnelle Erweiterung des Contigs und weitere Analyse wünschenswert, da nach der Identifizierung des Bruchpunktes des rekombinanten Chromosoms des Stammes MAD/WAD zum einen alle außerhalb liegenden Abschnitte ausgeschlossen werden können und die Analyse der jenseits des Bruchpunkts liegenden Geschlechtsbestimmungsregion voran getrieben werden kann.

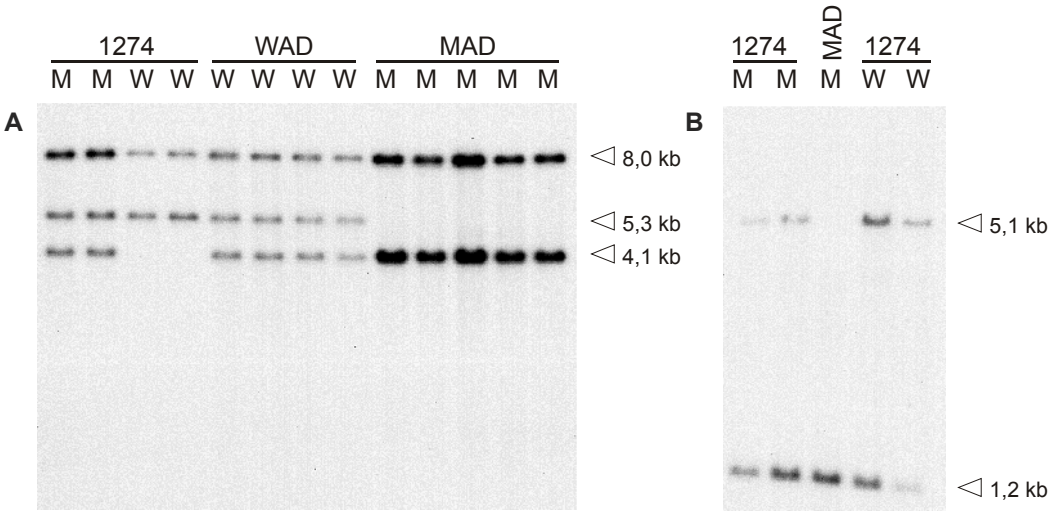

Abbildung 16: Southern-Blot-Analyse genomischer DNA, verdaut mit *Hin*dIII, hybridisiert mit A10-*Dra*I-FOR (A) und E1-*Pvu*II-REV (B). M: männliche und W: weibliche Individuen. Bezeichnung der Stämme 1274, MAD, WAD siehe Tabelle 1 und Abbildung 17.

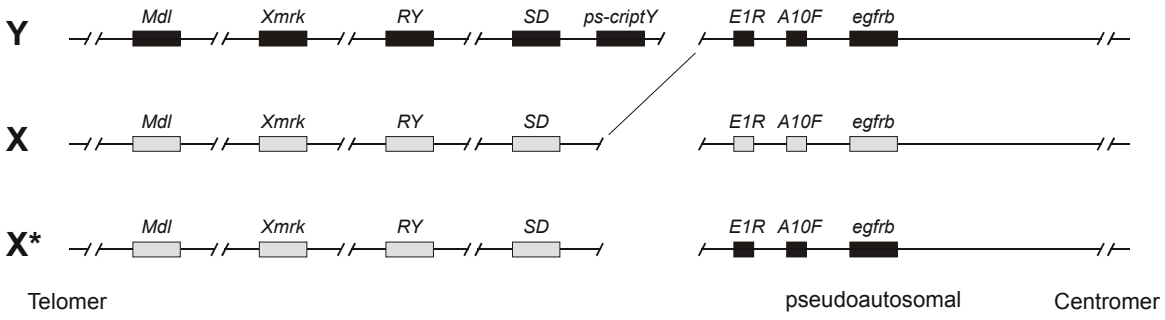

Abbildung 17: Vermutete Position geschlechtschromosomaler Loci und molekularer Marker in *X. maculatus* (X, Y) und auf dem rekombinanten X-Chromosom (X*) des Stammes MAD/ WAD. Position von *Mdl*, *Xmrk*, *SD* und *RY* nach Gutbrod & Schartl (1999), *ps-criptY*, *egfrb*, *A10F* und *E1R* diese Arbeit (siehe Text). Im Gegensatz zu *egfrb*, *A10F* und *E1R* ist die Reihenfolge von *SD* und *ps-criptY* willkürlich auf einem Segment angegeben.

4.2.6 Abschätzung des Abstands zwischen *Xmrk*- und *egfrb*-Contig

Das Ziel der vollständigen Abdeckung der geschlechtsbestimmenden Region von *X. maculatus* durch den Aufbau und die Analyse von BAC-Contigs macht eine Abschätzung des physikalischen Abstands zwischen dem *Xmrk*- und *egfrb*-Contig, wo *SD* lokalisiert ist, sehr wünschenswert. Eine FISH (Fluorescence *in situ* Hybridisation)-Analyse von Chromosomen der Metaphase kann solche Abstände auf Chromosomen im Bereich von 1-3 Megabasen auflösen (Trask, 1991).

In Kollaboration mit Dr. Indrajit Nanda (Institut für Humangenetik, Universität Würzburg) wurden die BAC-Klone B8 (stromaufwärts von *Xmrk*), B6 (stromabwärts von *Xmrk*) und G1 (stromabwärts von *egfrb*) als Proben für die FISH-Analyse ausgewählt. Die exakte Lage der BAC-Klone ist den Abbildungen 13 und 15 zu entnehmen. Die BAC-Klone B8 und B6 wurden aufgrund ihres bekannten Abstands von 400 kb auf dem X-Chromosom gewählt, um eventuelle Unterschiede in ihrem Abstand zu G1 als internen Standard zu verwenden. Vor der Chromosomen-Präparation wurden je fünf männliche und weibliche Individuen von *X. maculatus* WLC1274 mittels PCR genotypisiert (X- und Y-Allele von *Xmrk* und *egfrb* sowie *ps-criptY*, Abb. 27). Die Präparation der Chromosomen als Pools der männlichen und weiblichen Individuen und die FISH-Hybridisierung wurden von Dr. Indrajit Nanda durchgeführt.

Abbildung 18 zeigt vier Beispiele der FISH-Analyse mit BAC B6 (grün) und BAC G1 (rot). Die Signale liegen wie erwartet subtelomerisch auf einem Chromosom und sehr dicht beieinander, sind jedoch noch separat. Die Überlappung beider Signale in einigen Fällen (gelb, Abb. 18 A, C und D) ist wahrscheinlich eher von der Lage des Chromosoms während der Fixierung bestimmt als vom chromosomalen Abstand, da dies nicht in allen Metaphasen zu beobachten ist (Abb. 18 B). Auch liegen beide Signale in der Nähe des Telomers, allerdings sind die Signale von BAC B6 nicht immer wie erwartet näher am Telomer, was ebenfalls von der Lage des Chromosoms bei der Fixierung abhängen könnte. In vier von fünf untersuchten Metaphasen von männlichen Fischen zeigte BAC B6 ein stärkeres Signal auf einem der beiden Chromosomen, aber auch in drei von elf Metaphasen von weiblichen Fischen.

Die Ergebnisse der Hybridisierungen mit BAC B8 (nicht gezeigt) waren identisch mit denen von BAC B6, außer eines stärkeren Signals auf einem Chromosom in männlichen Fischen, wahrscheinlich hervorgerufen durch den hohen Anteil von *XIR*-Elementen in BAC B8 (vgl. Abb. 13 und 28).

Ein Vergleich von FISH-Hybridisierungen mit humanen Sonden bekannten Abstands auf menschliche Chromosomen (Trask, 1991) mit den Experimenten dieser Arbeit lässt den Schluss zu, dass der Abstand zwischen *Xmrk* und *egfrb* etwa 1 Mb beträgt. Für eine genauere Abschätzung der Distanz sind weitere Experimente und die Herstellung geeigneter Sonden nötig.

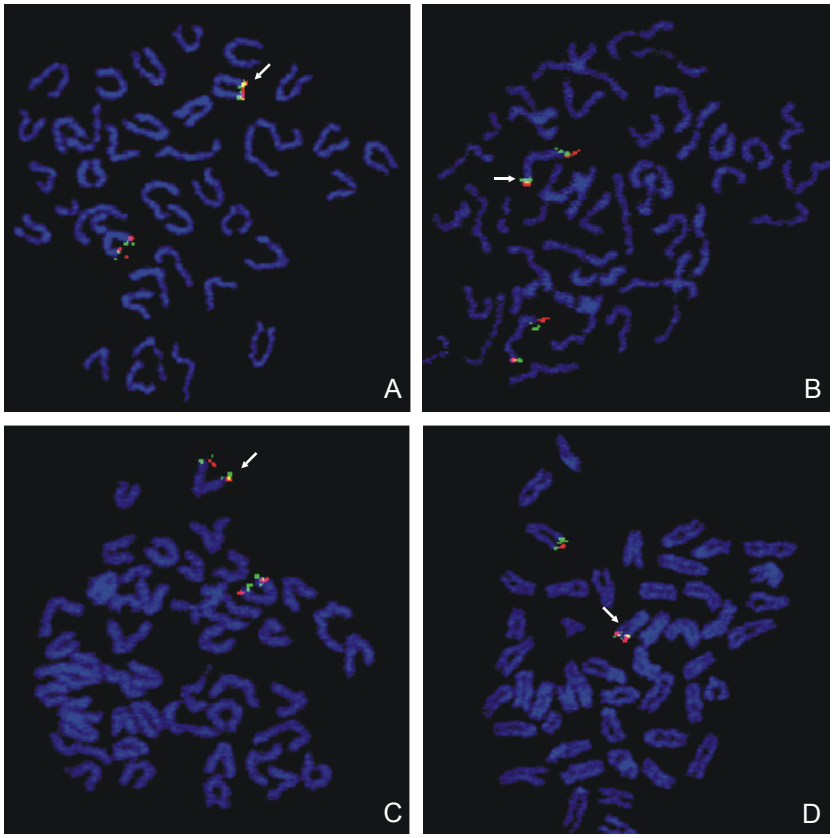

Abbildung 18: Repräsentative Präparationen von Metaphase-Chromosomen männlicher (A, B) und weiblicher (C, D) *X. maculatus*, hybridisiert mit BAC B6 (markiert mit Digoxigenin, grün) und BAC G1 (markiert mit Biotin, rot). Horizontale Pfeile zeigen stärkere Signale auf dem Y-Chromosom, diagonale Pfeile überlappende Signale (siehe Text). Methoden in Nanda *et al.* (1993, 1996 & 2000).

4.2.7 Aufbau des *ps-criptY*-Contigs des Y-Chromosoms

Durch Southern-Blot-Hybridisierungen genomischer DNA mit Sonden von *mc4r* (Abb. 19) und *ps-cript* (Abb. 25) konnten Y-spezifische Kopien dieser (Pseudo-)Gene nachgewiesen werden, allerdings waren zunächst keine Daten zur möglichen Kopplung an den geschlechtsbestimmenden Locus bekannt. Nach der Analyse der Y-spezifischen Kopie *ps-criptY* und dem Nachweis seiner Kopplung an die *Xmrk-SD*-Region (Kap. 4.4.2) wurde *ps-criptY* als neuer Startpunkt des Chromosomen-Walkings parallel zu *Xmrk* und *egfrb* verwendet.

Wie die Durchmusterung der BAC-Bibliothek mit Sonden von *mc4r* (BACs "B") und *ps-cript* (BACs "C") zeigte, enthalten mehrere Klone neben *ps-criptY* auch bis zu zwei Y-spezifische Kopien von *mc4r* (BAC B4, B21 und B29, Abb. 20 A und 21). Durch RFLP-Analysen der *mc4r*-Kopien (Abb. 19) und des *XIR*-Elements (Abb. 20 B und 21) konnte das in Abbildung 21 gezeigte Contig aufgebaut werden, das zum Ende dieser Arbeit ca. 500 kb umfasste. Die Anordnung der BAC-Klone wurde von Qingchun Zhou, der die Bearbeitung dieses Contigs fortsetzt, bestätigt.

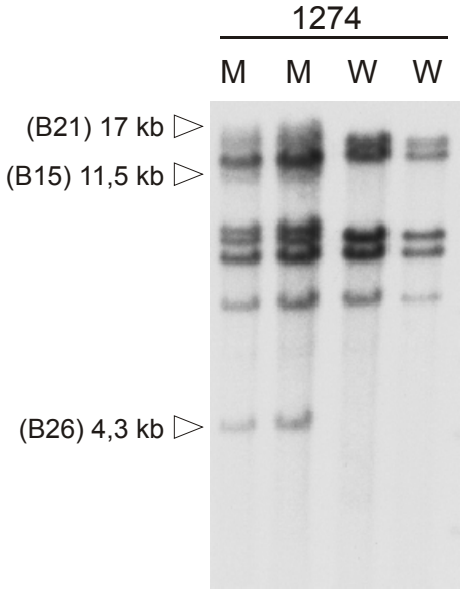

Abbildung 19: Southern-Blot-Analyse genomischer DNA, verdaut mit *Sst*I, hybridisiert mit pROST 53 (partieller ORF von *mc4r*). Nur die dem *ps-cript*Y-Contig zugeordneten Y-spezifischen Fragmente sind angezeigt (ein Klon des Contigs ist angegeben). M: männliche und W: weibliche Individuen des Stamms *X. maculatus* WLC1274.

4.2.8 Noch nicht eindeutig zugeordnete BAC-Contigs

Die Durchmusterungen der BAC-Bibliothek mit Sonden der (Pseudo-)Gene *mc4r* und *ps-rnase3l* und Southern-Blot-Analysen genomischer DNA führten zur Identifikation von BAC-Klonen (Tabelle A2), die bisher nicht in eines der Contigs integriert werden konnten, aber zum Teil dem Y-Chromosom zugeordnet werden können. Die Duplikation des *rnase3l*-Pseudogens lieferte ähnlich wie die seriellen Duplikationen von *mc4r* wichtige Marker zur Analyse der Contigs. Fast allen Hybridisierungs-Signalen genomischer DNA (Abb. 12) konnten entsprechende BAC-Klone zugeordnet werden (Abb. 13 und 22).

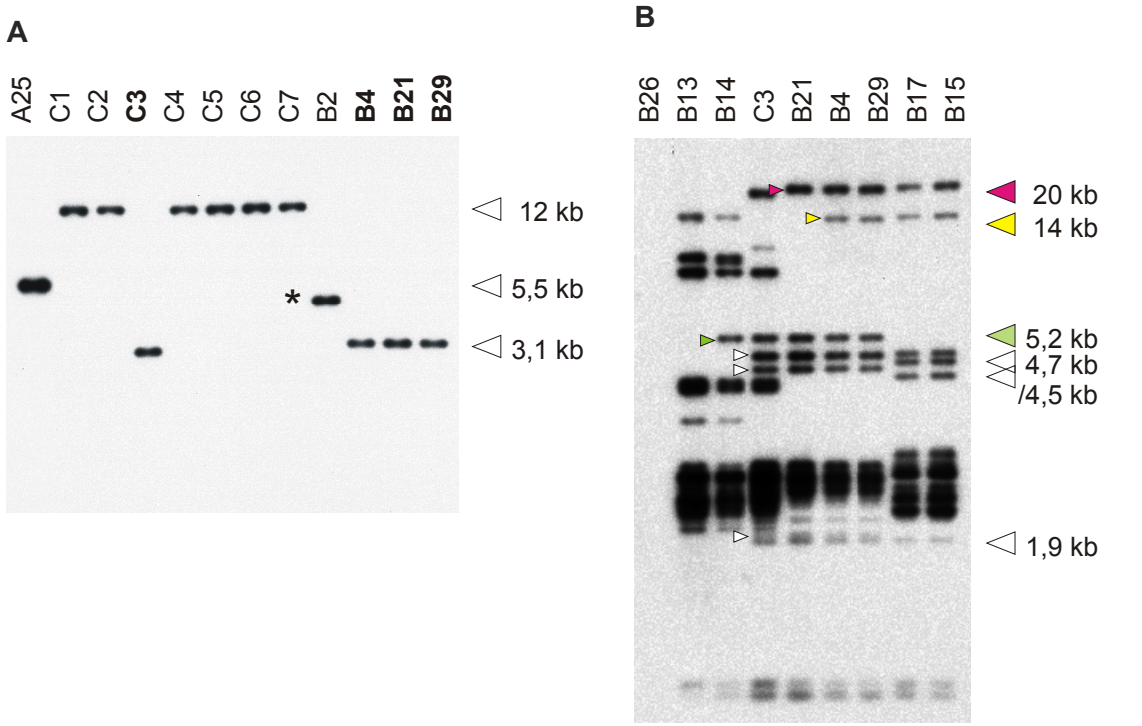

Abbildung 20: Southern-Blot-Analyse von BAC-Klonen des *ps-cript*Y-Contigs: **(A)** *Bam*HI-Verdau, hybridisiert mit der Sonde Xcript (PCR-Produkt des Pseudogens *ps-cript1* stromabwärts von *Xmrk*, Primer Xcript-F1 und -R1). Die Zuordnung der Klone zum *ps-cript*Y-Contig (Fettdruck) erfolgte über den in Kapitel 4.4 beschriebenen RFLP (vgl. Abb. 25). Das mit Stern markierte Fragment in BAC B2 ist ein partielles *Bam*HI-Fragment, entstanden während der Klonierung. **(B)** *Eco*RI-Verdau, hybridisiert mit der Sonde *XIR* (pROST 27). Die entsprechend Abbildung 29 farbig markierten Dreiecke zeigen differenzierende Fragmente.

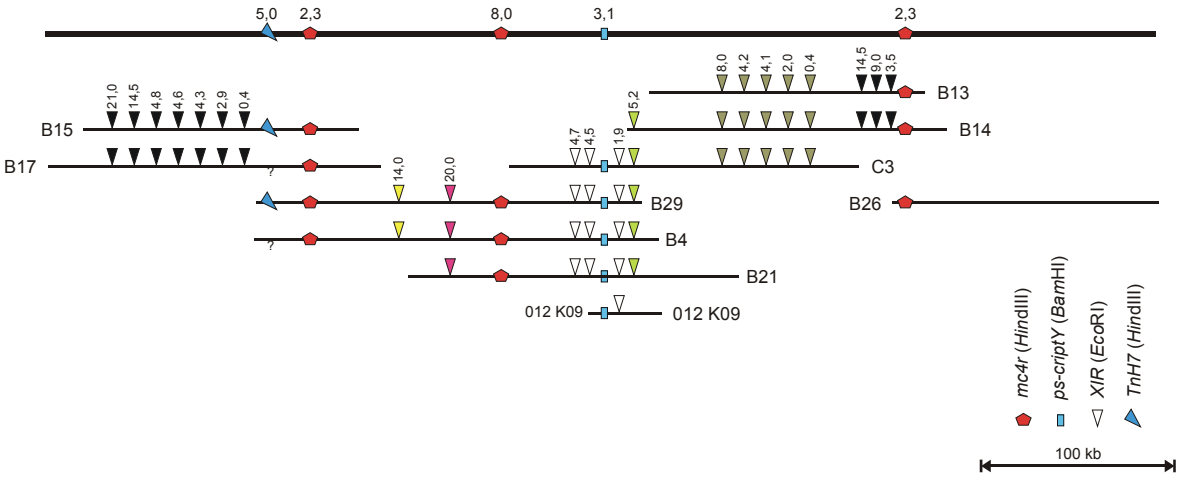

Abbildung 21: Schema der BAC-Klone, die der *ps-cript*Y-Region zugeordnet werden konnten. Die dickere Linie repräsentiert das Y-Chromosom. Basierend auf Southern-Blot-Analysen ist die Größe der Fragmente in kb angegeben (Verdau der DNA siehe Legende). Hybridisierungs-Sonden: Xmcr (partieller ORF von *mc4r* aus pROST 53), Xcript (PCR-Produkt des Pseudogens *ps-cript1* stromabwärts von *Xmrk*, Primer Xcript-F1 und -R1) und *XIR* (XIR-Element aus pROST27). Fragezeichen bezeichnen die Position eines Markers auf einem BAC, der nicht bestimmt wurde.

Die zum Teil sehr schwachen, Y-spezifischen Signale nach der Hybridisierung genomischer DNA (Abb. 12) konnten nur auf den BAC-Klonen F1 und B7 nachgewiesen werden, die beide aufgrund einer weiteren Kopie des Pseudogens identifiziert wurden (6,5 kb-Fragment in BAC B7; 7,5 kb-Fragment in F1, Abb. 22). Wahrscheinlich wurden wegen geringerer Sequenzähnlichkeit dieser Y-spezifischen Kopien bisher keine weiteren überlappenden Klone bei der Durchmusterung der BAC-Bibliothek detektiert. Auch die geringen Unterschiede in der Größe der Fragmente nach *Hin*dIII-Verdau machen die eindeutige Zuordnung schwierig, so dass weitere Experimente die Y-spezifischen RFLPs den BAC-Klonen zuordnen sollen. Abbildung 12 zeigt die schon erfolgte Analyse genomischer DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen, die dafür in Frage kommen.
Neueste Ergebnisse von Qingchun Zhou und Christina Schultheis lassen darauf schließen, dass zumindest die Klone in Abbildung 22 B an die bestehenden Contigs der *Xmrk*- und *ps-criptY*-Region angegliedert werden können, allerdings stehen noch Experimente zur Bestätigung aus.

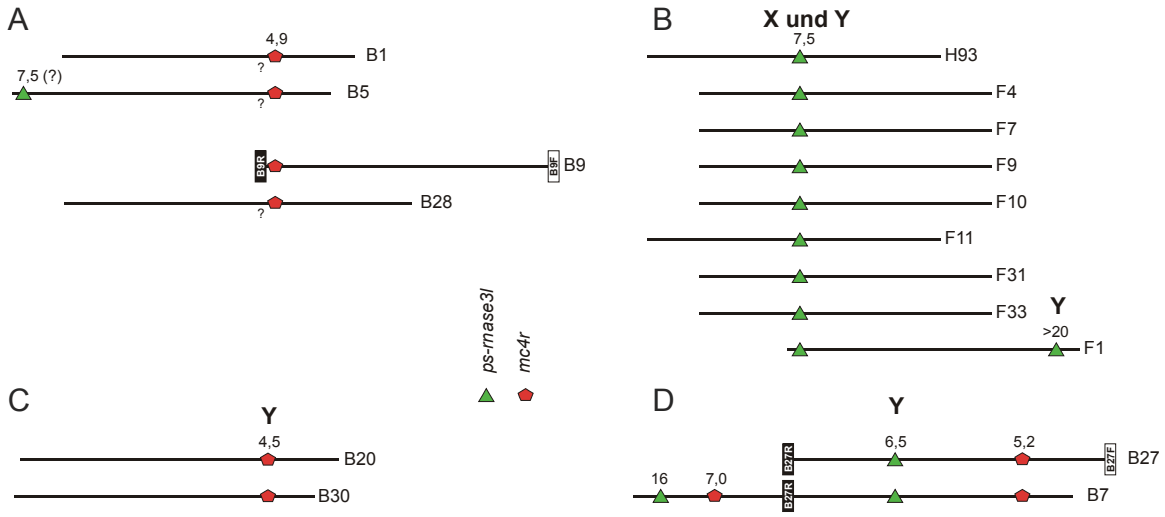

Abbildung 22: BAC-Klone, die bisher nicht den bestehenden Contigs zugeordnet werden können, aber aufgrund von RFLPs in Southern-Blot-Hybridisierungen (Sonden: RNAse3l, Xmcr und Endproben von BAC B27) und PCR/ Sequenzierung (*mc4r*) als überlappend notiert wurden. Die Größe der Fragmente nach *Hin*dIII-Verdau ist in kb angegeben. Die Sequenzierung der Enden von BAC B9 zeigte, dass die REV-Endsequenz (schwarze Box, "B9R") teilweise homolog zu *dc2* ist und zum *mc4r*-enthaltenden Fragment gehört. Aufgrund von RFLP-Analysen dem Y-Chromosom zugeordnete Marker sind durch (Y) kenntlich gemacht.

4.3 Genomische Struktur der *Dmrt*-Gene *Dmrt2* und *Dmrt4*

Dmrt (*doublesex* and *mab-3* related)-Gene codieren verschiedene Proteine mit einem gemeinsamen DNA-bindenden Motiv, der sog. DM-Domäne (Volff *et al.*, 2003c). Die Rolle des menschlichen *DMRT1* und seiner Orthologe in der männlichen Geschlechtsbestimmung so verschiedener Organismen wie dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Raymond *et al.*, 1998) und dem Medaka *Oryzias latipes* (Matsuda *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2002) erforderte die Untersuchung dieser Gene in *X. maculatus* als Kandidatengene der Geschlechtsbestimmung.

Zur Identifikation von *Dmrt*-Genen in *X. maculatus* wurde die Cosmid-Bibliothek mit einer Sonde der humanen *DMRT1*-cDNA durchgemustert, wie sie in Brunner *et al.* (2001) beschrieben ist. Es konnten drei Cosmide mit unterschiedlichem Hybridisierungsmuster identifiziert werden, wovon zwei (065 G01 und 071 H14) unterschiedlich große, interne *Bam*HI-Fragmente aufwiesen (Abb.16).

Die positiv hybridisierenden *Eco*RI-Fragmente wurden subkloniert und mittels des Transposon-Mutagenese-Systems sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass die Cosmide 065 G06 und 098 M10 das gleiche Gen enthalten und der RFLP auf die Klonierung zurückzuführen ist.

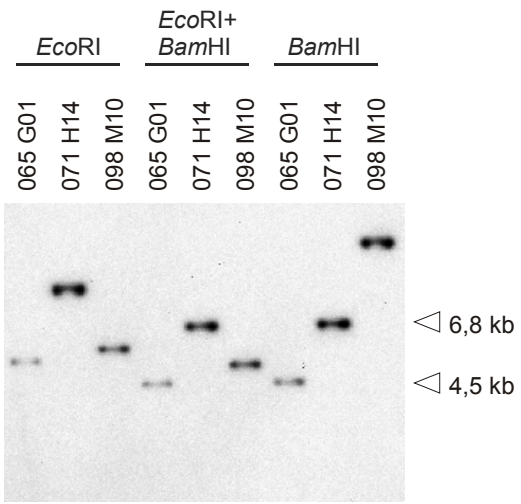

Abbildung 23: Southern-Blot-Analyse von Cosmiden, hybridisiert mit einer Sonde von *Dmrt1* entsprechend Brunner *et al.* (2001). Die Größe der internen *Bam*HI-Fragmente ist angegeben (siehe Text).

Durch Datenbank-Analyse der Sequenzen wurde in Cosmid 071 H14 der ORF eines Gens identifiziert, dessen konzeptionelles Translationsprodukt höchste Ähnlichkeit zu Dmrt2 des Pufferfisches *Takifugu rubripes* und des Medaka *Oryzias latipes* zeigte (beide 68% identisch zu Dmrt2 von *X. maculatus*). Terra (Dmrt2) des Zebrafisches *Danio rerio* ist noch zu 62% identisch. Expressionsstudien im Zebrafisch zeigten, dass *Dmrt2* (*terra*) in die Somitogenese involviert ist (Meng *et al.*, 1999).

In den Cosmiden 065 G06 und 098 M10 wurde ein ORF identifiziert, dessen konzeptionelles Translationsprodukt höchste Ähnlichkeit zu Dmrt4 des Medaka und DMO (Dmrt4) des Tilapia *Oreochromis niloticus* zeigte (beide 66% Identität). *DMO* ("DM-Gen im Ovar") ist in Tilapia nur in den Ovarien adulter Tiere exprimiert (Guan *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu ist *Dmrt4* im Medaka jedoch neben Ovar auch in Testis, Kiemen und Niere exprimiert und etwas schwächer in Gehirn und Auge (Kondo *et al.*, 2002). Die Gene von *X. maculatus* wurden analog zur Benennung in *Takifugu rubripes* (Brunner *et al.*, 2001) und den Vorschlägen von Volff *et al.* (2003c) zur Vereinfachung der Nomenklatur der *Dmrt*-Gene in Vertebraten *Dmrt2* und *Dmrt4* benannt (Abb. 24).

Wahrscheinlich wurden aufgrund der geringen Abdeckung der Cosmid-Bibliothek nur diese beiden *Dmrt*-Gene identifiziert. Nach Einführung der BAC-Bibliothek konnten mittels einer Sonde, die dem ORF des *Dmrt1*-Gens des Medaka entsprach (von Ute Hornung zur Verfügung gestellt), 23 BAC-Klone isoliert werden (Tabelle A2 im Anhang). Sie zeigten bis zu fünf positive *Eco*RI-Fragmente nach Southern-Blot-Hybridisierung mit der *Dmrt1*-Sonde. Dass keine der schon der *SD*-Region zugeordneten BAC-Klone identifiziert wurden, war ein Hinweis, dass *Dmrt1* oder andere *Dmrt*-Gene von *X. maculatus* wahrscheinlich nicht in der bisher durch Contigs abgedeckten Region der Geschlechtschromosomen liegen.

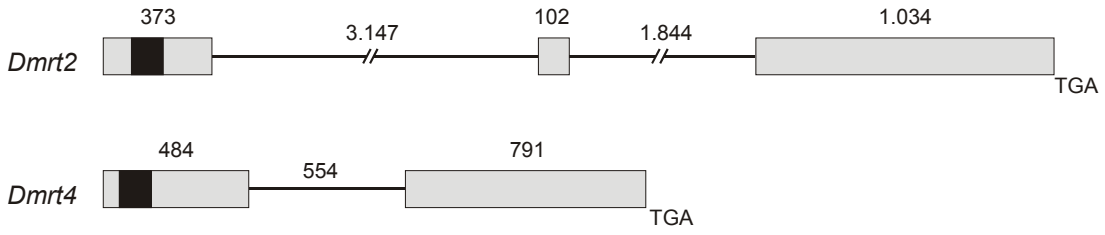

Abbildung 24: Genomische Struktur von *Dmrt2* und *Dmrt4* des Platys (Genbank Accession AF350428 und AF350427). Exons sind als graue Boxen gezeichnet, die die DM-Domäne codierende Sequenz als schwarze Box. Die aus der Sequenz abgeleitete Länge der Exons ist oberhalb in bp angegeben, ebenso die Länge der Introns (Linien). Die STOP-Codons (TGA) sind unterhalb des terminalen Exons angegeben.

Anne-Marie Veith konnte in weiteren Untersuchungen insgesamt sechs Gruppen (I-VI) von Klonen unterscheiden, von denen eine (I) *Dmrt2* und *Dmrt1* und eine noch nicht charakterisierte Kopie (wahrscheinlich *Dmrt3*) enthält. Zusätzlich konnte sie weitere Mitglieder dieser Gen-Familie isolieren (*Dmrt5* und *Dmrt2b* in Gruppe IV und III) und in zum Teil noch laufenden Untersuchungen analysieren (Veith *et al.*, 2003).

4.4 Analyse der *cript*-(Pseudo-)Gene von *X. maculatus*

Aufgrund der Tatsache, dass *ps-cript1* und zwei weitere Pseudogene der *Xmrk*- Region, *ps-vit1* und *ps-msh2*, eine syntenische Gruppe im Mensch (Chromosom 2p) und Fugu (scaffold_3107) bilden, sollte untersucht werden, ob die zu erwartenden funktionellen Kopien dieser Gene ebenfalls auf den Gonosomen oder sogar in der *SD*-Region von *X. maculatus* lokalisiert sind. In diesem Fall könnten Sonden der bereits identifizierten Pseudogene auch zur Etablierung neuer Contigs eingesetzt werden.

Mittels PCR (Primerkombination Xcript-F1 und Xcript-R1, Tab. A3) wurde eine Sonde des Pseudogens *ps-cript1* generiert, die den Bereich der ersten drei Exons und zwei Introns umfasste, und zur Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek verwendet. Es wurden insgesamt 6 neue Cosmide isoliert, die aber nach RFLP-Analyse und Southern-Blot-Hybridisierung genomischer DNA nicht zur Region stromabwärts von *Xmrk* gehörten (Abb. 25 B, nur *Bam*HI-Verdau ist gezeigt). Allerdings konnte mittels Southern-Blot-Hybridisierung genomischer DNA eine zusätzliche Kopie (*ps-criptY*) auf dem Y-Chromosom von *X. maculatus* identifiziert werden (Abb. 25 A).

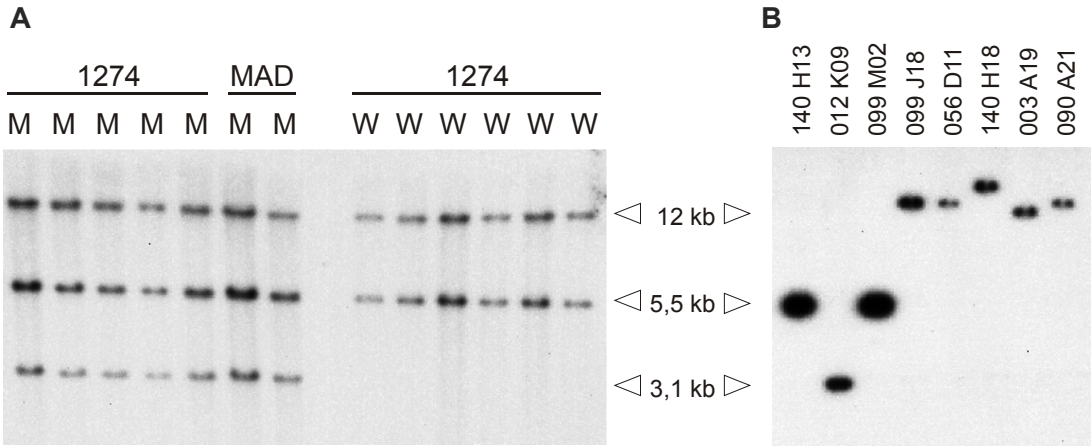

Abbildung 25: Southern-Blot-Hybridisierung von genomischer (A) und Cosmid-DNA (B), verdaut mit *Bam*HI, hybridisiert mit der Sonde Xcript (PCR-Produkt des Pseudogens *ps-cript1* stromabwärts von *Xmrk*, Primer Xcript-F1 und -R1). M: männliche und W: weibliche Individuen. Zu den Stämmen 1274, MAD siehe Tabelle 1.

4.4.1 Struktur der *cript*-(Pseudo-)Gene von *X. maculatus*

Nach RFLP-Analyse von Cosmiden, die Kopien des Gens *cript* enthalten, wurden die *Eco*RI-Fragmente der Cosmide 003 A19 und 012 K09 subkloniert und die *cript*-enthaltenden Subklone (pAF44 und pAF84) mittels Transposon-Mutagenese (Kap. 3.13) sequenziert. Das Plasmid pAF84 wurde komplett sequenziert (12.874 nt), pAF44 nur partiell, von der *Mbo*I-Klonierungsstelle des Cosmids zur ersten *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle stromabwärts des Gens (6.626 nt). Die beiden allelischen Kopien von *ps-cript1* stromabwärts von *Xmrk* auf beiden Gonosomen wurden von Cornelia Körting und Qingchun Zhou sequenziert und sind im abgebildeten Bereich 99,9% identisch (Abb. 6, Volff *et al.*, 2003b). Nach Sequenz- und Datenbankanalyse konnte gezeigt werden, dass Cosmid 003 A19 eine Kopie von *cript* enthält, die die Exon/ Intron-Struktur eines funktionellen Gens zeigt. Sowohl *ps-criptY* aus Cosmid 012 K09 als auch *ps-cript1* aus Cosmid 133 G08 werden im dritten Exon durch *Rex4,* einen neuen endogenen Retrovirus, unterbrochen (Abb. 26 A).

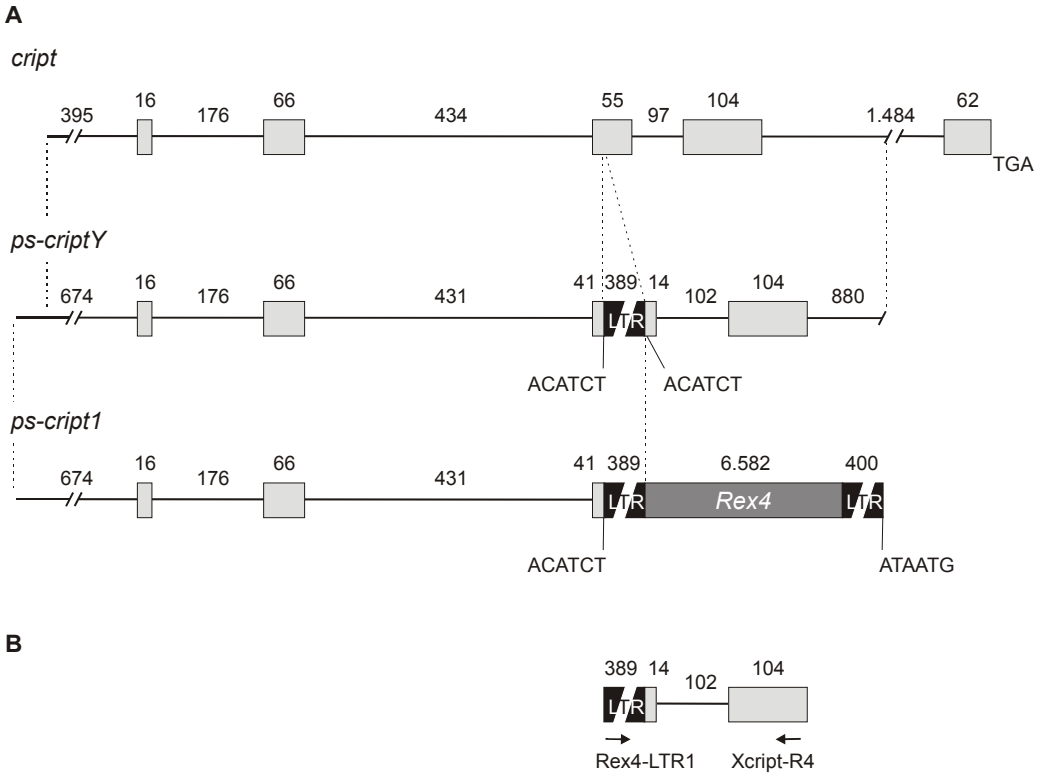

Abbildung 26: (A) Genomische Struktur der *cript*-(Pseudo-)Gene des Platys. Exons sind als hellgraue Boxen gezeichnet, *Rex4*-LTRs (long terminal repeats) als unterbrochene schwarze Boxen, die interne Sequenz von *Rex4* als dunkelgraue Box. Die aus der Sequenz abgeleitete Länge der Exons ist oberhalb in bp angegeben, ebenso die Länge der Introns, LTRs, *Rex4* und stromaufwärts gelegener Sequenzen (Linien). Die potentiellen Integrationsstellen 5' und 3' der LTRs sind angegeben, gestrichelte Linien verbinden Bereiche homologer Sequenzabschnitte (siehe Text). (B) Position der Primer zum Nachweis von *ps-criptY* in *X. maculatus* WLC1274, Rex4-LTR1 im LTR, Xcript-R4 in Exon 4, Größe des zu erwartenden Produkts: 550 bp.

4.4.2 Chromosomale Lokalisierung von *cript* und *ps-criptY*

Aus der Struktur der *cript*-Gene von *X. maculatus* konnte eine PCR-Strategie (Primerkombination Rex4-LTR1 und Xcript-R4, Tab. A3 und Abb. 26 B) abgeleitet werden, um die Kopplung von *ps-criptY* an den Geschlechtsbestimmungslokus *SD* zu untersuchen. Marina Vucic konnte während ihres Praktikums in der Arbeitsgruppe mittels PCR-Analyse von 128 männlichen und 74 weiblichen Individuen von *X. maculatus* (Population Rio Jamapa) keine Rekombination zwischen *ps-criptY* und *SD* nachweisen. Insgesamt konnte in über 400 Individuen (C. Körting, nicht veröffentlicht) keine Rekombination nachgewiesen und somit gezeigt werden, dass *ps-criptY* sehr nahe oder in der Geschlechtsbestimmungsregion liegt. Es erschien somit vielversprechend, *ps-criptY* als weiteren Startpunkt des Chromosomen-Walkings zur Identifizierung von *SD* in die Untersuchungen einzubeziehen. Außerdem wurde der Nachweis von *ps-criptY* in die routinemäßige Genotypisierung von *X. maculatus* einbezogen (Abb. 27). Allerdings kann der Nachweis von *ps-criptY* mittels PCR bisher nur für *X. maculatus* der beschriebenen Stämme (Population Rio Jamapa) eingesetzt werden. In anderen Stämmen (Population Rio Usumacinta) oder Arten entstehen zwar PCR-Produkte ähnlicher Größe unabhängig vom Geschlecht (Daten nicht gezeigt), diese sind aber wahrscheinlich auf das Vorhandensein mehrerer Kopien von *Rex4* bzw. seiner LTRs zurück zu führen, deren zwischenliegende Sequenzen nur mit dem Primer Rex4-LTR1 amplifiziert werden. Weitere Untersuchungen sollen klären, ob gonosomale Kopien von *cript* in anderen Stämmen/ Arten vorhanden sind und neue PCR-Strategien entwickelt werden können.

Die funktionelle Kopie *cript* ist autosomal, wie in Kollaboration mit Indrajit Nanda gezeigt werden konnte. Cosmid 003 A19, das *cript* enthält (Kap. 4.4.1) und BAC A7, der das Y-Allel von *Xmrk* überspannt (Kap. 4.2.1), wurden in einer FISH-Analyse als Sonden auf Metaphase-Chromosomen männlicher *X. maculatus* hybridisiert. Das Signal von BAC A7 ist auf zwei Chromosomen präsent, wobei ein Signal meist stärker erscheint (Abb. 28 A, C). Dies liegt höchstwahrscheinlich an den ausgedehnten Anteilen des *XIR*-Elements in der Sonde BAC A7, das in FISH-Analysen spezifisch das Y-Chromosom von *X. maculatus* markiert (Nanda *et al.*, 2000). Analog dazu ist das Chromosom mit dem schwächeren Signal das X-Chromosom und die Signale des Cosmids 003 A19 können zwei Autosomen zugeordnet werden.

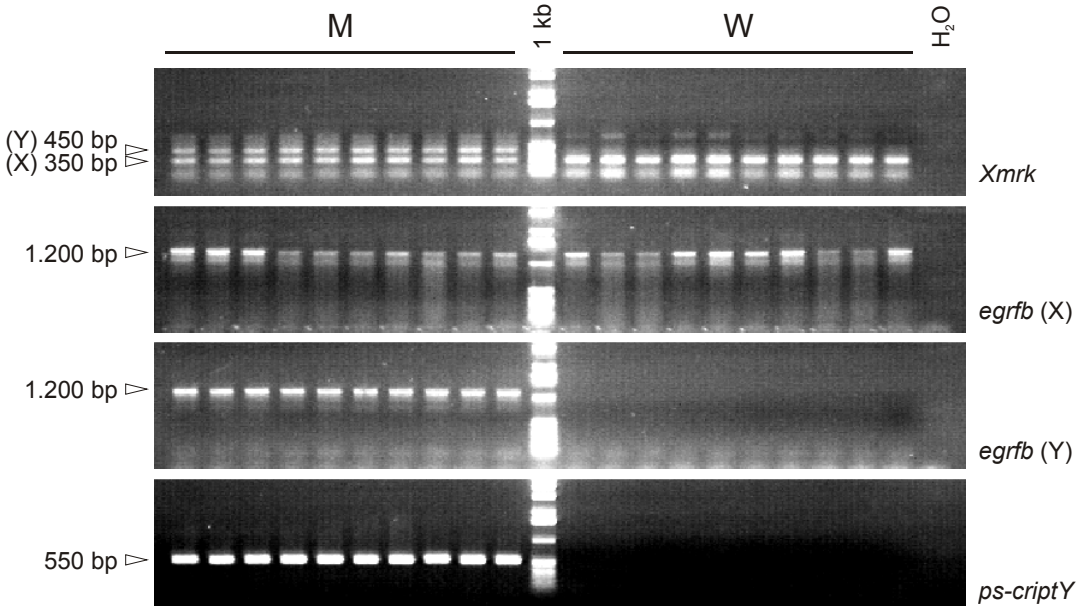

Abbildung 27: Genotypisierung von männlichen (M) und weiblichen (W) *X. maculatus* WLC1274 mit "FinClip"-DNA (Kap.3.2.3) als Matrize. Primerkombinationen: Xfor, Xrev, Yfor und Yrev für *Xmrk*, INV1new und JD1001/ JD1002 für *egfrb* (X/Y), Rex4-LTR1 und Xcript-R4 für *ps-criptY* (Tab. A3). PCR-Bedingungen: 1* [3'00'' bei 95°C], 40* [0'45'' bei 95°C/ 0'45'' bei 55 °C/ 0'45'' bei 72°C] 1* [5'00'' bei 72°C], 4°C für *Xmrk* (X/Y); 1* [3'00'' bei 95°C], 40* [0'45'' bei 95°C/ 0'45'' bei 56 °C/ 1'00'' bei 68°C], 1* [5'00'' bei 72°C], 4°C) für *egfrb* (X); 1* [3'00'' bei 95°C], 40* [0'45'' bei 95°C/ 0'45'' bei 60 °C/ 1'00'' bei 72°C], 1* [5'00'' bei 72°C], 4°C für *egfrb* (Y); 1* [3'00'' bei 95°C], 40* [0'45'' bei 95°C/ 0'45'' bei 55 °C/ 1'00'' bei 72°C], 1* [5'00'' bei 72°C], 4°C für *ps-criptY*. Abbildung von C. Körting.

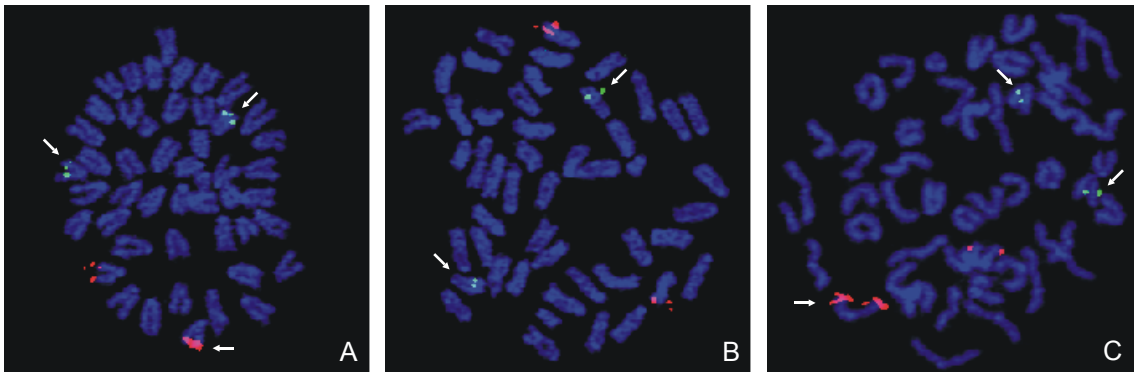

Abbildung 28: Repräsentative Präparationen von Metaphase-Chromosomen männlicher *X. maculatus*, hybridisiert mit Cosmid 003 A19 (enthält *cript*; markiert mit Digoxigenin, grün) und BAC A7 (überspannt das Y-Allel von *Xmrk*; markiert mit Biotin, rot). Horizontale Pfeile zeigen stärkere Signale auf dem Y-Chromosom, diagonale Pfeile Autosomen (siehe Text). Methoden in Nanda *et al.* (1993, 1996 & 2000).

4.4.3 Sequenz des Cosmids 012 K09 (33 kb, *ps-criptY*)

Die enge Kopplung von *ps-criptY* an den Geschlechtsbestimmungslocus machte die Sequenzierung des *ps-criptY*-enthaltenden Cosmids 012 K09 wichtig, um einen Einblick in die Struktur nahe von *SD* zu bekommen und *SD* möglicherweise identifizieren zu können. Zur Sequenzierung wurde Cosmid 012 K09 vollständig mit *Eco*RI verdaut und sowohl in pJOE2114 als auch pBluescript II KS+/- subkloniert. Nach Größenbestimmung des Inserts wurden Fragmente in pJOE2114 größer als 0,8 kb mittels des Transposon-Mutagenese-Systems sequenziert und Fragmente in pBluescript II KS+/- kleiner oder gleich 0,8 kb mittels geeigneter Vektorprimer sequenziert.

Nach Restriktionsanalyse (nicht gezeigt) war bekannt, dass Cosmid 012 K09 mehrere Fragmente gleicher oder sehr ähnlicher Größe enthält, was die Erstellung einer Restriktionskarte erschwerte. Deshalb wurde zur Anordnung der Fragmente ein Partialverdau (*Eco*RI) von Cosmid 012 K09 wiederum in pBluescript II KS+/- subkloniert und die Subklone nach *Eco*RI-Verdau analysiert. Die Subklone wurden zunächst nach der wahrscheinlichsten Reihenfolge der Fragmente in 012 K09 sortiert und repräsentative Klone mittels geeigneter Vektorprimer von beiden Seiten sequenziert, um nach Sequenzvergleich die Orientierung der endständigen Fragmente zu bestimmen. Zur Bestimmung der Orientierung wurden mindestens zwei verschiedene Klone des Partialverdaus für jedes Fragment sequenziert, mit Ausnahme von pAF77 und pK09Eco319I (Abb. 29), die nur einmal als Endfragmente des Partialverdaus isoliert werden konnten. Abbildung 29 zeigt die mutmaßliche Anordnung der Subklone. Kleine *Eco*RI-Fragmente wurden den Fragmenten angehängt (+ 68 nt), wenn sie in mindestens zwei Analysen identifiziert werden konnten (Abb. 29 A).

Die Sequenz des Inserts von Cosmid 012 K09 beträgt 33.658 Nukleotide und ist in der theoretischen Leserichtung von *ps-criptY* orientiert. Es ist anzumerken, dass solche Abschnitte des Genoms aufgrund der hohen Ähnlichkeit bzw. Identität der Sequenzen repetitiver Elemente (in diesem Fall *XIR*) nicht oder nur durch extrem hohen Aufwand mittels "Shotgun"-Partialsequenzen analysiert werden können.

Sequenzanalyse mit der NIX-Software (http://menu.hgmp.mrc.ac.uk/menu-bin/Nix/) zeigte neben *ps-criptY* und möglichen alternativen Genprodukten (Kap. 4.4.4), dass stromabwärts von *ps-criptY* ausgedehnte Anhäufungen von *XIR*-Elementen liegen (Abb. 29 B). Dies könnte ein Hinweis auf die Degeneration dieser Region sein, wie für das Y-Chromosom der Säuger beschrieben (Charlesworth & Charlesworth, 2000).

Nahe der Klonierungsstelle des Inserts konnte stromaufwärts von *ps-criptY* der ORF von *ps-msh2* identifiziert werden, was bedeuten könnte, dass die Duplikation, die zwei cript-(Pseudo-)Gene entstehen ließ, einen größeren Abschnitt des Genoms umfasste. Darüber hinaus konnten keine weiteren Sequenzen entdeckt werden, die Hinweise auf potentielle Gene lieferten.

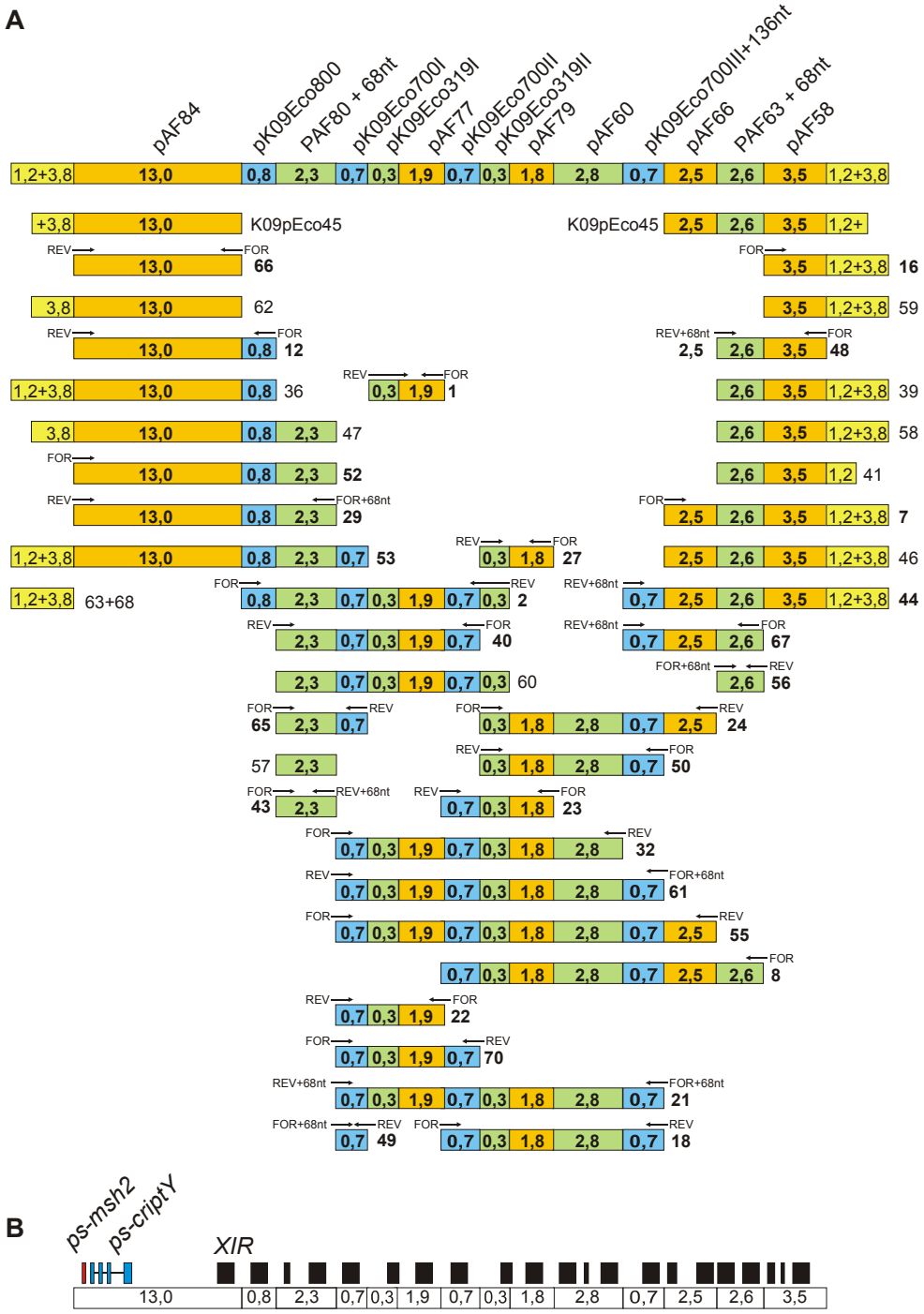

Abbildung 29: (A) Analyse zur Anordnung der Subklone von Cosmid 012 K09. Gelbe Boxen: Vektorfragmente (*Eco*RI) von Lawrist7; pAF: Insert in pJOE2114; pK09Eco: Insert in pBluescript II; pK09pEco: Inserte in pBluescript II (Partialverdau, die zur Orientierung analysierten Subklone in Fettdruck, Pfeile zeigen die Endsequenzen FOR und REV, siehe Text). (B) Anordnung von *ps-criptY* (blau), *ps-msh2* (rot) und *XIR*-Elementen (schwarz), in Leserichtung oberhalb angegeben.

4.4.4 Expressionsanalyse der *cript*-(Pseudo-)Gene von *X. maculatus*

Sequenzanalyse mit der NIX-Software (http://menu.hgmp.mrc.ac.uk/menu-bin/Nix/) von *cript*, *ps-cript1* und *ps-criptY* zeigte mögliche Spleiß-Stellen im LTR von *ps-criptY,* die zu einer Hybrid-mRNA aus den Exon 1-3 codierenden Sequenzen und Teilen des LTR, die direkt an der Integrationsstelle liegen, führen könnten (Abb. 30).

Die konzeptionelle Translation dieser hypothetischen mRNA, die für 18 zusätzliche Aminosäuren in Exon 3 codiert und ein STOP-Codon im 4. Intron nutzen könnte ("*ps-criptY*", Abb. 30 A, C), führte nicht zur Identifikation signifikant ähnlicher Proteine oder dafür codierender Sequenzen in den nicht-redundanten Datenbanken des NCBI und in Fugu (http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk/blast/blast.cgi) außerhalb der zu Cript homologen Regionen.

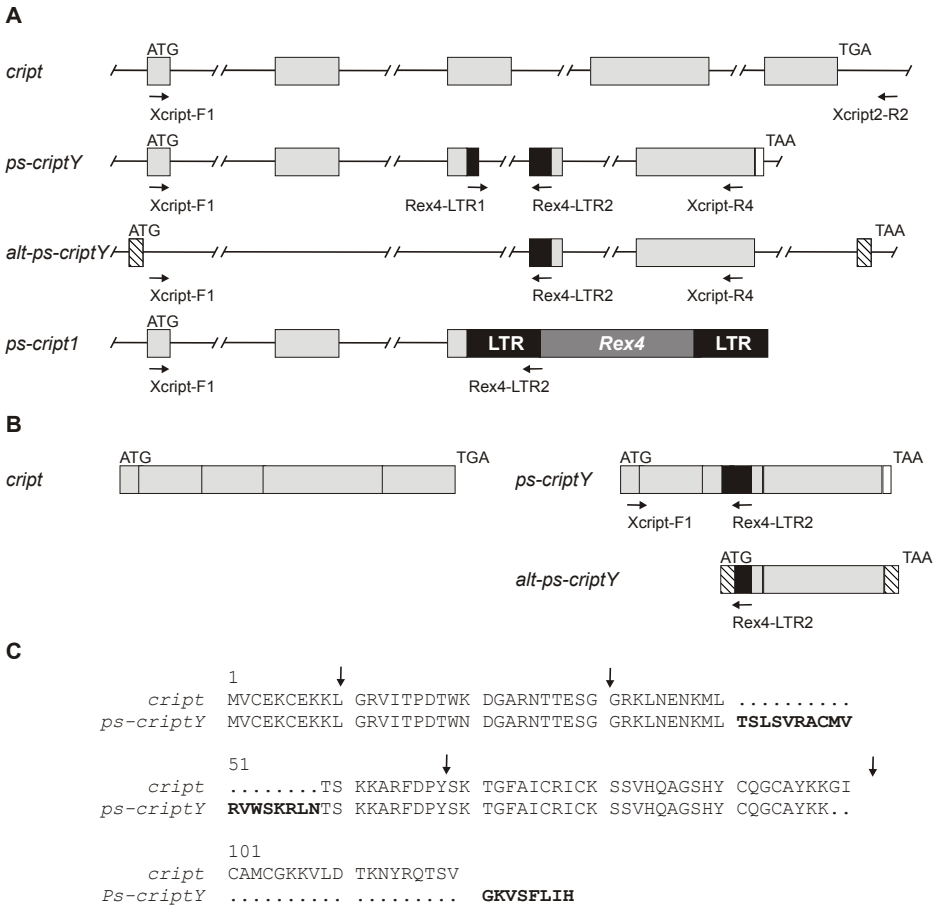

Abbildung 30: (A) Genomische Struktur und durch Computeranalyse vorhergesagte Exons und Transkripte der *cript*-Gene des Platys. Die den Exons des *cript*-Gens entsprechenden Sequenzen sind als hellgraue Boxen gezeichnet, Rex4-LTRs (long terminal repeats) als schwarze Boxen, *Rex4* als dunkelgraue Box, weitere durch Computeranalyse vorhergesagte Exons schraffiert. (siehe Text). (B) Konzeptionelle offene Leseraster der in (A) gezeigten (Pseudo-)Gene, Start und STOP-Codons sind oberhalb angegeben. (C) Vergleich der (hypothetischen) Proteinsequenzen von *cript* und *ps-criptY*, zusätzliche Aminosäuren in *ps-criptY* in Fettdruck.

Mehrere alternative erste bzw. terminierende Exons ("*alt-ps-criptY*" in Abb. 30 A) zeigten ebenfalls keine signifikante Ähnlichkeit ihrer hypothetischen Translationsprodukte zu bekannten Proteinen.

Mittels RT-PCR wurde untersucht, ob die beschriebenen hypothetischen mRNAs transkribiert werden. Die Primer wurden für *cript* in Exon 1 (Xript-F1) und der untranslatierten Region gewählt (Xcript2-R2) und für *ps-criptY* und *ps-cript1* in Exon 1 und dem Bereich des LTR, der am Übergang des LTR zum zweiten Teil des dritten Exons liegt (Rex4-LTR2) und im Falle der Bildung eines neuen Exons Teil der mRNA wäre (Abb. 30 A). Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zwischen *ps-cript1* und *ps-criptY* konnten ihre potentiellen Transkripte bisher nicht voneinander unterschieden werden.

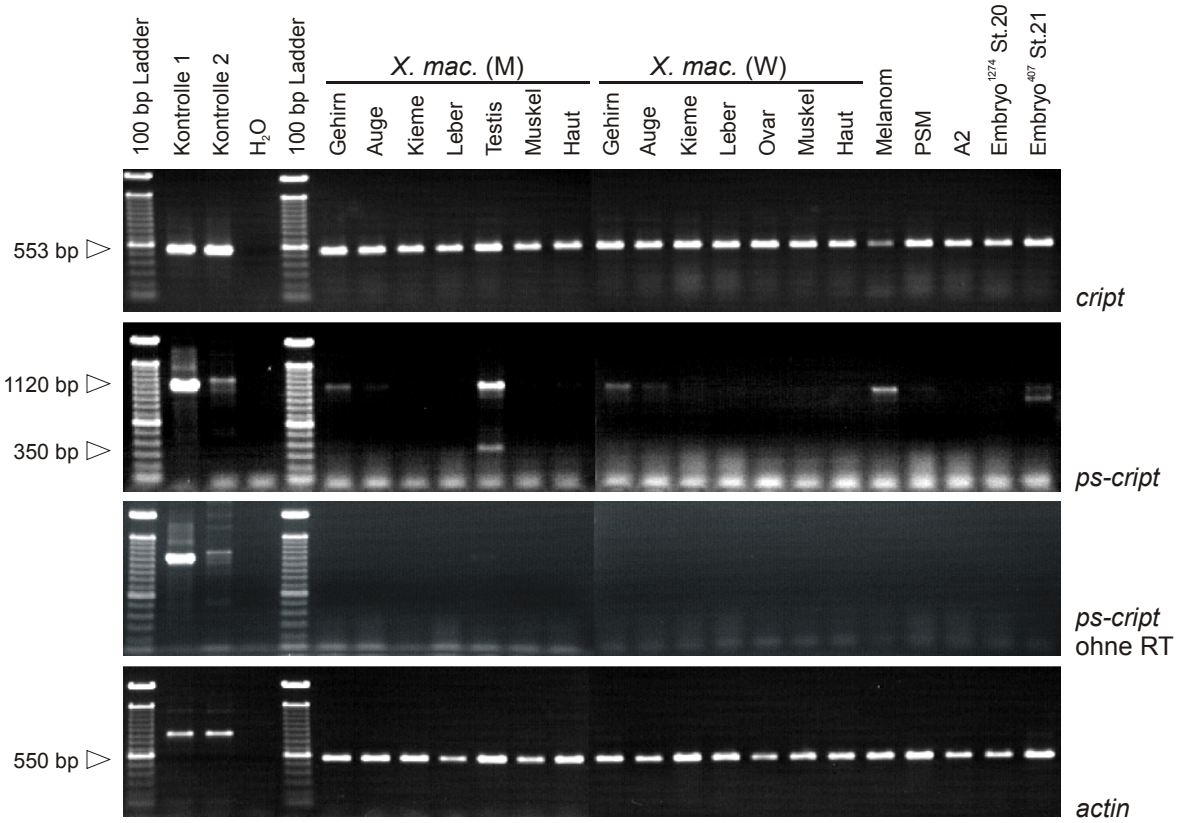

Abbildung 31: Expressionsanalyse des autosomalen *cript*-Gens und seiner gonosomalen Kopien *ps-criptY* und *ps-cript1* mittels RT-PCR. Primerkombinationen: Xcript-F1 und Xcript2-R2 für *cript*, Xcript-F1 und *Rex4*-LTR2 für *ps-criptY*/ *ps-cript1*, Act1 und Act2 für *actin*. Kontrolle 1: 10 ng einer klonierten cDNA von *cript* (Klon 27, von C. Körting zur Verfügung gestellt) bzw. 100 ng genomische DNA von *X. maculatus* WLC1274 (M) für *ps-cript*. Kontrolle 2: 10 ng einer klonierten cDNA von *cript* (Klon 39, von C. Körting zur Verfügung gestellt) bzw. 100 ng genomische DNA von *X. helleri* WLC1337 (M) für *ps-cript*. Eingesetzt wurden cDNA aus 20 ng Gesamt-RNA zum Nachweis von *actin* (PCR-Bedingungen: 1* [2'00'' bei 95°C], 25* [0'45'' bei 95°C/ 0'45'' bei 55 °C/ 1'00'' bei 72°C], 1* [5'00'' bei 72°C], 4°C) und cDNA aus 150 ng Gesamt-RNA zum Nachweis von *cript* und *ps-criptY*/ *ps-cript1* (PCR-Bedingungen: 1* [2'00'' bei 95°C], 35* [0'45'' bei 95°C/ 0'45'' bei 55 °C/ 1'00'' bei 72°C], 1* [5'00'' bei 72°C], 4°C). Längenstandard: 100 bp Ladder (INVITROGEN™).

Abbildung 31 zeigt, dass das autosomale Gen *cript* in allen getesteten Geweben und Organen gleichmäßig exprimiert wird mit Ausnahme des Tumorgewebes. Zumindest eins der mutmaßlichen Pseudogene wird ebenfalls exprimiert, allerdings nicht ubiquitär, sondern besonders stark in Testis und nur schwach in Tumorgewebe und Gehirn beider Geschlechter. Die Größe der Transkripte lässt allerdings nicht auf Spleißen der RNA schließen, da die Bande der stärksten Intensität für *ps-cript* der Größe des primären Transkripts (inklusive Introns) entspricht. Nur in Testis ist noch eine kleinere Bande nachzuweisen, deren Größe keiner der vorhergesagten mRNAs entspricht. Somit konnte bisher nicht nachgewiesen werden, ob ein alternatives Exon verwendet wird oder sogar mehrere ("*alt-ps-criptY*", Abb. 30 B).
Zukünftige Experimente, insbesondere die Sequenzierung der RT-PCR-Produkte, sollen zeigen, ob solche möglicherweise funktionellen mRNAs doch gebildet werden. Diese werden sich neben der Wahl anderer Primer auch auf die Sequenzierung der PCR-Produkte konzentrieren müssen.

4.5 Melanocortinrezeptor-Gene in *X. maculatus*

Durch die Analyse genomischer DNA von *X. maculatus* konnte festgestellt werden, das mindestens acht Kopien eines Melanocortinrezeptor-Gens pro haploidem Genom vorhanden sind (Abb. 19). Nach Durchmusterung der Cosmid-Bibliothek wurden 15 Klone identifiziert (Tabelle A1), die aufgrund von RFLP-Analysen in 7 Gruppen eingeteilt werden konnten. Allerdings verursachte die relativ kleine Insertgröße Schwierigkeiten, geeignete Enzyme zur Zuordnung verschiedener Kopien der Cosmide den beobachteten Fragmenten genomischer DNA zuzuordnen.

4.5.1 Tandemartige Duplikation von *mc4r*-Genen in *X. maculatus*

Durch die Erstellung ausgedehnter BAC-Contigs und der Einbeziehung anderer gonosomaler Marker wie der Pseudogene *rnase3l* (Abb. 32) konnten alle bis auf eine der *mc4r*-Kopien eindeutig dem X- bzw. Y-Chromosom zugeordnet werden. Insgesamt konnten 9 Kopien (*mc4rA-G, M, L*) der *Xmrk*-Region des X-Chromosoms zugeordnet werden und 3 Kopien (*mc4rH, I, K*) der des Y-Chromosoms. 3 Kopien liegen in der *ps-criptY*-Region (*mc4rP, Q, R*) und weitere 3 Kopien (*mc4rN, O, T*) konnten dem Y-Chromosom zugeordnet werden. Eine Kopie (*mc4r*S) konnte bisher nicht eindeutig den Gonosomen zugeordnet werden (Abb. 32). Somit konnten auf dem X- und Y-Chromosom jeweils 9 Kopien des *mc4r*-Gens nachgewiesen werden.

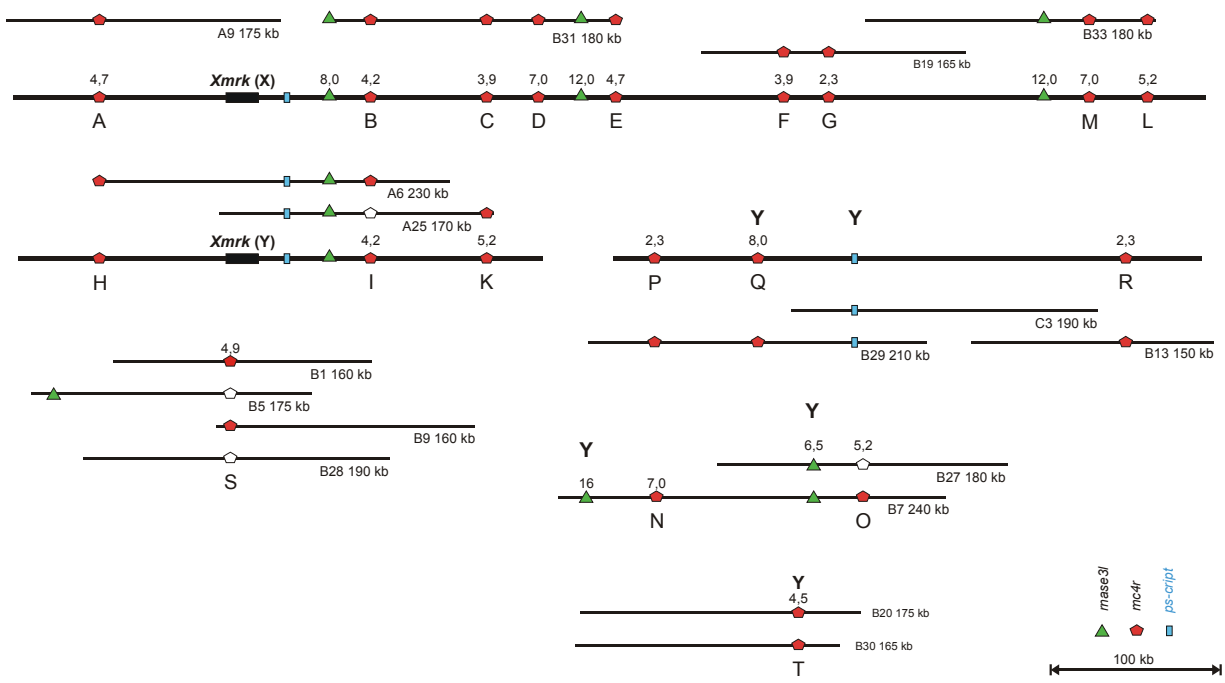

Abbildung 32: Repräsentative BAC-Klone verschiedener Contigs, deren *mc4r*-Kopien sequenziert wurden (rot ausgefüllte Pentagone). Y: Y-spezifische Kopien der angegebenen Marker (siehe Legende und Text).

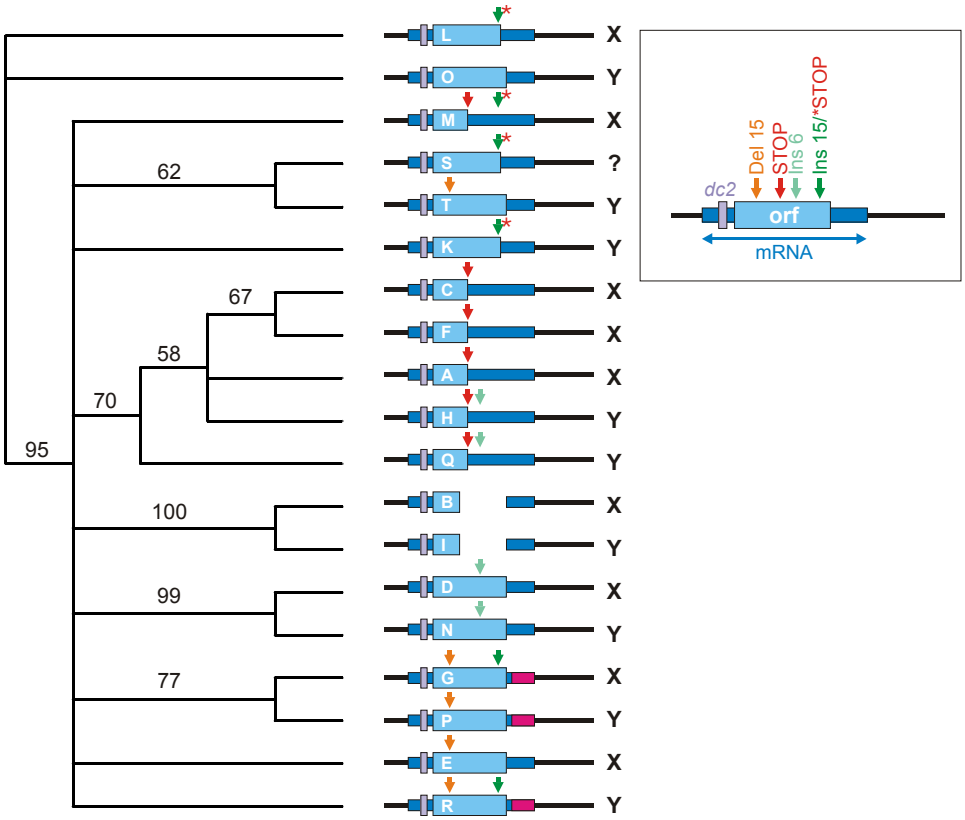

Abbildung 33: Phylogenie und strukturelle Eigenschaften der *mc4r*-Gene von *X. maculatus*. Der Stammbaum ist nicht verwurzelt. (Analyse: Bootstrap analysis using neighbor-joining distance, 100 Wiederholungen, Bootstrap 50% majority-rule consensus tree, Swofford, 2003). Die wichtigsten strukturellen Eigenschaften der verschiedenen Gen-Kopien sind graphisch dargestellt (siehe Legende und Text).

4.5.2 Strukturelle Eigenschaften

Die innerhalb der BAC-Contigs identifizierten *mc4r*-Kopien (Abb. 32) wurden in Kooperation von Mitgliedern der Arbeitsgruppe mittels Transposon-Mutagenese von *Hin*dIII- oder *Eco*RI-Subklonen sequenziert, mit Ausnahme der Kopien *mc4rS* und *T*, die mittels PCR amplifiziert und sequenziert wurden (Y. Selz/ W. Bernhardt: *mc4rA, N, O, T;* C. Körting/ C. Schultheis: *mc4rB, C, D, E, H, I;* R. Hanel: *mc4rF, G;* A. Froschauer: *mc4rK, L, M*). Die auffälligsten strukturellen Eigenschaften sind in Abbildung 33 dargestellt: Alle Kopien sind in ihrer 5' untranslatierten Region mit einem Teil eines Gens fusioniert, dessen konzeptionelles Translationsprodukt homolog zu dem eines Gens namens *DC2* (RefSeq NP_067050) mit unbekannter Funktion ist. Dies konnte durch die Analyse von *mc4r*-cDNA aus der Melanomzelllinie PSM bestätigt werden (C. Körting, persönliche Mitteilung). *Mc4rG*, *P* und *R* besitzen einen unterschiedlichen 3' untranslatierten Bereich und in *mc4rB* und *I* sind durch eine Deletion ca. 40% des C-terminalen Bereichs des Proteins verloren. Die Kopien *mc4rA, C, F, H, M* und *Q* sind durch ein STOP-Codon an identischer Position nach der ersten Transmembrandomäne unterbrochen. Verglichen mit der Consensus-Sequenz aller bisher identifizierten *mc4r*-Gene von *X. maculatus*, *Danio rerio* und *Takifugu rubripes* wurden drei auffällige Sequenzunterschiede als Del 15 (Deletion von 15 nt in *mc4rE, G, P, R* und *T*) und Ins 6 bzw. 15 (Insertion von 6 nt in *mc4rD, H, N* und *Q* bzw. von 15 nt in *mc4rG, R, K, L, M* und *S*) bezeichnet. In *mc4rK, L, M* und *S* enthält Ins 15 außerdem ein STOP-Codon, was das hypothetische Protein am C-terminalen Ende um 7 Aminosäuren verkürzen würde.

Außerhalb des offenen Leserasters konnte ein weiterer Unterschied festgestellt werden. Drei Kopien (*mc4rG, P* und *R*) besitzen einen unterschiedlichen 3'-untranslatierten Bereich (Abb. 33), der zur Unterscheidung der beiden Gruppen in *mc4r*-1 und *mc4r*-2 führte (Kap. 4.5.3).

Die Sequenzunterschiede sind jedoch nicht einheitlich verschiedenen Kopien zuzuordnen. Einige Kopien sind fast identisch (*mc4rB* und *I*), sie sind vermutlich durch Rekombination zwischen dem X- und Y-Chromosom entstanden (Volff *et al.*, 2003b). Dafür spricht auch ihre identische Position auf den Chromosomen stromabwärts von *Xmrk*. Andere liegen an derselben Position (*mc4rA* und *H* stromaufwärts von *Xmrk*), zeigen jedoch Charakteristika von Kopien, die jeweils auf demselben Chromosom stromabwärts von *Xmrk* liegen (*mc4rA* zu *mc4rC* und *F*/ *mc4rH* zu *mc4rQ*, vgl. Abb. 32 und 33). Dies könnte eine Folge von Genkonversion oder nicht-allelischer homologer Rekombination sein. Bei der Genkonversion können Sequenzabschnitte zwischen Allelen oder nicht-allelischen Kopien

einer Genfamilie übertragen werden, wodurch die tatsächliche phylogenetische Beziehung orthologer Gene maskiert wird (Drouin *et al.*, 1999). Zusätzlich könnten im Fall der *mc4r*-Kopien Inversionen oder Duplikationen nur eines Chromosoms die Reihenfolge und Anzahl zuvor allelischer Kopien verändert haben.

Daraus folgt, dass die in Abbildung 33 gezeigte phylogenetische Beziehung auf der Grundlage der Nukleotidsequenzen keine endgültige Aussage über die Entstehungsgeschichte der einzelnen Kopien und ihre Position auf dem X- oder Y-Chromosom liefern kann. Nur durch Contig-Analysen kann die Position und damit die mögliche Zugehörigkeit zu einem Locus wie *Mdl* oder *P* bestimmt werden, was besonders für die noch nicht eingeordneten Kopien von *mc4r* in Abbildung 32 von Interesse ist.

4.5.3 Expression der zwei Hauptgruppen von *mc4r*

Zur Analyse der Expression von *mc4r* in *X. maculatus* (Stamm WLC1235) wurden die RNA verschiedener Gewebe mittels RT-PCR untersucht und RNA aus Melanomgewebe (Fische des Stamms WLC407), den Zelllinien PSM und A2 (Kap. 2.3) und Embryonen später Stadien (St. 20: WLC1274, St. 21: WLC407) zum Vergleich herangezogen (Abb. 34).

Die Expressionsstudien zeigen eine ubiquitäre Expression der *mc4r*-1-Gruppe. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der verschiedenen *mc4r*-Gene ist es allerdings unmöglich, differenzierende Primerkombinationen für nur eine Kopie zu erstellen. Nur durch Sequenzierung der RT-PCR-Produkte kann die Hypothese getestet werden, dass unterschiedliche Expressionsmuster einzelner Kopien für unterschiedliche Funktionen verantwortlich sind. Erste Analysen von Y. Selz werden später diskutiert.

Die Expression von *mc4r*-2 in Melanomgewebe und PSM-Zellen ist auffällig stark und es konnte außerdem eine im Vergleich zu *mc4r*-1 und Tumorzellen schwächere Expression in Gehirn, Auge, Haut, A2-Zellen und Embryonen des Stadiums 21 (WLC407) nachgewiesen werden (Abb. 34). Dies zeigt, dass *mc4r*-2 einen Tumormarker der Melanome von *Xiphophorus*-Hybriden darstellt. Diese Kopie könnte dem *mc4r*-Gen entsprechen, das durch Northern-Blot-Hybridisierung als überexprimiert in Melanomen und der Melanomzelllinie PSM nachgewiesen wurde (Bernhardt, 2001). Allerdings stehen noch Untersuchungen aus, ob die exprimierte Kopie aus dem Genom von *X. maculatus* oder *X. helleri* stammt. Wie die Kontrollen in Abbildung 34 belegen, existiert *mc4r*-2 auch in *X. helleri.* Eine regulatorische Rolle der differenziellen 3'-UTRs ist noch zu beweisen.

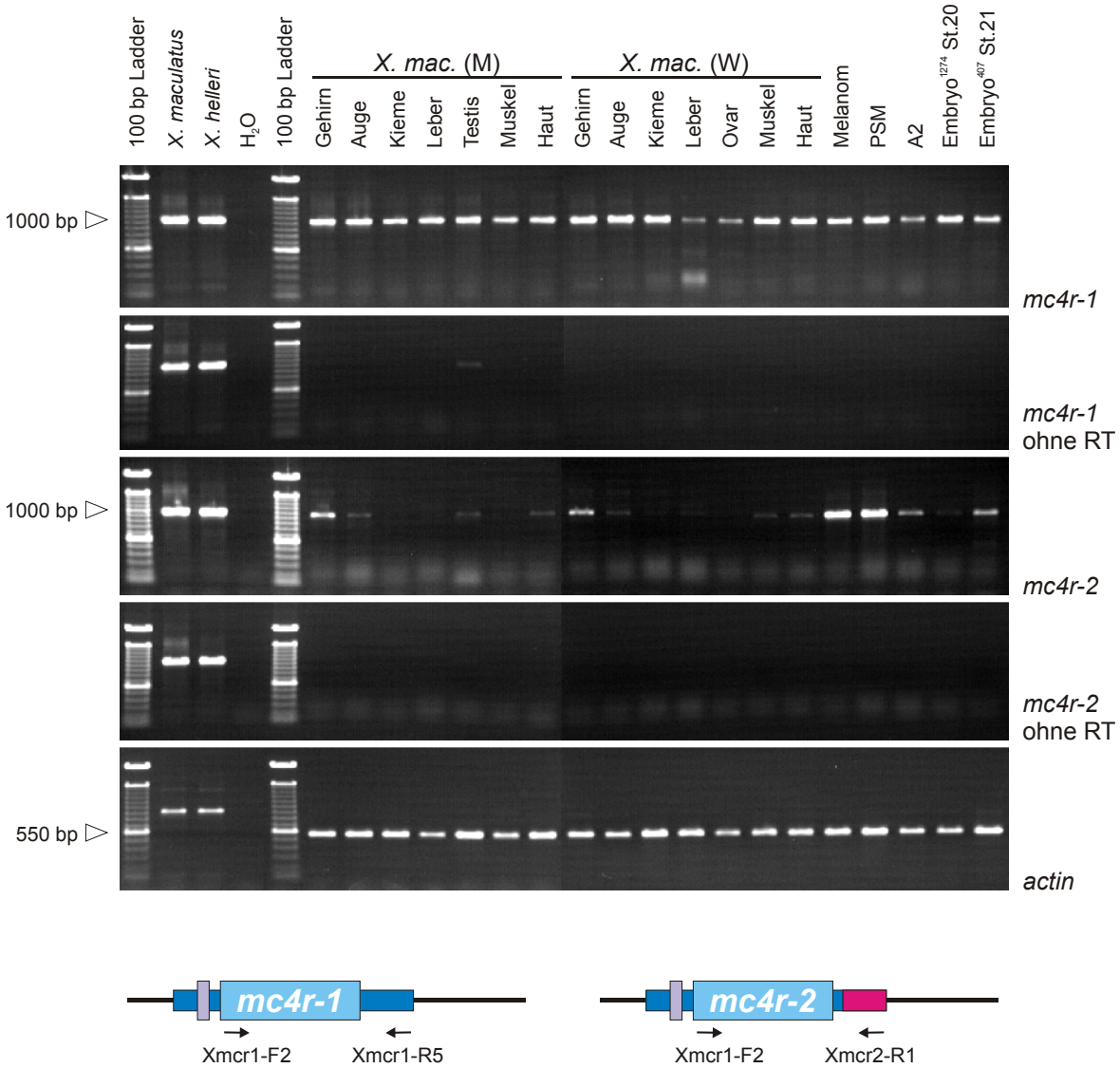

Abbildung 34: Expressionsanalyse mittels RT-PCR. Primerkombinationen: Xmcr1-F2 und Xmcr1-R5 für *mc4r-1*, Xmcr1-F2 und Xmcr2-R1 für *mc4r-2*, Act1 und Act2 für *Aktin*. Kontrollen: 100 ng genomische DNA von *X. maculatus* WLC1274 (M) bzw. 100 ng genomische DNA von *X. helleri* WLC1337 (M). Eingesetzt wurden cDNA aus 20 ng Gesamt-RNA zum Nachweis von *Actin* (PCR-Bedingungen: 1* [2'00'' bei 95°C], 25* [0'45'' bei 95°C/ 0'45'' bei 55 °C/ 1'00'' bei 72°C], 1* [5'00'' bei 72°C], 4°C) und cDNA aus 150 ng Gesamt-RNA zum Nachweis von *mc4r* (PCR-Bedingungen: 1* [2'00'' bei 95°C], 35* [0'45'' bei 95°C/ 0'45'' bei 55 °C/ 1'00'' bei 72°C], 1* [5'00'' bei 72°C], 4°C). Längenstandard: 100 bp Ladder (INVITROGEN™).

4.5.4 Nachweis der Duplikation von *mc4r* in wildtypischen *X. maculatus*

Die beobachtete Plastizität der *Xmrk-SD*-Region von *X. maculatus*, die sich besonders in der Variabilität der Struktur und Expression der *mc4r*-Gene widerspiegelt, könnte ein Prinzip zur Anpassung an sich ändernde Lebensumstände der Population darstellen. So könnten beispielsweise variable Farbmuster Einfluss auf Räuber-Beute-Beziehungen und die Partnerwahl haben und eine schnelle sexuelle Reifung Vorteile in Zeiten des Nahrungsüberfluss bringen. Diese Vermutung setzt voraus, dass zumindest mehrere Kopien von *mc4r* auch in natürlichen Populationen vorhanden sind und die beobachteten Duplikation nicht auf die analysierten Laborstämme beschränkt sind. Abbildung 35 zeigt die Southern-Blot-Hybridisierung genomischer DNA von Wildfängen des Rio Jamapa- und Rio Papaloapan-Systems mit einer Sonde von *mc4r*, die diese wichtige Vorraussetzung zur Interpretation der Rolle von *mc4r*-Genen in *X. maculatus* bestätigen konnte. Es konnten 5-9 Kopien in diesen Individuen nachgewiesen werden, allerdings konnte mit diesem einen Experiment keine mögliche Korrelation von RFLPs einzelner Allele und dem Vorhandensein bestimmter Makromelanophorenmuster abgeleitet werden.

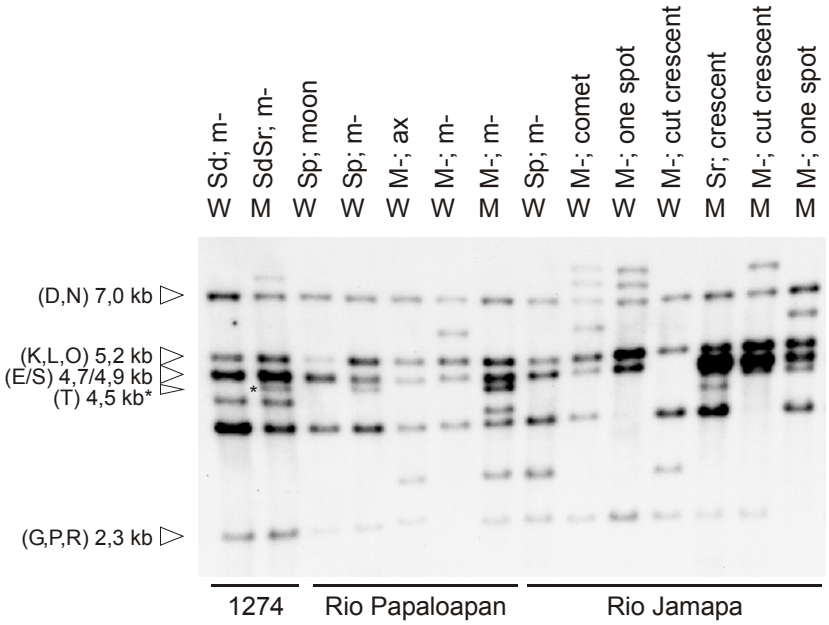

Abbildung 35: Southern-Blot-Analyse genomischer DNA von *X. maculatus* (Wildfänge), verdaut mit *Hin*dIII, hybridisiert mit der Sonde Xmcr (partieller ORF von *mc4r* aus pROST 53). M: Männliche, W: weibliche Individuen. Je ein männliches und weibliches Individuum von *X. maculatus* WLC1274 sind zum Vergleich mit den Wildfängen der angegebenen Flusssysteme analysiert. Die Identifizierung der Makro- (M) und Mikromelanophorenmuster (m) erfolgte durch Prof. Dr. M. Schartl nach Kallman (1975); (M-) und (m-) gibt das Fehlen eines solchen Musters an.

5. Diskussion

5.1 *X. maculatus* als Modellsystem für genetische Faktoren der Melanomentstehung und Geschlechtsbestimmung

Fische gewinnen zunehmend an Bedeutung als Modellorganismen in verschiedenen Bereichen der Biologie. Verschiedene Arten wie der Zebrafisch (*Danio rerio*) und in exponentiell zunehmenden Maße der Medaka (*Oryzias latipes*) erlauben aufgrund ihrer Biologie entwicklungsbiologische Untersuchungen, die Erzeugung und Analyse von Mutanten und die Produktion transgener Linien (Wittbrodt *et al.*, 2002; Shima *et al.*, 2003). Der Japanische Pufferfisch (*Takifugu rubripes*) sowie der Süßwasser-Pufferfisch (*Tetraodon nigroviridis*) sind aufgrund ihrer geringen Genomgröße Ziel von Genomstudien. Funktionelle und evolutionäre Vergleiche mit den Genomen anderer Vertebraten liefern wichtige Daten über den Gen-Gehalt, die Struktur regulatorischer Elemente und syntenische Gruppen (Aparicio, 2000; Aparicio *et al.*, 2002).

Das Fehlen von Informationen über den Mechanismus der Geschlechtsbestimmung der genannten Arten, bzw. die Beschränkung von *Dmrt1* als geschlechtsbestimmendes Gen auf einige Arten des Genus *Oryzias* machen den Platy (*Xiphophorus maculatus*) zu einem wichtigen alternativen Modell der Geschlechtsbestimmung in Fischen (Volff & Schartl, 2001; Kondo *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 2003; Matsuda *et al.*, 2003; Volff *et al.*, 2003a). Zusätzlich stellt *X. maculatus* ein wichtiges Modellsystem für erbliche Krebsentstehung dar (Übersicht in Schartl, 1995). Eine detaillierte genetische Karte der *Xmrk-SD*-Region (Gutbrod & Schartl, 1999) und die Etablierung einer genomischen BAC-Bibliothek (Froschauer *et al.*, 2002) liefern die Basis für eine positionelle Klonierung noch unidentifizierter Gene, die Malignität der Melanome, Pigmentierung, Geschlechtsbestimmung und Pubertät steuern. Funktionelle Analysen der identifizierten Gene können nach der Identifizierung von Kandidatengenen in anderen Modellfischen erfolgen. Es wurde z.B. gezeigt, dass das *WT1*-Gen von *Takifugu rubripes* im Zebrafisch korrekt transkribiert und gespleißt wird und innerhalb eines gewissen Zeitrahmens auch das Expressionsmuster des Zebrafisch-*WT1* zeigt (Miles *et al.*, 2003).

5.1.1 Die Genomgröße von *X. maculatus*

Die Genomgröße von *Xiphophorus maculatus* ist weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion. Nach den Messungen verschiedener Autoren beträgt die haploide Genomgröße von *X. maculatus* zwischen 550 Mb (Schwab, 1982; Wilhelm *et al.*, 2003) und 900 Mb

(Hinegardner & Rosen, 1972; Lamatsch *et al.*, 2000). Da alle Autoren nur geringe Abweichungen in ihren Experimenten feststellten und gegenüber internen Standards offensichtlich gute Werte erzielten, bleiben die Gründe für die große Diskrepanz der veröffentlichten Werte, die fast um den Faktor zwei variieren, unklar. In dieser Arbeit wird die haploide Genomgröße von *X. maculatus* als 900 Mb angenommen (Tab. 7), da die Werte von Hinegardner allgemein als richtig eingeschätzt werden (Prof. Takashi Aoki, persönliche Mitteilung) und im Lehrstuhl durch Dr. Dunja Lamatsch bestätigt werden konnten. Zusätzlich wird diese Annahme durch Analysen der BAC-Bibliothek (Froschauer *et al.*, 2002; diese Arbeit) gestützt, auch wenn die Abschätzung der genomischen Abdeckung über die Anzahl der identifizierten Klone für jedes Allel nicht so präzise sein kann wie die Messungen der zitierten Autoren.

Die Kenntnis der Genomgröße von *X. maculatus* ist für zwei Faktoren dieser Arbeit wichtig. (i) Die Basis dieser Arbeit war die Erstellung von Contigs (Contig: Contiguous set of clones) unter Verwendung genomischer Bibliotheken (Cosmide und BACs), weshalb die Abdeckung des Genoms durch diese Bibliotheken von entscheidender Bedeutung für die Beurteilung der Experimente und den Erfolg der Arbeit war. Bei der Analyse und dem Vergleich von Gonosomen kommt hinzu, dass die genomische Abdeckung, die meist als haploid angegeben wird, doppelt so hoch sein muss wie für die Analyse von Autosomen in heterogametischen Organismen. (ii) Die beobachte niedrige Rekombinationshäufigkeit veranlasst zu Spekulationen über die Größe des zu untersuchenden Bereichs, die auf ca. 1 Mb geschätzt wurde. Obwohl die Gonosomen von *X. maculatus* homomorph sind (Nanda *et al.*, 2000) und in zytologischen Studien keine Befunde über irreguläre Paarung der Chromatiden in der Meiose identifiziert werden konnten (Traut & Winking, 2001), könnte die seltene Rekombination der untersuchten Region auch auf Mechanismen beruhen, die die Rekombinationshäufigkeit einschränken, wie z.B. Inversionen oder Insertionen innerhalb dieses Bereichs.

5.1.2 Erstellung und Analyse geschlechtschromosomaler Cosmid-Contigs

Die Erweiterung der zu Beginn dieser Arbeit etablierten Cosmid-Contigs (Tab. 3 und Abb. 5 und 7) erwies sich als äußerst schwierig. Die Abdeckung erreichte nur ca. 50 kb stromaufwärts von *Xmrk* (Y Allel), 60 kb stromabwärts von *Xmrk* (X oder Y Allel) und 100 kb stromaufwärts von *egfrb* (X oder Y-Allel). Der Hauptgrund dafür ist die geringe Abdeckung der Cosmid-Bibliothek, die nur 2,7 Genom-Äquivalenten entspricht (Burgtorf *et al.*, 1998) und somit nur 1,3 Mal jedes Gonosom abdeckt. Trotzdem bieten Cosmide den

technischen Vorteil, dass die geringe Insertgröße schneller zu analysieren ist als die der BACs.

Die Analyse der *Xmrk* überspannenden Cosmid-Contigs führte zur Entdeckung einer Fülle von Retroelementen und anderen repetitiven Sequenzen, die innerhalb von 33 kb stromabwärts von *Xmrk* mehr als 80% der analysierten Sequenz ausmachen (Abb. 6, Volff *et al.*, 2003b). Dazu gehören Retrotransposons ohne lange terminierende Wiederholungssequenzen [non-long terminal repeat (LTR) retrotransposons] wie *Rex1*, *Rex3* und *Rex6* (Volff *et al.*, 1999, 2000, 2001b & 2001c) ebenso wie die LTR-Retrotransposons der *Ty3/Gypsy* Klasse *Rex7*, *Rex8* und *Jule* (Volff *et al.*, 2001a & 2003b). Zusätzlich existieren stromaufwärts von *Xmrk* mehrere nicht-autonome *XIR*-Elemente (Abb. 5). Roushdy *et al.* beschreiben die wiederholte Sequenz *XIR* als LTR eines Retrovirus von *Xiphophorus*. Seine Sequenz enthält Promotorsequenzen und Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NFkB, was die Expression von Reportergenen nach UV-B-Bestrahlung induzieren konnte (Roushdy *et al.*, 1999). *XIR* ist in etwa 500 Kopien pro haploidem Genom von *X. maculatus* enthalten und akkumuliert vorzugsweise im telomerischen Bereich des Y-Chromosoms (Nanda *et al.*, 2000).

5.1.3 Erstellung und Analyse geschlechtschromosomaler BAC-Contigs

Die geringe genomische Abdeckung der Cosmid-Bibliothek und die hohe Dichte repetitiver Sequenzen führte dazu, dass das Chromosomen-Walking nicht weiter betrieben werden konnte. So besteht z.B. Cosmid 097 D18 stromaufwärts von *Xmrk* praktisch nur aus repetitiven Sequenzen, die zum Teil mehrere hundert Mal im Genom von *X. maculatus* vorkommen wie *XIR* und *Rex3*, und es konnte nur ein Cosmid (005 F06) stromabwärts von *Xmrk* identifiziert werden.

In Zusammenarbeit mit Prof. Takashi Aoki und Dr. Takayuki Katagiri (Tokyo University of Fisheries) und Prof. Nobuyoshi Shimizu und Dr. Shuichi Asakawa (Keio School of Medicine, Tokyo) wurde deshalb eine BAC-Bibliothek erstellt (Froschauer *et al.*, 2002), deren höhere genomische Abdeckung und Insertgröße (Tab. 7), die die identifizierten Anhäufungen repetitiver Elemente überspannen kann, diese Probleme löste.

Ausgehend von gonosomalen Markern wie dem Onkogen *Xmrk*, dem Proto-Onkogen *egfrb* und dem neu identifizierten, Y-spezifischen *ps-criptY* konnten Contigs erstellt werden, die jeweils über 1 Mb der Gonosomen von *X. maculatus* abdecken (800 kb von *Xmrk* (X), 500 kb von *Xmrk* (Y), 700 kb von *egfrb* (X und Y) und 500 kb von *ps-criptY*).

Tabelle 7: Übersicht über die genomischen Bibliotheken von *X. maculatus*. * Die haploide Genomgröße wird als 900 Mb angenommen, Genom-Äquivalente entsprechen der haploiden Abdeckung. ** In Bezug auf die Gonosomen (X, Y) entspricht die diploide Abdeckung der Bibliothek der gonosomalen Abdeckung.

	Cosmid-Bibliothek	BAC-Bibliothek
Referenz	Burgtorf *et al.* (1998)	Froschauer *et al.* (2002) und unveröffentlichte Daten
Vektor	Lawrist7	pBAC-*lac*
Durchschnittliche Insertgröße	45 kb	165 kb
Anzahl der Klone	55.296	49.920
Insertgröße (gesamt)	2,48 Gb	8,24 Gb
Genom-Äquivalente*	2,7	9,2
Diploide Abdeckung**	1,3 x	4,6 x

Eine Lücke auf dem X- und Y-Chromosom stromabwärts von *Xmrk* konnte in dieser Arbeit nicht überbrückt werden, da die jeweiligen *mc4r*-enthaltenden Endfragmente in zwei Durchmusterungen stark unterrepräsentiert waren und keine überlappenden BAC-Klone identifiziert werden konnten (Abb. 13). Dieses Problem wurde auch bei der Nutzung anderer BAC-Bibliotheken beobachtet (Dr. T. Katagiri, persönliche Mitteilung). Es könnte sein, dass eine statistische Häufung von *Hin*dIII-Restriktionsschnittstellen zu einer Unterrepräsentation bestimmter Bereiche des Genoms führt, da die entstehenden Fragmente während der Größenselektion des Inserts als zu klein aussortiert wurden, bzw. im umgekehrten Fall - bei einem statistischen Mangel solcher Schnittstellen - als zu groß.
Allerdings konnte Christina Schultheis das Chromosomen-Walking auf dem X-Chromosom fortsetzen und ein Cosmid identifizieren, das den kritischen Klon BAC B33 auf dem X-Chromosom überlappt (Schultheis, 2003). Für das Y-Chromosom konnte bisher kein überlappender Klon (BAC oder Cosmid) verifiziert werden, allerdings enthält BAC B16 nach Restriktionsanalyse die Y-chromosomale Kopie von *mc4r,* die zum Ende dieser Arbeit das Endfragment des *Xmrk*-Contigs auf dem Y-Chromosom darstellt. BAC B16 war aufgrund seines ungewöhnlich kleinen Inserts (50 kb) zunächst von weiteren Analysen ausgeschlossen worden, da nicht klar war, ob er der Größenselektion der DNA entgangen ist oder eventuell nach der Klonierung des Inserts eine Deletion stattgefunden hat und er somit nicht einem Abschnitt des Genoms von *X. maculatus* entspricht. Obwohl die Möglichkeit besteht, dass dieser Klon in irgendeiner Weise

rekombinant ist, d.h. nicht vollständig einem genomischen Abschnitt von *X. maculatus* entspricht, kann er trotzdem helfen, diese Lücke mit entsprechenden begleitenden Analysen zu schließen. Eine hypothetische Anordnung der Contigs und BAC-Klone, die noch bestätigt werden muss, ist in Abb. 36 dargestellt.

Die Analyse der BAC-Contigs konnte bestätigen, dass die hohe Anzahl repetitiver Elemente nur um *Xmrk* zu finden ist und bis auf *Rex3* und *Jule* keines innerhalb von 200 kb um *egfrb* vorkommt (Volff *et al.*, 2003b). Interessanterweise konnten ausgedehnte Anhäufungen von *XIR*-Elementen auch um *ps-criptY* identifiziert werden (Abb. 20 und 21), in einer Region also, die für das Y-Chromosom spezifisch ist. Zusammen mit der Degeneration der meisten Gene zu Pseudogenen, wie es z.B. die Kopie *mc4rQ,* das Pseudogen *ps-msh2* und *ps-criptY* zeigen, erinnert diese Situation an Mechanismen zur Degeneration von Chromosomen, die aufgrund der Anhäufung repetitiver Elemente und chromosomaler Umlagerungen in nicht-rekombinierenden Regionen zur Degeneration des Y-Chromosoms führen (Lahn & Page, 1999; Charlesworth & Charlesworth, 2000; Graves, 2002; Bachtrog, 2003) und an die Struktur der Y-spezifischen Region des Medaka, die nur 250 kb groß ist und außer *dmrt1bY* kein intaktes Gen der ursprünglich duplizierten Region mehr enthält (Nanda *et al.*, 2002).

Allerdings sind die meisten der identifizierten Pseudogene in *X. maculatus* auf beiden Chromosomen (X und Y) zu finden, so dass nicht von einer einseitigen Degeneration des Y-Chromosoms ausgegangen werden kann. Die Sequenzähnlichkeiten stromabwärts von *Xmrk* sprechen vielmehr für eine erst vor kurzem stattgefundene Rekombination zwischen dem X- und Y-Chromosom von *X. maculatus* (Volff *et al.*, 2003b).

Außerdem ist die Anhäufung repetitiver Elemente in *X. maculatus* nicht spezifisch für die bisher analysierten Y-chromosomalen Abschnitte, denn ähnlich große Anhäufungen des *XIR*-Elements sind auf beiden Gonosomen innerhalb der *Xmrk*-Contigs zu beobachten (Abb. 13). Zusätzlich wurde auch eine noch nicht näher charakterisierte, oft wiederholte Sequenz (Endprobe H75-FOR, C. Schultheis, persönliche Mitteilung) im *Xmrk*-Contig und *ps-criptY*-Contig gefunden. Obwohl zwei Anhäufungen des *XIR*-Elements im *ps-criptY*-Contig identifiziert werden konnten, stimmen diese wahrscheinlich nicht mit der für das Y-Chromosom beschriebenen subtelomerischen Anhäufung überein. Es wurde zumindest eine ähnlich große *XIR*-Anhäufung auch stromabwärts von *Xmrk* auf dem X-Chromosom identifiziert (Abb. 13), aber die Intensität der Hybridisierung von pROST27 (*XIR*) war in der FISH-Analyse so hoch, dass spezifisch das Y-Chromosom gefärbt wurde (Nanda *et al.*, 2000).

5.2 Duplikationsereignisse in der *Xmrk-SD*-Region und genetische Instabilität

Die Duplikation von *egfrb*, die zum Onkogen *Xmrk* führte, ist nicht die einzige in dieser Region. Es konnte die Duplikationen von *cript* vermutlich von einem Autosom in die stromabwärts von *Xmrk* liegenden Regionen beider Gonosomen und eine Y-spezifische Kopie identifiziert werden (Abb. 25 und 28). Tandemartige Duplikationen der *mc4r*-Gene, ebenso wie des Pseudogens *ps-rnase3l* konnten in verschiedenen Contigs nachgewiesen werden (Abb. 32). Ähnlich wie die meisten der identifizierten Retroelemente und *XIR* sind diese Ereignisse jedoch beschränkt auf die Region um *Xmrk* und nicht um *egfrb* zu finden.

Dies veranlasst zu Spekulationen über die genetische Stabilität dieser Region. Es existieren nicht nur eine Fülle von Pigmentmustern in natürlichen Populationen von *Xiphophorus maculatus*, ebenso variabel scheinen die Geschlechtsbestimmungssysteme und die Steuerung der sexuellen Reife zu sein. Zudem ist das Onkogen offensichtlich nicht stabil, wie der komplette Verlust des Onkogens in mehreren Arten und auch die Isolation mehrerer Mutanten in Labor zeigte (Weis & Schartl, 1998; Schartl *et al.*, 1999). Das Onkogen wurde in diesen Mutanten verloren oder durch die Insertion eines Retrotransposons (*TX-1*) inaktiviert, ein Vorgang, wie er auch für die *cript*-Pseudogene durch die Insertion von *Rex4* nachgewiesen werden konnte (Abb. 26).

Es könnte also sein, dass die *Xmrk-SD*-Region von *X. maculatus* regelmäßig von Ereignissen wie Duplikationen, Insertionen, Deletionen und Transpositionen betroffen ist. Die hohe Dichte repetitiver Element begünstigt wahrscheinlich nicht-allelische homologe Rekombination. Zusätzlich können Gene dadurch in einen anderen transkriptionellen Kontext gelangen oder die Elemente beeinflussen direkt die Expression (Roushdy *et al.*, 1999).

Speziell im Hinblick auf die beobachteten Duplikationen und Deletionen gewinnt das Modell eines Dosis-sensitiven Gens verantwortlich für die Geschlechtsbestimmung von *X. maculatus* an Bedeutung (Volff & Schartl, 2001). Obwohl noch kein geschlechts-bestimmendes Gen identifiziert wurde, sind die meisten potentiellen Gene, die im *Xmrk*- und *ps-criptY*-Contig durch Sequenzanalyse identifiziert wurden, zumindest auf den Geschlechtschromosomen dupliziert und einige dieser potentiellen Gene sind nochmals in der Y-spezifischen Region um *ps-criptY* in einer zusätzlichen Kopie vorhanden (Schultheis, 2003; Q. Zhou, persönliche Mitteilung). Dazu zählen *TnH2* (Zinkfinger-Motiv), ein *Protease*-Gen, ein *Helicase*-Gen und *Fredi* (Helix-turn-Helix Motiv). *Fredi* ist in mehreren Kopien vorhanden und zeigt (wie *ps-criptY*) Expression in Testis (Selz, 2003).

Allerdings ist noch unklar, welche der Kopien exprimiert wird. Erst weitere, detaillierte Analysen der genomischen Organisation und funktionelle Studien können Erkenntnisse über die mögliche Rolle dieser Gen-Kandidaten in der Geschlechts-bestimmung bringen.
Die Pseudogene *ps-vit1*, *ps-msh2* und *ps-cript* auf den Gonosomen von *X. maculatus* weisen auf eine konservierte Syntenie zum menschlichen Chromosom 2p hin. Zusätzlich konnte Christina Schultheis ein mögliches Acetylcholinrezeptor-Gen (*Chrnd*) nachweisen, das zusammen mit dem Gen *TMEFF* (Uchida *et al.*, 1999), das stromaufwärts von *egfrb* liegt (Dr. J.-N. Volff und C. Körting, persönliche Mitteilung) auf 2q32-34 des Menschen lokalisiert ist. Es gibt zwei beschriebene Fälle von Deletionen in dieser Region, 46,XY, del(2)(q32qter) und 46,XY, del(2)(q31.1q31.3), die zu Geschlechtsumkehr der Patienten führten und frühere Befunde stützen, die ein Gen in diesem Bereich des Chromosoms lokalisieren, das für die Entwicklung des Urogenitaltrakts wichtig ist (Fryssira, 1998; Slavotinek *et al.*, 1999). Das verantwortliche Gen im Menschen und seine exakte Position ist noch nicht geklärt, eventuell könnte auch die Deletion regulatorischer Elemente für die beobachteten Phänotypen verantwortlich sein. Folglich könnte in *X. maculatus* ebenso ein orthologes, an der Geschlechtsbestimmung beteiligtes Gen vorhanden sein.
In diesem Zusammenhang ist noch anzumerken, dass erste Hinweise vorliegen, die die Y-spezifische Region um *ps-criptY* auf ca. 500 kb eingrenzen. (i) Die Ähnlichkeit von *mc4rG* auf dem X- und *mc4rP* auf dem Y-Chromosom (Abb.33), die beide mit *TnH7* gekoppelt sind (Abb. 36), könnte auf den letzten gemeinsamen Bereich vor der Y-spezifischen Region um *ps-criptY* hinweisen, und (ii) das potentielle Gen *Chrnd* (Abb. 36) und die Anhäufung der repetitiven Sequenz H75-FOR jenseits von *mc4rR* (Q. Zhou und C. Schultheis, unveröffentlicht), das denselben 3'-untranslatierten Bereich wie *mc4rG* und *P* besitzt, könnte das Ende der Y-spezifischen Region darstellen.

5.3 Positionierung von neuen molekularen Markern

Die Analyse molekularer Marker wie *ps-criptY* konnte zur Kartierung der Gonosomen von *X. maculatus* beitragen. Besonders die Analyse von Individuen mit rekombinanten Geschlechtschromosomen des Stammes MAD/ WAD konnte belegen, dass die analysierten Marker der *egfrb*-Region noch außerhalb der geschlechtsbestimmenden Region liegen. Der Stamm MAD/ WAD besitzt das normale Farbmuster und die nach dem Geschlecht zu erwartendenden *Xmrk*-Onkogene (X- und Y-Allel in männlichen, X-Allel in weiblichen Individuen), aber es kommen männliche Individuen vor, die nur das ursprünglich Y-

chromosomale Allel von *egfrb* tragen und weibliche, die beide Allele tragen. Daraus lässt sich schließen, dass sich das rekombinante Chromosom wie ein X-Chromosom verhält (Weibchen XX oder X*X, Männchen XY oder X*Y, vgl. Abb. 17). Die Analyse mehrerer Generationen von Nachkommen dieser Fische zeigte allerdings wieder keine Rekombination dieses Chromosoms (Dr. J.-N. Volff, persönliche Mitteilung), so dass von einem einzigen Rekombinationsereignis ausgegangen werden kann und dieses Chromosom so stabil wie die ursprünglichen weitergegeben wird.

Fische dieses Genotyps wurden in die Untersuchungen einbezogen (Abb. 16), allerdings liegt der Bruchpunkt der Gonosomen außerhalb der bisher erstellten BAC-Contigs. Bisher konnte stromaufwärts von *egfrb* kein polymorpher Marker identifiziert werden, stromabwärts jedoch mehrere (Kap 4.2.5). Dies führt zu der Annahme, dass *egfrb* am Ende der pseudoautosomalen Region der Gonosomen liegt. Die polymorphen Marker stromabwärts von *egfrb* könnten also auf verminderte Rekombination in diesem Bereich hinweisen, wie es in Richtung des geschlechtsbestimmenden Locus *SD* zu erwarten ist. In Zukunft soll das Chromosomen-Walking stromabwärts von *egfrb* mit Vorrang fortgesetzt werden, falls nicht gegenteilige Ergebnisse aus FISH-Experimenten diese Vermutung widerlegen.

5.4 Abschätzung des absoluten genomischen Abstands von *Xmrk* und *egfrb*

Zur Abschätzung des absoluten Abstands zwischen Onkogen und Proto-Onkogen wurde eine FISH (Fluorescence *in situ* Hybridisation)-Analyse von Chromosomen der Metaphase mit Sonden von *Xmrk* und *erfrb* durchgeführt (Kap. 4.2.). Die Signale lagen wie erwartet subtelomerisch auf einem Chromosomenpaar und sehr dicht beieinander, waren jedoch noch separat (Abb. 18).

Analysen menschlicher Metaphase-Chromosomen mit Sonden bekannter Loci konnten für diese Methode zeigen, dass bei einem Abstand größer als 3 Mb die Reihenfolge der Loci sicher aufgelöst werden kann, bei einem Abstand größer als 1 Mb die Reihenfolge noch durch das Auszählen vieler Chromosomen statistisch ermittelt werden kann und unter 1 Mb Abstand die Reihenfolge der Loci aufgrund der Kondensation der DNA nicht mehr aufzulösen ist (Trask, 1991). Außerdem wurde gezeigt, dass Signale Telomer-spezifischer Sonden proximal zum sichtbaren Ende des Metaphasen-Chromosoms erscheinen, was eine umgekehrte Anordnung telomerischer Sequenzen vortäuschen kann (Moyzis *et al.*, 1988).

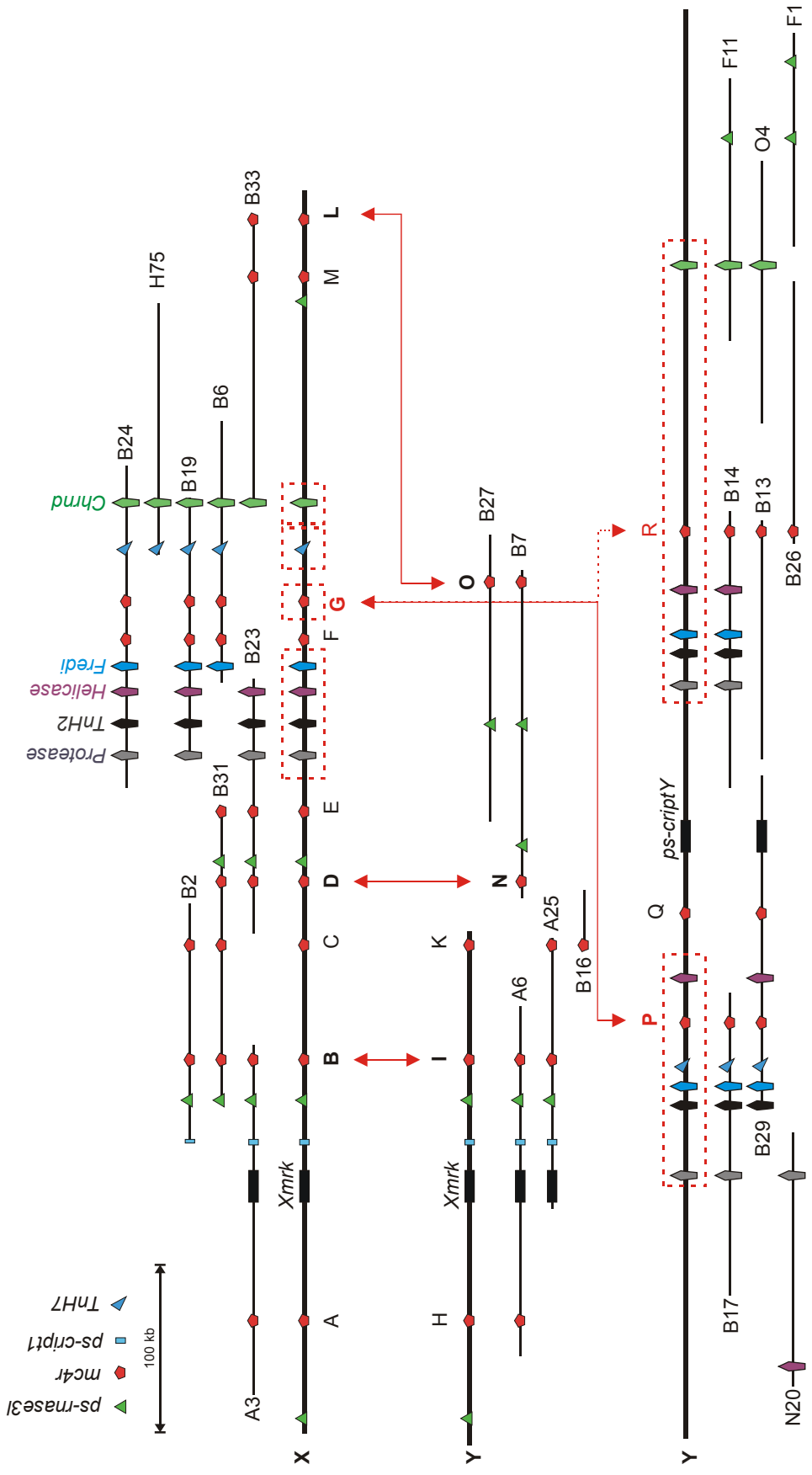

Abbildung 36: Anordnung von Genen und Pseudogenen in der *Xmrk*- und *ps-cript Y-Region*. Dickere Linien repräsentieren das X- bzw. Y-Chromosom, repräsentative BAC-Klone sind zum besseren Vergleich mit den Abbildungen 13 und 21 angegeben. Die Legende zeigt chromosomale Marker, die in dieser Arbeit analysiert wurden, die Bezeichnung der *mc4r*-Kopien ist angegeben (*mc4r-2* in rot), rote Doppelpfeile verbinden phylogenetisch eng verwandte Kopien. Gestreckte Pentagone repräsentieren Marker aus Schultheis (2003). Rote Kästen umrahmen Gruppen von chromosomalen Markern, die auf eine Duplikation X-chromosomaler Abschnitte auf dem Y-Chromosom hinweisen (vgl. Text).

Überträgt man diese Ergebnisse auf die Experimente dieser Arbeit, müsste der Abstand zwischen *Xmrk* und *egfrb* etwa eine Megabase oder mehr betragen. Für eine genauere Abschätzung der Distanz sind weitere Experimente möglich: Auf sog. Halo-Präparationen von Interphase-Kernen (Vogelstein *et al.*, 1980; Wiegant *et al.*, 1992) können durch hoch-auflösende FISH-Techniken Abstände von 1-400 kb gemessen werden, geeignete Sonden vorausgesetzt (Florijn *et al.*, 1995). Als Sonden kommen dabei noch zu klonierende, nicht repetitive Sequenzen der Contigs in Frage, zum Beispiel der ORF des Faktors CIDE-A aus BAC A10 (Kap. 4.2.5). Die Identifizierung solcher Sonden stromaufwärts von *egfrb* könnten auch die Orientierung des *egfrb*-Contigs zeigen, was vor allem in Hinblick auf die Richtung des Chromosomen-Walkings und schnelle Identifizierung des Bruchpunkts des X*-Chromosoms im Stamm WLC1235 (MAD/ WAD)wünschenswert ist.

5.5 *Dmrt1* als ursprüngliches Gen der Geschlechtsbestimmung in Vertebraten?

Die Entdeckung von *dmrt1bY* im Medaka veranlasst zu Spekulationen, ob *Dmrt*-Gene ursprüngliche Gene der männlichen Geschlechtsbestimmung darstellen (Zarkower, 2001; Koopman & Loffler, 2003). *Dmrt* (*doublesex* and *Mab-3* related transcription factors)-Gene sind konserviert innerhalb ihrer funktionellen, DNA-bindenden DM-Domäne. Obwohl die Geschlechtsbestimmungskaskaden von *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* sehr verschieden sind, spielen die namensgebenden Faktoren DSX (in der für Männchen spezifischen Spleiß-Form Dsx^M) und Mab-3, die strukturell und funktionell homolog sind, auch in Invertebraten eine tragende Rolle. Dies würde bedeuten, dass *Dmrt1* seit einer Milliarde Jahren eine konservierte Funktion ausübt, auch wenn die Regulation seiner Expression (oder Spleiß-Variante in *D. melanogaster*) im Laufe der Evolution von verschiedenen Faktoren übernommen wurde (Graves & Shetty, 2001).

Interessanterweise ist das menschliche *DMRT1* in einer Region des Chromosoms 9p lokalisiert, deren Deletion zu Geschlechtsumkehr in 46,XY Patienten führt (Raymond *et al.*, 1998; Raymond *et al.*, 1999; Ottolenghi *et al.*, 2000). Außerdem enthält eine zum menschlichen Chromosom 9 syntenische Region des Z-Chromosoms der Vögel (ZZ, ZW-Geschlechtsbestimmung, männliche Homogametie) ebenfalls das orthologe *Dmrt1* (Nanda *et al.*, 1999). Obwohl die Mechanismen zur Regulation der Expression geschlechts-chromosomaler Gene in Vögeln und Säugern unterschiedlich sind, kann ein Dosiseffekt von *Dmrt1* als geschlechtsbestimmender Mechanismus nicht ausgeschlossen werden (Ellegren, 2002). Wie Expressionsstudien an Embryonen des Huhns belegen, korreliert die

Differenzierung der Hoden mit erhöhter *Dmrt1*-Expression. Allerdings kann die Expression von *Dmrt1* nach Hemmung der Aromatase in genotypisch weiblichen Embryos (induzierte ZW-Geschlechtsumkehr) das gleiche Level erreichen wie in ZZ-Embryos, was zumindest einen zusätzlichen Aktivierungsmechanismus von Dmrt1 während der Geschlechtsbestimmung vermuten lässt (Smith *et al.*, 2003).

Die Entdeckung von *Dmrt1bY* im Medaka zeigt, wie durch die Analyse verschiedener Modellorganismen evolutionäre Aspekte der Geschlechtsbestimmung aufgedeckt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die genomische Struktur der Gene *Dmrt2* und *Dmrt4* von *X. maculatus* aufgeklärt werden und BAC-Klone isoliert werden, die weitere *Dmrt*-Gene enthalten, darunter auch *Dmrt1*. Es konnte gezeigt werden, dass diese BAC-Klone nicht innerhalb der bisher identifizierten gonosomalen Contigs liegen, allerdings schließt dieses Ergebnis eine gonosomale Lokalisierung eines *Dmrt*-Gens in einer Lücke der erstellten Contigs nicht aus.

Weiterführende Untersuchungen konnten zeigen, dass die Duplikation, die zum *Dmrt1bY* im Medaka führte, im Platy nicht stattgefunden hat. Allerdings kann ein anderes Duplikationsereignis, das zu einem zusätzlichen *Dmrt*-Gen in *X. maculatus* führte, bisher nicht endgültig ausgeschlossen werden (Veith *et al.*, 2003).

Die Analyse der vielfältigen Geschlechtsbestimmungssysteme innerhalb der Fische kann somit zum Verständnis der Evolution und des Mechanismus der Geschlechtsbestimmung in allen Vertebraten beitragen.

5.6 Analyse von *cript, ps-criptY* und *ps-cript1*

Nach der Identifikation des Pseudogens *ps-cript1* stromabwärts von *Xmrk* wurden zwei weitere Kopien dieses Gens in Genom von *X. maculatus* identifiziert und nach Subklonierung der entsprechenden Fragmente sequenziert (Kap. 4.4). Es konnte gezeigt werden, dass die Kopie mit vollständigem offenen Leseraster autosomal lokalisiert ist (Abb. 28) und die Y-chromosomale Kopie zerstört ist. Die Funktion von Cript-Proteinen (Cysteine-rich interactor of PDZ3) ist noch unzureichend untersucht. Cript wurde isoliert aufgrund seiner Interaktion mit der dritten PDZ-Domäne des synaptischen Proteins Psd-95 und ist vermutlich verantwortlich für die Lokalisierung von PSD-95 zum Cytoskelett in Synapsen und bindet direkt oder vermittelt indirekt die Bindung von PSD-95 and Tubulin (Niethammer *et al.*, 1998; Passafaro *et al.*, 1999). Interessanterweise sind Cript-Proteine hochkonserviert, so sind die Proteinsequenzen von Mensch und Maus 99% identisch und

die von Mensch und der Pflanze *Arabidopsis thaliana* noch 68% (Daten der OMIM™ Datenbank der NCBI).

Sowohl *ps-criptY* als auch *ps-cript1* wurden im dritten Exon durch *Rex4,* einen endogenen Retrovirus, unterbrochen. In *ps-criptY* ist nur der LTR von *Rex4* vorhanden (die Integrationsstelle 5'-ACATCT-3' im dritten Exon wurde dupliziert), in *ps-cript1* ist *Rex4* als nicht funktionelle Kopie vorhanden, da das offene Leseraster Verschiebungen und STOP-Codons aufweist. Während die in allen Kopien vorhandenen Exons 100% identisch sind, beträgt die Identität von *cript* zu *ps-criptY* noch 98,1%. Die genomische Sequenz von *ps-criptY* und *ps-cript1* ist zu 98,6% identisch im Bereich von 674 nt stromaufwärts des 1. Exons bis inklusive des in *ps-criptY* enthaltenen LTRs (Abb. 26). Der Vergleich des ersten und zweiten LTR von *ps-cript1* ergab nur eine Identität von 95,8% und zeigte außerdem unterschiedliche Integrationsstellen des ersten (5'-ACATCT-3') und zweiten LTR (5'-ATAATG-3').

Aus diesen strukturellen Merkmalen wurde geschlossen, dass die Integration von *Rex4* in ein dupliziertes *cript*-Gen höchstwahrscheinlich ein einmaliger Vorgang war und erst anschließend die zweite Duplikation stattfand. Wahrscheinlich durch homologe Rekombination zwischen *Rex4*-Sequenzen entstand die heutigen Struktur von *ps-criptY* und durch Rekombination nicht-allelischer *Rex4*-Kopien *ps-cript1*. Es bleibt allerdings unklar, ob *ps-cript1* durch nicht homologe Rekombination zweier nicht allelischer *Rex4*-Kopien dupliziert wurde, oder ob das Ereignis, das alle homologen Sequenzen stromabwärts von *Rex4* deletierte, erst nach der zweiten Duplikation stattfand. Southern-Blot-Hybridisierung von genomischer DNA mit einer Sonde des genomischen Bereichs von Exon 4 bis Exon 5 gab keinen Hinweis auf die Erhaltung dieser Sequenzen im Genom von *X. maculatus*.

Die Expression von *cript* (Abb. 31) ist in allen Geweben zu detektieren, wie aus dem Expressionsmuster der Maus zu erwarten war (Niethammer *et al.*, 1998). Besonders auffällig ist die Expression in Gehirn, Testis und Melanomgewebe zumindest einer der Kopien *ps-criptY* oder *ps-cript1*, die wahrscheinlich Pseudogene darstellen. (Die bisher eingesetzte Primerkombination unterscheidet nicht zwischen diesen beiden Kopien, berücksichtigt aber mögliche alternative Exons, siehe Kap. 4.4.4). Trotzdem ist eine schwache Transkription im Gehirn und Auge zu beobachten, was auf funktionell reduzierten, regulatorischen Elementen stromaufwärts der Kopien beruhen könnte, da *cript* spezifisch und differenziert in verschiedenen Bereichen des Gehirns der Maus exprimiert wird. Es entstehen hauptsächlich Transkripte, die ihrer Größe nach der genomischen

Struktur von *ps-criptY* und *ps-cript1* entsprechen, also keine funktionelle gespleißte mRNA darstellen. Ähnliches ist im Tumorgewebe zu beobachten, allerdings könnten hier auch Veränderungen der Chromatinstruktur die Transkription verursachen, was durch die Nähe von *ps-cript1* zu *Xmrk* bedingt sein könnte. Die starke Expression in Testis hingegen zeigt auch eine kleinere Bande, die das Produkt eines noch nicht charakterisierten Spleißvorgangs von *ps-cript1* oder *ps-criptY* sein könnte. Dieses Produkt könnte allerdings auch in den anderen Geweben vorhanden sein und nur aufgrund der schwachen Expression nicht detektiert worden sein.

Es wäre erstaunlich, wenn die Expression von *ps-criptY* Einfluss auf die Geschlechtsentwicklung von *X. maculatus* hat, trotzdem sollen noch weitere Experimente folgen: (i) Expressionsstudien, die *ps-criptY* und *ps-cript1* aufgrund differentieller Primer unterscheiden und (ii) Sequenzierung des mutmaßlich gespleißten Produkts soll klären, ob dieses Transkript ein verändertes Protein kodiert. Sollte dies Hinweise auf die Expression einer mRNA liefern, die für ein verändertes Protein codiert, können quantitative und *in situ* Expressionsanalysen zur Interpretation einer Funktion folgen.

5.7 Melanocortin-Rezeptorgene: Kandidaten für *Mdl* und *P*?

Die tandemartige Duplikation der Melanocortin-Rezeptorgene (*mc4r*) in *X. maculatus* wirft die Frage nach der physiologischen Rolle so vieler ähnlicher Rezeptoren auf und ob diese einen oder mehrere der noch unbekannten Loci der *Xmrk-SD*-Region kodieren. Zumindest einige der identifizierten *mc4r*-Gene in *X. maculatus* könnten an der Pigmentierung oder dem Energiehaushalt beteiligt sein, da die Funktion von Melanocortin-Rezeptoren neben ihrer Affinität zu Liganden und ihrer Signaltransduktion auch (oder besonders) auf ihrer differentiellen Expression beruht (Wikberg *et al.*, 2000). Die Loci für rot-gelbe Pigmentierung (*RY*) und den Zeitpunkt der sexuellen Reife (*P*) liegen in der *Xmrk-SD*-Region von *X. maculatus.* Eine Rolle von *mc4r* in der Pigmentierung wird unterstützt von Studien am Goldfisch, in denen differenzielle Expression von *mc4r* in den dorsalen, rot gefärbten Hautpartien nachgewiesen wurde aber nicht in den weißen, ventralen Hautpartien (Cerda-Reverter *et al.*, 2003). Außerdem ist der Zeitpunkt der sexuellen Reife an die Körpermasse gekoppelt. Die hohe Variabilität dieser Loci in *X. maculatus*, allein neun Allele wurden für *P* beschrieben, korreliert wiederum mit der beobachteten Plastizität dieses Bereichs des Genoms. Es könnten also einer oder mehrere der MC4-Rezeptoren in den Energiehaushalt und andere in die Pigmentierung involviert sein. Erste Analysen von Wildfängen bestätigen die Anwesenheit multipler Kopien von *mc4r* in allen getesteten

Individuen (Abb. 35). Dies könnte ein Hinweis drauf sein, dass die Duplikation dieses Gens und die damit erworbene Variabilität von möglicherweise mehreren Eigenschaften Vorteile für die Population beinhaltet.

Der Locus *Mdl*, der unmittelbar stromaufwärts von *Xmrk* kartiert wurde, könnte ebenfalls durch einen Melanocortin-Rezeptor kodiert werden. Allerdings sind die stromaufwärts von *Xmrk* liegenden Kopien *mc4rA* und *mc4rH* (Abb. 36) durch ein STOP-Codon unterbrochen, so dass ihrem konzeptionellen Translationsprodukt die letzten drei Transmembrandomänen und der intrazelluläre Teil des carboxy-terminalen Endes fehlen. Es ist denkbar, dass diese Proteine noch Liganden binden, aber dieses Signal nicht weiterleiten können und dadurch in dominant-negativer Art in die Signaltransduktion der Zelle eingreifen könnten. Allerdings wurde für den menschlichen MC4-R gezeigt, dass die Aminosäuren des carboxyterminalen Teils von MC4-R von entscheidender Bedeutung für den Transport des Proteins in die äußere Membran sind (Ho & MacKenzie, 1999). Somit ist es unwahrscheinlich, dass diese *mc4r*-Gene funktionelle Rezeptoren codieren.

Für den menschlichen MC4-Rezeptor wurde gezeigt, dass die Transmembrandomänen (TM) 3, 5 und 6 an der Bindung von alpha-MSH beteiligt sind, aber TM3 und TM4 an der Bindung von AGRP (Yang *et al.*, 2003). Zusätzlich wurden mehrere Mutationen identifiziert, die die Affinität zu einem oder mehreren Liganden oder die Signal-transduktion von MC4R verändern, ohne dass *in vitro* ein dominant-negativer Effekt unter gesättigten Konzentrationen von Liganden beobachtet wurde (Yeo *et al.*, 1998). Es können neben unterschiedlicher Expression also dominant-negative Effekte *in vivo* und veränderte Rezeptoreigenschaften sein, die die Rolle der mindestens 10 Kopien von MC4R in *X. maculatus* (XX Weibchen) ausmachen. Erste funktionelle Studien repräsentativer Kopien (bezüglich der in Kapitel 4.5.2 dargestellten strukturellen Merkmale) durch Expression in Zelllinien waren aufgrund toxischer Effekte leider noch nicht erfolgreich (Selz, 2003). Zukünftige Experimente sind unbedingt notwendig, um physiologische Eigenschaften zu untersuchen und mit Expressionsdaten korrelieren zu können.

Erste Studien belegen, dass die *mc4r*-Kopien differentiell exprimiert sind und eventuell an der Regulation der Pigmentierung oder des Energiehaushalts beteiligt sein könnten, wie die starke Expression zumindest einer Kopie von *mc4r* mit alternativem 3'UTR in Melanomen zeigt (Abb. 33). Es konnte außerdem durch Sequenzierung der RT-PCR-Produkte gezeigt werden, dass einige Kopien bevorzugt in verschiedenen Geweben exprimiert werden (*mc4rG* im Tumorgewebe, *D* und *N* im Gehirn und L und O im Testis, Selz, 2003). Allerdings müssen diese Hinweise noch weiter verfolgt werden. So ist zum Beispiel

mc4rG die einzige Kopie mit alternativem 3'UTR aus *X. maculatus* in Rückkreuzungsfischen des untersuchten Stammes WLC407. Sollte die differentielle Expression auf der alternativen 3'UTR beruhen, müsste sie auch in benignen Tumoren exprimiert sein und die entsprechenden Y-chromosomalen Kopien *mc4rP* oder *mc4rR* sollten in Hybriden mit männlichem *X. maculatus*-Elter exprimiert werden. Zudem besitzt *X. helleri* scheinbar auch ein Melanocortin-Rezeptoren mit diesen Merkmalen wie die PCR-Analyse in Abb. 34 zeigt. Dies muss in weiteren Sequenzanalysen berücksichtigt werden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Fische der Gattung *Xiphophorus* stellen eines der am besten untersuchten Modellsysteme zur Untersuchung genetischer Geschlechtsbestimmung innerhalb dieser Klasse von mehr als 24.000 Arten dar. Fische können männliche (XX/ XY) oder weibliche (WY/ YY) Heterogametie aufweisen, in *X. maculatus* sogar innerhalb einer Population. Zusätzlich sind atypische Geschlechtsbestimmungssysteme beschrieben worden, die auf autosomale Modifikatoren zurückgeführt wurden. Obwohl kürzlich das Mastergen der Geschlechts-bestimmung im Fisch Medaka (*Oryzias latipes*) als ein Mitglied der *Dmrt*-Genfamilie identifiziert wurde, konnte *Dmrt1bY* als Mastergen der Geschlechtsbestimmung von *Xiphophorus* und anderen Fischen ausgeschlossen werden.

Xiphophorus wurde zum wissenschaftlichen Modellsystem, da bestimmte zwischenartliche Kreuzungshybride maligne Melanome entwickeln. Das dafür verantwortliche Onkogen *Xmrk* und sein physiologisches Gegenstück *egfrb* liegen eng gekoppelt (< 0,6 cM) in der Geschlechtsbestimmungsregion von *X. maculatus*, und zwar in der subtelomerischen Region der X- und Y-Chromosomen. Die Kopplungsgruppe umfasst noch weitere Loci wie den geschlechtsbestimmenden Locus *SD*, den Locus *RY* für rötliche und gelb-bräunliche Farbmuster und den Locus *Mdl*, der außer schwarzen Pigmentflecken auch noch den Bildungsort und die Schwere der Melanome in Hybriden mit *X. helleri* steuert. Die enge Kopplung dieser Loci entspricht einem physikalischen Abstand von ca. 1 Mb (Megabasenpaare) und ermöglicht eine Strategie der positionellen Klonierung der von diesen Loci kodierten Gene.

Die Analyse großer gonosomaler Cosmid- und BAC- (Bacterial Artificial Chromosome) Contigs, welche im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden und die mehr als 1 Mb sowohl des X- als auch des Y-Chromosoms des Platys *X. maculatus* abdecken, zeigte eine hohe Dichte von Retroelementen und anderen repetitiven Sequenzen, besonders im Bereich des dominanten Onkogens *Xmrk* und in einer durch das duplizierte Gen *ps-criptY* gekennzeichneten, Y-spezifischen Region. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eines dieser Elemente (*XIR*) spezifisch auf dem Y-Chromosom akkumuliert, was möglicherweise einen frühen Schritt der Differenzierung der Geschlechtschromosomen des Platys darstellt. Auch können repetitive Elemente möglicherweise verantwortlich für genetische Variabilität sein, wie es in dieser Region für die Vielzahl von Pigmentierungsmustern und Tumor-Phänotypen und auch für die verschiedenen Geschlechtsbestimmungsmechanismen beobachtet wurde.

Es konnten mehrere Duplikationsereignisse in dieser Region nachgewiesen werden. Erstens wurde *egfrb* dupliziert, dessen Kopie zum Onkogen *Xmrk* wurde. Zweitens konnte die mehrfache Duplikation eines Melanocortin-Rezeptorgens *mc4r* nachgewiesen werden, von dem 9 Kopien auf dem X-Chromosom in einer Tandem-ähnlichen Struktur vorliegen und mindestens 9 Kopien auf dem Y-Chromosom. Mindestens 11 der insgesamt 19 Kopien

besitzen nicht unterbrochene offene Leseraster, deren konzeptionelle Translationsprodukte die strukturellen Charakteristika funktioneller Rezeptoren zeigen. Drittens wurde das autosomale Gen *cript* dupliziert und liegt nun in jeweils einer Kopie (*ps-cript1*) direkt stromabwärts von *Xmrk* auf beiden Geschlechtschromosomen und in einer zusätzlichen Kopie auf dem Y-Chromosom (*ps-criptY*), wo es eine geschlechtsspezifische Region mit Syntenie zum menschlichen Chromosom 2p markiert. Andere potentielle Gene, die innerhalb der erstellten gonosomalen Contigs von *X. maculatus* identifiziert wurden, zeigen Homologien zu den menschlichen Genen *CHRNA, CHRND* und *TMEFF* und lassen auf eine syntenische Region zum menschlichen Chromosom 2q schließen. Diese Region ist involviert in autosomale Geschlechtsumkehr im Mensch, allerdings wurde noch kein dafür verantwortliches Gen identifiziert.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse der Analyse von Sequenzen in der geschlechtsbestimmenden Region von *X. maculatus* bilden die Basis für ein tieferes Verständnis der Mechanismen, die zur Plastizität der von der *Xmrk-SD*-Region vermittelten Eigenschaften führen. Auf dieser Grundlage sollten zukünftige Arbeiten zur Identifizierung des Mastergens der Geschlechtsbestimmung führen. Die Identifizierung dieses neuen Gens könnte außerdem zur Aufklärung anderer Geschlechtsbestimmungsmechanismen innerhalb der Fische beitragen, was besonders im Hinblick auf kommerziell genutzte Arten z.B. in der Aquakultur großen Nutzen bringen kann. Einige der analysierten Gene der *Xmrk*-Region zeigen geschlechtsspezifische Expressionsmuster, allerdings steht die funktionelle Analyse noch am Anfang.

Phänotypen, die mit Pigmentmusterbildung und dem Zeitpunkt der sexuellen Reifung in Zusammenhang stehen, könnten auf den in dieser Arbeit identifizierten Melanocortin-Rezeptoren (*mc4r*) beruhen. Ihre strukturellen Eigenschaften und Expressionsmuster weisen auf ihre mögliche Rolle in einem oder mehreren dieser Vorgänge hin. Verglichen mit den nicht duplizierten Melanocortin-Rezeptoren anderer Vertebraten könnte die ungewöhnlich hohe Anzahl an Kopien als Grundlage für evolutionäre Veränderungen dieser Gene dienen. Obwohl ihre Funktionalität noch gezeigt werden muss, könnten diese Kopien typische evolutionäre Veränderungen duplizierter Gene wie die Übernahme einer neuen Funktion durch das Codieren neuer Proteine nach Mutationen, die Reduktion ihrer Funktion durch die auf weniger Gewebe eingeschränkte Expression und den Verlust ihrer Funktion durch Mutationen, die das Leseraster unterbrechen, zeigen. Somit kann die zukünftige Analyse der Funktion der *mc4r*-Gene in *X. maculatus* auch zu einem tieferen Verständnis der Mechanismen beitragen, auf denen die schnelle Evolution dieses Abschnitts der Geschlechtschromosomen beruht.

7. Summary and Perspectives

Fishes of the genus *Xiphophorus* provide one of the best analysed model systems with respect to genetic sex determination among this class of more than 24,000 species. Within certain species, systems with male (XX/ XY) or female (WY/ YY) heterogamety are known, in *X. maculatus* even within a same population. In addition, atypical sex determination sytems caused by autosomal modifiers have been described. Although the master sex determining gene of the Medakafish (*Oryzias latipes*) was recently identified as a member of the *Dmrt* gene family, *Dmrt1bY* could be excluded to be the master sex determining gene of *Xiphophorus* and other fish outside the genus *Oryzias*.

Xiphophorus came into the light of science because of the formation of malignant melanoma in certain interspecific crossings of this genus. The dominant oncogene *Xmrk* and its proto-oncogenic counterpart *egfrb* reside in the subtelomeric regions of both X and Y sex chromosomes of *X. maculatus*. They are closely linked (< 0.6 cM) to the sex determination locus *SD*, the locus for the development of reddish and brownish colour patterns *RY* and the locus *Mdl*, responsible not only for black pigmentation patterns in *X. maculatus* but also for the onset and severity of the melanomas in hybrids with *X. helleri*. The close linkage that represents a region of about 1 Mb containing various loci that influence such different biological processes like tumor formation and sex determination made possible a strategy of positional cloning of genes involved in these phenotypes.

Analysis of large gonosomal cosmid and BAC (Bacterial Artificial Chromosome) contigs established during this work that cover more than 1 Mb of both X and Y sex chromosomes of the Southern platyfish (*X. maculatus*) revealed a high density of retroelements and other repetitive sequences, particularly around the dominant oncogene *Xmrk* and within a male-specific region marked by the duplicated gene *ps-criptY*. In addition, one of these elements (*XIR*) has been shown to accumulate specifically on the Y-chromosome, probably reflecting an early step in sex chromosome differentiation in the platyfish. Repetitive elements can also mediate genetic variability as it is observed in this region for the multitude of pigment patterns and melanoma phenotypes and probably for the different sex determining mechanisms, too.

Several duplication events could be observed in this region. First, the duplication of *egfrb* generated a second copy which became the oncogene *Xmrk*. Second, a melanocortin receptor gene was found to be duplicated 9 times on the X chromosome in a tandem like structure and at least 9 copies were found to reside on the Y. At least 11 copies still have a non-corrupted open reading frame, the conceptual translation products of which show the structural characteristics of functional receptors. Third, the autosomal gene *cript* is

duplicated once on the X (*ps-cript1*) and twice on the Y chromosome (*ps-cript1, ps-criptY*), marking there a male-specific region syntenic to the human chromosome 2p. Other putative genes identified on the gonosomal contigs present homologies to the human genes *CHRNA, CHRND* and *TMEFF* and indicate a region syntenic to the human chromosome 2q. A so far unidentified gene involved in autosomal sex reversal in human has been mapped to this chromosomal region.

The presented work of cloning sequences around the primary sex-determining locus *SD* of *Xiphophorus maculatus* provides the basis for a further understanding of the plasticity of the *Xmrk-SD* region and future experiments on the identification of the primary sex-determining gene in this genus and possibly in other fish species. This could be of special interest for commercially bred fish species in aquaculture. Some of the putative genes identified in the *Xmrk* region show sexually dimorphic expression patterns, albeit functional analysis is still at the beginning.

Loci involved in melanoma formation, pigment patterning and puberty that are mapped to the *Xmrk*-SD region might be represented by different copies of the melanocortin receptor genes identified in this work. Their structural features as well as their differential expression patterns suggest a possible role in establishing these phenotypes. Compared to non-duplicated melanocortin receptors (*mc4r*) of other vertebrates, the high copy number on the gonosomes of *X. macculatus* could serve as evolutionary scenario. Although their functionality has to be proven, these copies might show typical features of duplicated genes in terms of neo-functionalization (in frame mutations, insertions/ deletions), sub-functionalization (reduced number of tissues in which they are expressed) and non-functionalization (pseudogenes). Thus, the further analysis of the *mc4r* genes of *X. maculatus* with respect to their function is expected to lead to a deeper understanding of general mechanisms that affect this fast evolving region of the sex chromosomes.

8. Anhang

Tabelle A1: Cosmide, die mittels Southern-Blot-Hybridisierung identifiziert wurden (mit * gekennzeichnete Cosmide wurden von Silke Weis, Kimberley Sweeney oder Katrin Wichert identifiziert). Die Sonden, die zur Identifizierung auf HD-Membranen verwendet wurden, sind in der zweiten Spalte aufgeführt. Die Ergebnisse der Kontrollhybridisierung der Cosmide sind als positiv oder negativ bezeichnet, wenn alle Sonden getestet wurden, falls nicht, sind die getesteten Sonden in Klammern angegeben (n.b.: nicht bestimmt; "?" kennzeichnet schon vor dieser Arbeit identifizierte Cosmide, deren Kontrollhybridisierung nicht nachvollzogen werden konnte). Sonden: Xcript (PCR-Produkt des Pseudogens *ps-cript1* stromabwärts von *Xmrk*, Primer Xcript-F1 und -R1), G4 (partieller ORF von Xmrk), pGEM Sac10 (5'-Teil des Phagen 12, 1,3 kb-*Eco*RI-Fragment), pJule (DNA-Sequenz des Retrotransposons *Jule*), pROST 21 (PCR-Produkt, Primer 21d-f2 und 21d-r2, stromaufwärts von *Xmrk*, im 9,5 kb-*Eco*RI-Fragment von 097 D18 gelegen), pROST 27 (*XIR*-Element), pROST 53 (partieller ORF von *mc4r*), pROST 72 (PCR-Produkt des Pseudogens *ps-rnase3l*, Primer pROST 72-F1 und -R1), DMT 1 (partielle cDNA des humanen *Dmrt1*) und Endproben (benannt nach Cosmid und verwendetem Vektorprimer).

Cosmid	Identifiziert mit Sonde(n)	Kontrollhybridisierung	Bemerkungen
001 D14	pROST 53	n.b.	nicht gewachsen
001 N23	pROST 53	negativ	
002 N12	129 O11-T8	positiv	**stromaufwärts *egfrb***
002 P03*	008 G01-T8/ pJule	pJule	
003 A19	Xcript	positiv	***cript*** (autosomal)
003 K11*	008 G01-T8/ pJule	pJule	
003 M20*	008 G01-T8/ pJule	n.b.	
003 O04	pROST 53/ pROST 72	pROST 53, pROST 72	
005 F06*	133G08-T7/ Xcript	positiv	
005 O11	093 C16-SP6	positiv	
008 G01*	G4/ 036M08-SP6	positiv	***egfrb* (Y)**
009 E08*	036M08-SP6/ pROST 53 & 72	036M08-SP6, pROST 72	negativ pROST 53
009 E11	pROST 72	positiv	
010 L04	pROST 53	n.b.	nicht gewachsen
012 K09	Xcript	positiv	***ps-criptY***
013 F06	pGEM Sac10/ pROST 21/ 27 & 53	n.b.	
013 P08*	pGEM Sac10/ pROST 27	n.b.	
013 P21*	G4/ 036 M08-SP6/ WIN 3	positiv	***egfrb* (Y)**
015 M12*	008 G01-T8/ pJule	n.b.	
016 K22	069 G17-SP6/ 093 C16-SP6	positiv	
016 M15	pROST 72	negativ	
017 J18*	pROST 21	positiv	
018 B12	093 C16-SP6	positiv	
019 K01*	008 G01-T8/ pJule	n.b.	
020 C10	129 O11-T8	negativ	
020 P22	pROST 21/ 27 & 53	negativ (pROST 27)	
021 J06	pROST 53	negativ	
022 I19*	G4	negativ	zu kleines Insert
023 D19	pROST 53	positiv	
023 G03	090 H19-PvuII-SP6	negativ	
023 K24	pROST 72	negativ	
023 P16	pROST 53/ pROST 72	negativ	
025 A14*	pGEM Sac10/ pROST 27	n.b.	
025 F06*	036 M08-SP6	negativ	
025 L23	093 C16-SP6	n.b.	
027 K01	pROST 53	positiv	

Cosmid	Identifiziert mit Sonde(n)	Kontrollhybridisierung	Bemerkungen
027 K11	093 C16-SP6	positiv	
027 K12	DMT 1	negativ	
028 A07*	008 G01-T8/ pJule	n.b.	
028 L09*	008 G01-T8/ pJule	n.b.	
028 N15*	069 G17-SP6	n.b.	Vektorbanden falsch
029 E17	093 C16-SP6	positiv	
031 F24	pROST 53	positiv	
032 C10	129 O11-T8	positiv	
033 J06	pROST 53	negativ	
034 G05	pROST 21/ 27 & 53	n.b.	Vektor unklar
034 I11	pROST 21/ 27 & 53	n.b.	nicht gewachsen
034 I17	G4/ pROST 21/ 27 & 53	n.b.	kontaminiert
035 D19	pROST 53	negativ	
035 G03	090 H19-PvuII-SP6	positiv	**stromaufwärts *egfrb***
035 K24	pROST 72	positiv	
035 N02*	pROST 21 & 27	negativ (pROST 27)	
035 P16	pROST 53/ pROST 72	positiv	
036 D13	pROST 21, 27 & 53	n.b.	Vektorbanden falsch
036 K05*	036M08-SP6/ 133G08-T7	positiv	***Xmrk* (X)**
036 M08*	G4/ 036M08-SP6	positiv	***Xmrk* (Y)**
036 N20	093 C16-SP6	positiv	**stromaufwärts *egfrb***
038 F03	pROST 72	positiv	
038 F14	pROST 72	positiv	
038 K05	036M08-SP6/ 133G08-T7	negativ	statt 036 K05
039 H20	pROST 21, 27 & 53	negativ (pROST 27)	
039 I18	008 G01-T8/ pJule	positiv (pJule)	
040 D03*	008 G01-T8/ pJule	n.b.	
040 H22*	pGEM Sac10/ pROST 27	n.b.	
040 H23*	pGEM Sac10/ pROST 27	n.b.	
040 O14	WIN 3	negativ	
042 A18*	069 G17-SP6	positiv	
042 J10	093 C16-SP6	positiv	
042 O05*	pROST 21	positiv	
043 A19	DMT 1	n.b.	kontaminiert
043 F20*	pGEM Sac10/ pROST 27	n.b.	
048 K21*	133G08-T7	?	nicht im Contig
049 F01	pROST 53	positiv	
049 F07*	036M08-SP6/ pROST 53	negativ	
049 F19*	036M08-SP6/ pROST 53	positiv	
049 H06*	069 G17-EcoRV-SP6	positiv	**stromaufwärts *egfrb* (X)**
051 G07*	pROST 21	?	
052 B24	WIN 3	negativ	
052 K03*	133G08-T7	?	
052 K13	pROST 72	positiv	
053 A18*	pGEM Sac10/ pROST 27	?	
053 C01*	pROST 21	positiv	
053 C07*	pROST 21	positiv	
053 P19*	pROST 21	positiv	
054 E06	093 C16-SP6	positiv	
054 O03	093 C16-SP6	positiv	
055 M14	093 C16-SP6	n.b.	
056 D11	Xcript	positiv	***cript*** (autosomal)

Cosmid	Identifiziert mit Sonde(n)	Kontrollhybridisierung	Bemerkungen
057 J13	pROST 72	negativ	
057 M13	pROST 72	negativ	
057 P24*	pROST 21	positiv	
058 D02	129 O11-T8	positiv	**stromaufwärts *egfrb***
059 K24*	036M08-SP6/ pROST 53	positiv (pROST 53)	
060 A23	093 C16-SP6	n.b.	
061 P14	WIN 3	negativ	
061 P18	pROST 72	positiv	
062 C04	WIN 3	negativ	
064 A20	129 O11-T8	negativ	
064 C11*	008 G01-T8/ pJule	positiv	
064 E24*	036M08-SP6	positiv	
065 C08	093 C16-SP6	positiv	
065 G06	DMT 1	positiv	
066 E17	pROST 72	positiv	
066 I01*	pROST 21	pROST 21	
067 C14*	pGEM Sac10/ pROST 27	?	
067 C23*	pGEM Sac10/ pROST 27	?	
067 E02	093 C16-SP6	n.b.	
069 G17*	008 G01-T8/ pJule	positiv	**stromaufwärts *egfrb* (X)**
069 P16	pROST 21, 27 & 53	negativ (pROST 27, 53)	
070 F17*	pROST 21	positiv	
070 P22	pROST 72	positiv	
071 H14	DMT 1	positiv	
072 C06	DMT 1	negativ	
072 H10*	069 G17-SP6	positiv	
073 H23	pROST 21/ 27 & 53	negativ (pROST 53)	
073 O01*	036 M08-SP6/ pROST 53	positiv	
073 O17*	036 M08-SP6/ pROST 53	negativ	
074 G14	008 G01-T8/ pJule	positiv	
075 C18	093 C16-SP6	n.b.	
075 I22*	036 M08-SP6/ pROST 53	positiv (pROST 53)	
076 H14*	008 G01-T8/ pJule	positiv (008 G01-T8)	
076 M14	pROST 53	n.b.	Kontamination
078 F03	pROST 53	positiv	
078 J24*	008 G01-T8/ pJule	n.b.	Vektor unklar
078 P15	129 O11-T8	positiv	
079 A06	WIN 3	negativ	
079 D08*	008 G01-T8/ pJule	?	
079 D16*	036 M08-SP6	positiv	
079 E08	pROST 53	n.b.	kontaminiert
079 G20	WIN3	negativ	
079 H10*	069 G17-SP6	n.b.	nicht gewachsen
081 A17*	008 G01-T8/ pJule	positiv (008 G01-T8)	
081 D15*	133G08-T7	positiv	
081 G17*	008 G01-T8/ pJule	positiv (008 G01-T8)	
082 F06*	008 G01-T8/ pJule	?	
082 P22	pROST 72	positiv	
083 F05	093 C16-SP6	negativ	
083 H03	WIN 3	negativ	
084 I24	129 O11-T8	positiv	identisch mit 090 H19
087 J01*	pROST 21	n.b.	

Cosmid	Identifiziert mit Sonde(n)	Kontrollhybridisierung	Bemerkungen
088 A04	pROST 53	n.b.	kontaminiert
088 L15	pROST 21, 27 & 53	negativ (pROST 27)	
089 E19*	036 M08-SP6/ pGEM Sac10	positiv	**stromaufwärts *Xmrk* (Y)**
090 A21	Xcript	positiv	***cript*** (autosomal)
090 H19	129 O11-T8	positiv	
091 A16	093 C16-SP6	positiv	
091 L11*	G4	positiv	***Xmrk* (X)**
092 E22	pROST 72	positiv	
092 O03	093 C16-SP6	n.b.	
092 O20	pROST 21, 27 & 53	n.b.	Vektor unklar
093 C16*	069 G17-SP6	positiv	
093 N03	093 C16-SP6	positiv	
094 C20*	pROST 21	positiv	
094 K23	129 O11-T8	positiv	094 K23 nicht im Contig, beide Endproben getestet
096 C03	WIN 3	negativ	
096 F19	129 O11-T8	n.b.	
097 D18	036M08-SP6/ pGEM Sac10	positiv	**stromaufwärts *Xmrk* (Y)**
098 M10	DMT 1	positiv	
098 O19*	008 G01-T8/ pJule	?	
099 E22*	pROST 21	?	
099 F17	129 O11-T8	positiv	
099 J18	Xcript	positiv	***cript*** (autosomal)
099 L18	Xcript	negativ	
099 M02	G4	positiv	***Xmrk* (X)**
102 E04*	pROST 21/ pROST 53	negativ	Cosmid häufig mit Signal auf HD-Filter
106 N13*	pGEM Sac10/ pROST 27	?	
106 M20*	G4/ 036M08-SP6	positiv	***egrfb* (Y)**
107 D02	WIN 3	negativ	
107 F23	pROST 53	positiv	
108 L15	049 H06-SP6	negativ	
109 H17	pROST 72	positiv	
112 B04*	pGEM Sac10/ pROST 27	?	
113 C05	pROST 72	positiv	
113 D02	WIN 3	negativ	
113 P12*	052 K03-Probe	positiv	052 K03 nicht im Contig
114 J24*	036M08-SP6	negativ	
115 I20*	008 G01-T8/ pJule	?	
115 L09	pROST 21, 27 & 53	positiv (pROST 27)	
116 D02	WIN 3	negativ	
116 I18*	036M08-SP6	positiv	
117 H23	090 H19-PvuII-SP6	negativ	
117 O11	049 H06 - SP6	negativ	
118 F10*	pGEM Sac10/ pROST 27	?	
118 I16	049 H06 - SP6	negativ	
119 H19	pROST 53	negativ	
121 F23	090 H19-PvuII-SP6	negativ	
122 E05	pROST 53	pROST 53	
123 L18	Xcript	negativ	
123 O07	129 O11-T8	positiv	**stromaufwärts *egfrb***
125 J08	129 O11-T8	positiv	

Cosmid	Identifiziert mit Sonde(n)	Kontrollhybridisierung	Bemerkungen
125 O02	pROST 21/ pROST 53	negativ	Cosmid häufig mit Signal auf HD-Filter
126 O23	093 C16-SP6	n.b.	
127 I20*	008 G01-T8/ pJule	?	
127 K22	pGEM Sac10/ pROST 27	?	
127 M07*	G4	negativ	
128 F19*	pGEM Sac10/ pROST 27	?	
128 G23	pROST 21/ 27 & 53	positiv (pROST 27)	RFLP von XIR nicht im Contig
128 J22	pROST 21/ 27 & 53	positiv (pROST 27)	RFLP von XIR nicht im Contig
129 G02	093 C16-SP6	positiv	
129 H23	090 H19-SP6	negativ	
129 O11	049 H06 - SP6	positiv	**stromaufwärts *egfrb***
130 I16	049 H06 - SP6	negativ	
131 H19	pROST 53	n.b.	
131 H20	pROST 72	positiv	
132 M14	093 C16-SP6	positiv	
133 B08	pROST 21/ 27 & 53	n.b.	
133 E19	pROST 72	positiv	
133 F23	090 H19-PvuII-SP6	positiv	
133 G08	G4/ 036M08-SP6/ Xcript	positiv	***Xmrk* (Y)**
134 K06	WIN3	negativ	
134 P07	pROST 53	negativ	
135 B09*	pGEM Sac10/ pROST 27	?	
135 B23	WIN 3	negativ	
135 K01	129 O11-T8	negativ	
136 F06	pROST 53	positiv	
138 F24	pROST 53	n.b.	nicht gewachsen
139 F21	pROST 53	negativ	
139 J06	pROST 72	positiv	
139 M07	WIN 3	positiv	
139 N05*	008 G01-T8/ pJule	pJule	
140 D20	pROST 53/ pROST 72	positiv	
140 F06*	008 G01-T8/ pJule	positiv	
140 F14	pROST 21	positiv	
140 H13*	G4/ 036M08-SP6/ Xcript	positiv	***Xmrk* (Y)**
140 H18	Xcript	positiv	***cript*** (autosomal)
140 L22	093 C16-SP6	positiv	
142 F21	pROST 72	negativ	
142 M01	129 O11-T8	positiv	
143 E17	pROST 53	positiv	
144 A07	WIN 3	negativ	
144 C23	pROST 21	positiv	
144 M07*	008 G01-T8/ pJule	?	
144 N21*	036M08-SP6	positiv	nicht im Cosmid-Contig

Tabelle A2: BAC-Klone, die mittels Southern-Blot-Hybridisierung identifiziert und getestet wurden. Die Sonden, die zur Identifizierung auf HD-Membranen verwendet wurden, sind in der dritten Spalte aufgeführt. Die Ergebnisse der Kontrollhybridisierung der BACs sind als positiv oder negativ bezeichnet, wenn alle Sonden getestet wurden, falls nicht, sind die getesteten Sonden in Klammern angegeben. Sonden: G4 (partieller ORF von *Xmrk*), Xmcr (partieller ORF von *mc4r* aus pROST 53), Xcript (PCR-Produkt des Pseudogens *ps-cript1* stromabwärts von *Xmrk*, Primer Xcript-F1 und -R1), OlaDMRT1 (partielle cDNA des *Dmrt1* von Medaka, Veith *et al*. 2002), RNase3l (PCR-Produkt des Pseudogens *ps-rnase3l*, Primer pROST 72-F1 und -R1), TnH7 (PCR-Produkt des potentiellen Gens *TnH7*, Primer TnH7-F1 und -R1), Dc2 (cDNA von *dc2*, kloniert von C. Körting) und Endproben (benannt nach BAC und verwendetem Vektorprimer). n.b.: nicht bestimmt.

Code	Bac-Nr.	Identifiziert mit Sonde(n)	Kontroll-hybridi-sierung	Insert-größe in kb	Bemerkungen
A1	022 L02	G4/ A10-FOR	negativ	n.b.	
A2	002 L05	G4/ Xmcr	negativ	n.b.	falsch bestimmt
A3	044 I01	G4/ Xcript/ Xmcr/ RNase3l/ Dc2	positiv	230	***Xmrk* (X)**
A4	052 A18	G4	positiv	165	***egfrb* (Y)**
A5	014 A18	G4/ 090H19-SP6	positiv	170	***egfrb* (X)**
A6	007 N04	G4/ Xcript/ Xmcr/ RNase3l/ Dc2	positiv	230	***Xmrk* (Y)**
A7	003 P18	G4/ Xcript/ Xmcr/ RNase3l	positiv	195	***Xmrk* (Y)**, FISH-Sonde
A8	009 N18	G4	positiv	160	***egfrb* (Y)**
A9	003 K19	G4/ Xmcr/ Dc2	positiv	175	***Xmrk* (X)**
A10	071 G06	G4	positiv	150	***egfrb* (X)**, PCR negativ
A11	071 C22	G4	positiv	200	***egfrb* (Y)**
A12	047 A19	G4	positiv	190	***egfrb* (X)**
A13	057 A24	G4/ Xcript/ Xmcr/ RNase3l/ Dc2	positiv	150	***Xmrk* (Y)**
A14	106 N19	G4/ Xcript/ Xmcr/ Dc2	positiv	190	***Xmrk* (X)**
A15	118 M23	G4/ Xmcr/ Dc2	positiv	180	***Xmrk* (X)**
A16	130 K06	G4/ Xcript/ Xmcr/ RNase3l/ Dc2	positiv	160	***Xmrk* (Y)**
A17	130 G04	G4/ Xcript/ Xmcr/ RNase3l/ Dc2	positiv	175	***Xmrk* (Y)**
A18	086 H14	G4	positiv	160	***egfrb* (Y)**
A19	110 L10	G4/ Xmcr/ Dc2	positiv	179	***Xmrk* (X)**
A20	086 M24	G4/ A10-FOR	negativ	n.b.	
A21	091 A23	G4	positiv	165	***egfrb* (X)**
A22	091 A22	G4	negativ	n.b.	
A23	087 L13	G4	negativ	n.b.	falsch bestimmt
A24	117 B05	G4	positiv	225	***egfrb* (Y)**
A25	002 L06	G4/ Xcript/ Xmcr/ RNase3l/ Dc2	positiv	170	***Xmrk* (Y)**
A26	087 K13	G4	positiv	180	***egfrb* (X)**
B1	058 N04	Xmcr/ Dc2	positiv	170	
B2	008 O09	Xmcr/ Xcript/ RNase3l/ Dc2	positiv	145	**stromabwärts *Xmrk* (X)**, Endfragment *cript*
B3	027 C22	Xmcr	negativ	n.b.	
B4	068 C04	Xmcr/ Xcript/ Dc2	positiv	220	***ps-criptY***
B5	006 E11	Xmcr/ RNase3l/ Dc2	positiv	175	
B6	036 C10	Xmcr/ TnH7/ B33-REV/ Dc2	positiv	157	**stromabwärts *Xmrk* (X)**
B7	051 N02	Xmcr/ RNase3l/ Dc2	positiv	240	
B8	037 B01	Xmcr/ RNase3l/ Dc2	positiv	190	**stromaufwärts *Xmrk* (X)**
B9	059 M19	Xmcr/ Dc2	positiv	160	
B10	053 O24	Xmcr/ TnH7/ Dc2	positiv	163	**stromabwärts *Xmrk* (X)**
B11	015 J24	Xmcr/ Dc2	positiv	150	**stromabwärts *Xmrk* (X)**
B13	065 C10	Xmcr/ Dc2	positiv	145	***ps-criptY***
B14	041 B06	Xmcr/ Dc2	positiv	170	***ps-criptY***

Code	Bac-Nr.	Identifiziert mit Sonde(n)	Kontroll-hybridi-sierung	Insert-größe in kb	Bemerkungen
B15	088 J08	Xmcr/ TnH7/ Dc2	positiv	n.b.	***ps-criptY***
B16	071 F04	Xmcr/ RNase3I/ Dc2	positiv	50	
B17	082 N08	Xmcr/ TnH7/ Dc2	positiv	190	***ps-criptY***
B18	094 K18	Xmcr/ RNase3I/ Dc2	positiv	180	**stromaufwärts *Xmrk* (Y)**
B19	080 J23	Xmcr/ TnH7/ AcRec/ Dc2	positiv	165	
B20	116 P09	Xmcr/ Dc2	positiv	170	
B21	104 G16	Xmcr/ Xcript/ Dc2	positiv	180	***ps-criptY***
B22	084 M15	Xmcr/ Dc2	positiv	160	**stromabwärts *Xmrk* (X)**
B23	108 M20	Xmcr/ RNase3I/ Dc2	positiv	160	**stromabwärts *Xmrk* (X)**
B24	115 P04	Xmcr/ TnH7/ AcRec/ Dc2	positiv	183	**stromabwärts *Xmrk* (X)**
B25	088 J06	Xmcr	negativ	n.b.	falsch bestimmt
B26	130 D13	Xmcr/ Dc2	positiv	165	***ps-criptY***
B27	103 C23	Xmcr/ RNase3I/ Dc2	positiv	180	
B28	101 M22	Xmcr/ Dc2	positiv	180	
B29	085 A12	Xmcr/ Xcript/ TnH7/ Dc2	positiv	220	***ps-criptY***
B30	087 C20	Xmcr/ B33-REV/ Dc2	positiv	160	
B31	105 E10	Xmcr/ RNase3I/ Dc2	positiv	180	**stromabwärts *Xmrk* (X)**
B32	117 M02	Xmcr/ RNase3I/ Dc2	positiv	170	**stromabwärts *Xmrk* (X)**
B33	096 F15	Xmcr/ RNase3I/ Dc2/ B6-REV	positiv	155	**stromabwärts *Xmrk* (X)**
B34	025 P21	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B35	005 L20	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B36	039 J16	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B37	035 F02	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B38	069 F20	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B39	057 C02	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B41	076 K14	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B42	082 M07	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B43	092 M04	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B44	086 J02	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B45	116 J10	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B46	098 H06	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B47	086 J17	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B48	112 H01	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B49	127 H14	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B50	096 K04	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B51	127 B08	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B52	107 K18	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B53	089 K04	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B54	111 K19	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B55	093 M16	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B56	078 A10	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B57	110 B04	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B58	128 B04	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B59	096 M08	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B60	086 E05	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
B61	104 E23	Xmcr	negativ	n.b.	analysiert von C. Schultheis
C1	076 O01	Xcript	positiv	170	***cript*** (autosomal)
C2	130 G18	Xcript	positiv	180	***cript*** (autosomal)
C3	103 D02	Xcript	positiv	190	***ps-criptY***
C4	040 L03	Xcript	positiv	175	***cript*** (autosomal), FISH-Sonde

Code	Bac-Nr.	Identifiziert mit Sonde(n)	Kontroll-hybridi-sierung	Insert-größe in kb	Bemerkungen
C5	034 A04	Xcript	positiv	175	***cript*** (autosomal)
C6	049 N16	Xcript	positiv	n.b.	***cript*** (autosomal)
C7	067 J18	Xcript	positiv	n.b.	***cript*** (autosomal)
D1	028 N05	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D2	038 L03	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D3	044 C03	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D4	012 N08	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D5	017 G06	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D6	033 N21	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D7	009 I16	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D8	051 O03	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D9	001 A24	OlaDMRT1	negativ	n.b.	
D10	129 G20	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D11	083 A09	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D12	125 J12	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D13	119 I23	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D14	127 C23	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D15	091 I22	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D16	103 A08	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D17	121 F14	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D18	081 F02	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D19	129 M01	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D20	088 P05	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D21	114 C10	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D22	126 G18	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D23	108 M24	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
D24	115 M03	OlaDMRT1	positiv	n.b.	
E1	044 P07	090H19-SP6/ A10-FOR	positiv (A10-FOR)	145	**stromabwärts *egfrb* (Y)**
E3	034 D02	090H19-SP6	positiv	165	**stromaufwärts *egfrb***
E4	063 D04	090H19-SP6	positiv	152	**stromaufwärts *egfrb***
E5	063 N21	090H19-SP6	positiv	125	**stromaufwärts *egfrb***
E6	003 E18	090H19-SP6	negativ	n.b.	
E7	031 J24	090H19-SP6	negativ	n.b.	
E8	061 G19	090H19-SP6	positiv	153	**stromaufwärts *egfrb***
E9	052 H01	090H19-SP6	negativ	n.b.	
E10	083 O08	090H19-SP6	positiv	178	**stromaufwärts *egfrb***
E11	079 E02	090H19-SP6	positiv	197	**stromaufwärts *egfrb***
E12	103 J24	090H19-SP6	positiv	184	**stromaufwärts *egfrb***
E13	016 N08	090H19-SP6	negativ	n.b.	
E15	004 J19	090H19-SP6	negativ	n.b.	
E17	002 G22	090H19-SP6	negativ	n.b.	
E18	007 C20	090H19-SP6	negativ	n.b.	
E19	051 J10	090H19-SP6	positiv	123	**stromaufwärts *egfrb***
E21	044 G13	090H19-SP6	negativ	n.b.	
E23	063 P17	090H19-SP6	negativ	n.b.	
E26	024 I02	090H19-SP6	negativ	n.b.	
F1	031 A22	RNase3l/ B6-REV/ B33-REV	positiv	160	
F2	065 F20	RNase3l/ B6-REV	positiv	n.b.	
F4	003 J10	RNase3l	positiv	n.b.	

Code	Bac-Nr.	Identifiziert mit Sonde(n)	Kontroll-hybridi-sierung	Insert-größe in kb	Bemerkungen
F5	012 M11	RNase3l	positiv	n.b.	
F6	020 H13	RNase3l/ B6-REV	positiv	n.b.	
F7	104 M22	RNase3l/ B33-REV	positiv	n.b.	
F8	081 P23	RNase3l	positiv	196	**stromaufwärts *Xmrk***
F9	130 D04	RNase3l/ B33-REV	positiv	132	
F10	107 A09	RNase3l/ B33-REV	positiv	155	
F11	123 N02	RNase3l/ B6-REV/ B33-REV	positiv	140	
F12	109 J11	RNase3l	positiv	n.b.	
F13	081 P24	RNase3l	negativ	n.b.	
F14	074 E07	RNase3l	negativ	n.b.	
F15	110 D03	RNase3l	negativ	n.b.	
F16	126 O11	RNase3l	negativ	n.b.	
F17	090 I02	RNase3l	negativ	n.b.	
F18	129 H01	RNase3l	negativ	n.b.	
F19	111 E09	RNase3l	negativ	n.b.	
F20	075 B04	RNase3l	negativ	n.b.	
F21	111 K14	RNase3l	negativ	n.b.	
F22	087 I15	RNase3l	negativ	n.b.	
F23	124 F05	RNase3l	positiv	185	**stromaufwärts *Xmrk***
F24	102 I08	RNase3l/ B33-REV	negativ	n.b.	
F25	085 E03	RNase3l	positiv	176	**stromaufwärts *Xmrk***
F26	125 J06	RNase3l	negativ	n.b.	
F27	125 F10	RNase3l	negativ	n.b.	
F28	092 D04	RNase3l	negativ	n.b.	
F29	026 N13	RNase3l	negativ	n.b.	
F30	044 H06	RNase3l	negativ	n.b.	
F31	024 P13	RNase3l/ B33-REV	positiv	170	
F32	024 N06	RNase3l	negativ	n.b.	
F33	054 F01	RNase3l/ B33-REV	positiv	155	
F34	030 D03	RNase3l	negativ	n.b.	
F35	021 P10	RNase3l	negativ	n.b.	
F36	003 O13	RNase3l	negativ	n.b.	
F37	003 O22	RNase3l	negativ	n.b.	
F38	017 M05	RNase3l	negativ	n.b.	
F39	017 H07	RNase3l	negativ	n.b.	
F40	011 F11	RNase3l	negativ	n.b.	
F41	017 I13	RNase3l	negativ	n.b.	
F42	065 D20	RNase3l	negativ	n.b.	
F43	011 A23	RNase3l	negativ	n.b.	
F44	027 B02	RNase3l/ Xmcr/ Dc2	positiv	186	**stromaufwärts *Xmrk* (X)**
F45	020 L23	RNase3l	negativ	n.b.	
F46	045 O12	RNase3l	negativ	n.b.	
F47	001 M24	RNase3l	negativ	n.b.	
F48	043 O21	RNase3l	negativ	n.b.	
G1	037 L10	A10-FOR	positiv	145	**stromabwärts *egfrb* (X)**
G3	020 G19	A10-FOR	negativ	n.b.	
G4	075 H19	A10-FOR	positiv	170	**stromabwärts *egfrb* (Y)**
H1	003 E07	B6-REV	positiv	n.b.	
H4	024 G12	B6-REV	positiv	n.b.	
H6	030 J07	B6-REV	negativ	n.b.	

Code	Bac-Nr.	Identifiziert mit Sonde(n)	Kontroll-hybridi-sierung	Insert-größe in kb	Bemerkungen
H8	006 N07	B6-REV/ B33-REV	positiv	n.b.	
H9	044 C09	B6-REV	positiv	n.b.	
H10	014 C07	B6-REV/ B33-REV	positiv	n.b.	
H11	032 H06	B6-REV	positiv	n.b.	
H12	044 L07	B6-REV/ B33-REV	positiv	n.b.	
H13	008 M03	B6-REV	positiv	n.b.	
H14	020 L15	B6-REV	positiv	n.b.	
H16	024 L17	B6-REV	positiv	n.b.	
H22	003 C22	B6-REV/ B33-REV	positiv	n.b.	
H24	029 E24	B6-REV/ B33-REV	positiv	n.b.	
H25	005 M22	B6-REV	positiv	150	RFLP B6-REV
H26	017 P18	B6-REV	positiv	n.b.	
H28	010 G06	B6-REV	positiv	n.b.	
H41	001 H18	B6-REV/ RNase3I	negativ	n.b.	
H72	080 I17	B6-REV	positiv	n.b.	
H73	080 H12	B6-REV	positiv	n.b.	
H74	074 M08	B6-REV	positiv	n.b.	
H75	086 M08	B6-REV/ TnH7/ B33-REV	positiv	152	**stromabwärts *Xmrk* (X)**
H80	081 N01	B6-REV	positiv	n.b.	
H85	099 A03	B6-REV/ B33-REV	positiv	n.b.	
H88	102 C01	B6-REV	positiv	n.b.	
H93	115 P05	B6-REV/ RNase3I/ B33-REV	positiv	145	
H121	129 C01	B6-REV	positiv	n.b.	
K1	036 E23	TnH7/ RNase3I	positiv (TnH7)	n.b.	
K2	002 O14	TnH7	positiv	n.b.	
K4	037 L19	TnH7	positiv	n.b.	
K5	037 M15	TnH7	positiv	n.b.	
K6	025 M10	TnH7	positiv	n.b.	
K7	001 E05	TnH7	positiv	n.b.	
K8	007 D06	TnH7	positiv	n.b.	
K9	047 P21	TnH7	positiv	n.b.	
K10	011 I14	TnH7	positiv	n.b.	
K11	029 A20	TnH7	positiv	n.b.	
K12	057 J14	TnH7	positiv	n.b.	
K14	042 J22	TnH7	positiv	n.b.	
K15	048 H21	TnH7	positiv	n.b.	
K18	005 F10	TnH7	negativ	n.b.	
K19	035 K15	TnH7	positiv	n.b.	
K22	042 A22	TnH7	positiv	n.b.	
K26	051 C22	TnH7/ Dc2	positiv	150	**stromabwärts *Xmrk* (X)**
K27	032 E20	TnH7	positiv	n.b.	
K33	103 G22	TnH7	positiv	n.b.	
K34	089 O21	TnH7	positiv	n.b.	
K35	075 H04	TnH7	positiv	n.b.	
K36	108 A09	TnH7	positiv	n.b.	
K39	108 M18	TnH7	positiv	n.b.	
K40	126 P21	TnH7	positiv	n.b.	
K42	084 P09	TnH7	positiv	n.b.	
K43	092 F22	TnH7	positiv	n.b.	

Code	Bac-Nr.	Identifiziert mit Sonde(n)	Kontroll-hybridi-sierung	Insert-größe in kb	Bemerkungen
K48	074 M05	TnH7	negativ	n.b.	
M1	021 B16	E1-REV	positiv	n.b.	**stromabwärts *egfrb* (Y)**
M2	066 K24	E1-REV	positiv	n.b.	**stromabwärts *egfrb* (X)**
M3	054 N24	E1-REV	positiv	n.b.	**stromabwärts *egfrb* (X)**
M4	036 L09	E1-REV	positiv	n.b.	**stromabwärts *egfrb* (Y)**
M5	043 M11	E1-REV	positiv	n.b.	**stromabwärts *egfrb* (Y)**
M6	085 O06	E1-REV	positiv	n.b.	**stromabwärts *egfrb* (X)**
M7	086 B22	E1-REV	positiv	n.b.	**stromabwärts *egfrb* (X)**
M8	113 O23	E1-REV	positiv	n.b.	**stromabwärts *egfrb* (Y)**
Q1	098 M10	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q2	110 M10	Dc2	negativ	n.b.	analysiert von C. Körting
Q3	079 L09	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q4	073 C03	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q5	113 K09	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q6	014 J05	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q7	014 C08	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q8	036 D10	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q9	003 F11	Dc2	negativ	n.b.	analysiert von C. Körting
Q10	015 E11	Dc2	negativ	n.b.	analysiert von C. Körting
Q11	050 D18	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q12	006 N19	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q13	040 F04	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q14	067 P02	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q15	018 M11	Dc2	negativ	n.b.	analysiert von C. Körting
Q16	071 N10	Dc2	negativ	n.b.	analysiert von C. Körting
Q17	019 P15	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q18	013 I16	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q19	013 E11	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q20	023 J18	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q21	028 L18	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q22	032 E03	Dc2	positiv	n.b.	analysiert von C. Körting
Q23	050 P01	Dc2	negativ	n.b.	analysiert von C. Körting
Q24	068 O01	Dc2	negativ	n.b.	analysiert von C. Körting

Tabelle A3: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Primer; *zum Sequenzieren verwendet; **fluoreszent markiert.

Name	Sequenz (5'-3')	Name	Sequenz (5'-3')
Act1	GTA GGT GAT GAA GCC CAG AGC	**TnH7-R1**	TTG CAC CAG CTG ATG TTT GAC
Act2	AGG GAG CTC GTA GCT CTT CTC	**UNIV(-47)***	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC
CEQ-FOR (M13)*	GTA AAA CGA CGG CCA GT	**XCRIPT2-F2**	TTT GAC CCT TAC AGC AAG ACG G
CEQ-REV (M13)*	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC	**XCRIPT2-F3**	GGA ATC TGT GCT ATG TGT GG
Cy5-M13-REV2**	TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC	**XCRIPT2-R2**	ATG CAT ACA TTT TCA AAG AAG C
Cy5-M13-UP**	GAC GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG	**XCRIPT-F1**	CAC ATC GGA AAC ATG GTT TGT G
INV1new	GCT GCT GAG CCC TGA ATG TG	**Xcript-F4**	GGC GCA AGT TGA ACG AAA AC
JD 1002	CAC AGA ATC TGA AGG ATC CG	**Xcript-F5**	GTG AGA AGA AGC TTG GTA GAG
JD1001	GCA GTA GAA ATC TAA AAG GG	**XCRIPT-R1**	TGT CAG CAT TTT GTT TTC GTT
K09-F1*	TGC AGC TCT CAG CAG TTG G	**XCRIPT-R3**	TTT CAC TCA AAT TCA ACA CAG C
K09-F2*	ATT GAT ATT CAT CAA TCC CAG	**XDC-2-F1**	ACC ACA GTG GCT GAG AAG TG
K09-F3*	GCA CTT ATT CTA CCT CGA	**XDC-2-R1**	TCT CTT TGT TAC AGC CAG TC
K09-F4*	CTG AGT AAG AAC GTA AGG	**XDM1-R1***	GGG TAC ATA AGT CGA ATC TC
K09-F5*	AAT TGA AGT TAC ATT AAC TAG	**XDM1-R2***	AAC ATG GAG CTG GTG GCG TG
K09-F6*	CGT CTT GAG AGT GTA AAG AG	**XDM4-F1**	CCA GTA GCA GTA GCT TAC AC
K09-R1*	TGG AAG CAG TCA CTA TTC AG	**XDM4-F2**	ATG CAC ACT TAG ATA TGA GC
K09-R2*	TGA TTT GAT TCA CAG TAG ATC	**XDM4-R1**	TCT GTG TAT GAT CAT AGA TG
K09-R3*	GCA GTC ACT ATT CAG TTG	**XDM4-R2**	TCA GCA CCA TTT ACT AAT CC
K09-R4*	AAT TAG CAA ATC TCT GGT AC	**Xfor**	CTT ACG TTG AAA GCA CGT GA
mcr-K-R1*	AGC ATT GAG TAA TTC TGC AGT	**Xmcr1-F1**	GAA CTC CAC GGC TCA GCA AG
mcr-L-F1*	TGA GAT TAC TTT ATG TCT CC	**Xmcr1-F10**	CCT TTC ACC GTT TCT CCT CCA
mcr-L-R1*	TTT AGC ACA CCT AGC TTC C	**Xmcr1-F2**	ATT CCT CTG CTG GCT GCT AC
mcr-M-F1*	CTA ATC ATG CGT AAT CTA TGG	**Xmcr1-F3**	GAG CAG CTG CCG ATT TCC ACC
mcr-M-R1*	TTT GAT GGC ACC ATT CAC AG	**Xmcr1-F4**	GCT GGT GTA TTA GCT TTC TG
pAF44-F1*	ACA GGC CTG AGG CAG AGC AAG	**Xmcr1-F5**	GTC GCA CTT CAA CAT GTA CC
pAF44-F2*	GCA CTC TAC ATC GCA GCT CAG	**Xmcr1-R1**	AAG GCG TTG GAG ACG CTG AC
pAF44-F3*	GCA CAG TAC ATT ATA GAC	**Xmcr1-R2**	AGC ATG TCA GCG ACC GCT
pAF44-R1*	GAG ATA GTT GCC CAT AGA TAG	**Xmcr1-R3**	AGA AGA TCT CCT TAA AGG TC
pAF44-R2*	GTA AGA TCC TGA CCT GCC ATG	**Xmcr1-R4**	CAG AAA GCT AAT ACA CCA GC
pAF44-R3*	AGG GTT GAA TCC TAT ATT GT	**Xmcr1-R5**	GAC ATT TCA GGC TCT TCA TCC
pAF44-R4*	CCT AAT TTG TGA TGC AAC ATG	**Xmcr1-R6**	AAA AAC ATC ATA TGC TGA AGC
REV(-48)*	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA	**Xmcr2-R1**	GTT TGA CTG AAA ATA AAA ACA
Rex4-end-F1	GAA CAG TGG GCA ATG TCT TC	**Xmcr2-R2**	ACT AGC ATG ACA AGC AAC CAG
Rex4-int-F1	GGT GGT AAG ATG CCA AAA GG	**Xmcr-DC2-F1**	TGG ACC GCT CCA AAC ATT CC
Rex4-int-R1	TTC TAG CGC CTT GGT CAC TG	**Xmcr-DC2-R1**	TGA TGT ATC CTG GCA GCT TC
Rex4-LTR2	GCT CCA GAC ACG CAC CAT GC	**Xrev**	AAA GGA GGC TTC ATG GAG GG
Rex4-LTR3	GTC GAG TTT AAA TCA CAA CAG	**Yfor**	TTT GGT GTC TTA CTT CTG TG
Rex4-LTR4	CTT GCT TTT TTA GAT GTG TTG	**Yrev**	TTC CTC CTA CTT GGC TAA AC
TnH7-F1	TCA CAC GAT GGG GCA CTA AAC	**ZDM1-F1***	TTT GGA TGG AGA GCA GGA TC

9. Abkürzungen und Einheiten

Abb.	Abbildung
AGRP	Agouti-related protein
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BC	Backcross
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine; Rinderserumalbumin
Ci	Curie (entspricht 37 Giga-Becquerel)
CRIPT	Cysteine-rich interactor of PDZ3
DEPC	Diethylpyrocarbonat, Inhibitor von RNase
DEPC-H_2O	mit Diethylpyrocarbonat versetztes Wasser
dH_2O	destilliertes Wasser/ Wasser höchster verfügbarer Reinheit
Dmrt	*Doublesex* and *mab-3* related transcription factor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
egfrb	epidermal growth factor receptor b
EtOH	Ethanol
h	Stunden
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethanolsulfonsäure
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactosid
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
lof	"*loss of function*"–Mutante des Tumor-Phänotyps
M	Molarität einer Lösung
Mc4r	Melanocortin-Rezeptor Typ 4
Mdl	Makromelanophoren-bestimmender Locus in *Xiphophorus*
nt	Nukleotide
ORF	offenes Leseraster
P	"*puberty*"; Pubertäts-Locus in *Xiphophorus*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
ps-x	Pseudogen des Gens x

R	Tumorregulatorlocus in *Xiphophorus*
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
RY	"*red-yellow*"; Pigmentmusterlocus in *Xiphophorus*
SD	"*sex-determination*"; Geschlechtsbestimmungslocus in *Xiphophorus*
Sd	"*spotted dorsal*"; Makromelanophorenmuster in *Xiphophorus*
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRY	Sex-determining region on Y chromosome
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
Tab.	Tabelle
U	Units (Maß für Enzymaktivität)
UTR	untranslatierte Region
Xgal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-beta-D-galactosid
Xmrk	*Xiphophorus* melanoma receptor kinase

10. Literatur

Adam, D., Dimitrijevic, N. and Schartl, M. (1993): Tumor suppression in *Xiphophorus* by an accidentally acquired promoter. *Science* **259** (5096) pp. 816-9.

Ahuja, M.R. & Anders, F. (1976): A genetic concept of the origin of cancer, based in part upon studies on neoplasms in fishes. *Prog Exp Tumor Res* **20** pp. 380-97.

Altschmied, J., Ditzel, L. and Schartl, M. (1997a): Hypomethylation of the *Xmrk* oncogene promoter in melanoma cells of *Xiphophorus*. *Biol Chem* **378** (12) pp. 1457-66.

Altschmied, J., Hornung, U., Schlupp, I., Gadau, J., Kolb, R. and Schartl, M. (1997b): Isolation of DNA suitable for PCR for field and laboratory work. *Biotechniques* **23** (2) pp. 228-9.

Anand, R. (1986): Pulsed field gel electrophoresis: a technique for fractionating large DNA molecules. *Trends Genet* **2** pp. 278-83.

Anders, A., Anders, F., Zechel, C., Schleenbecker, U. and Smith, A. (1990): Ansätze zur Analyse der Initiation von Initialprozessen der Krebsbildung am Melanom-Modell *Xiphophorus* [Attempts at analyzing the initiation of the initial processes of carcinogenesis based on the *Xiphophorus* melanoma model]. *Arch Geschwulstforsch* **60** (4) pp. 249-63.

Anders, F., Schartl, 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** pp. 191-275.

Anders, F. (1991): Contributions of the Gordon-Kosswig melanoma system to the present concept of neoplasia. *Pigment Cell Res* **4** (1) pp. 7-29.

Aparicio, S. (2000): Vertebrate evolution: recent perspectives from fish. *Trends Genet* **16** (2) pp. 54-6.

Aparicio, S., Chapman, J., Stupka, E., et al. (2002): Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* **297** (5585) pp. 1301-10.

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** (1) pp. 69-79.

Bachtrog, D. (2003): Accumulation of *Spock* and *Worf*, two novel non-LTR Retrotransposons, on the neo-Y Chromosome of *Drosophila miranda*. *Mol Biol Evol* **20** (2) pp. 173-81.

Baroiller, J.F., Guiguen, Y. and Fostier, A. (1999): Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell Mol Life Sci* **55** pp. 910-31.

Baudler, M., Duschl, J., Winkler, C., Schartl, M. and Altschmied, J. (1997): Activation of transcription of the melanoma inducing *Xmrk* oncogene by a GC box element. *J Biol Chem* **272** (1) pp. 131-7.

Bernhardt, W. (2001): Untersuchungen von Melanocortinrezeptor-verwandten Genen in *Xiphophorus*. Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.

Blin, N. & Stafford, D.W. (1976): A general method for isolation of high molacular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **3** pp. 2303-8.

Brunner, B., Hornung, U., Shan, Z., Nanda, I., Kondo, M., Zend-Ajusch, E., Haaf, T., Ropers, H.H., Shima, A., Schmid, M., Kalscheuer, V.M. and Schartl, M. (2001): Genomic organization and expression of the *doublesex*-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for *DMRT1*. *Genomics* **77** (1-2) pp. 8-17.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1989): Xl1-blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with b-galactosidase selection. *Bio Techniques* **5** (4) pp. 376-9.

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** pp. 230-2.

Canning, C.A. & Lovell-Badge, R. (2002): *Sry* and sex determination: how lazy can it be? *Trends Genet* **18** (3) pp. 111-3.

Cerda-Reverter, J.M., Ringholm, A., Schioth, H.B. and Peter, R.E. (2003): Molecular cloning, pharmacological characterization, and brain mapping of the melanocortin 4 receptor in the goldfish: involvement in the control of food intake. *Endocrinology* **144** (6) pp. 2336-49.

Charlesworth, B. & Charlesworth, D. (2000): The degeneration of Y chromosomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355** (1403) pp. 1563-72.

Degtyareva, N.P., Greenwell, P., Hofmann, E.R., Hengartner, M.O., Zhang, L., Culotti, J.G. and Petes, T.D. (2002): *Caenorhabditis elegans* DNA mismatch repair gene *msh-2* is required for microsatellite stability and maintenance of genome integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (4) pp. 2158-63.

Del Sal, G., Manfioletti, G. and Schneider, C. (1989): The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques* **7** (5) pp. 514-20.

Dimitrijevic, N., Winkler, C., Wellbrock, C., Gomez, A., Duschl, J., Altschmied, J. and Schartl, M. (1998): Activation of the *Xmrk* proto-oncogene of *Xiphophorus* by overexpression and mutational alterations. *Oncogene* **16** (13) pp. 1681-90.

Drouin, G., Prat, F., Ell, M. and Clarke, G.D. (1999): Detecting and characterizing gene conversions between multigene family members. *Mol Biol Evol* **16** (10) pp. 1369-90.

Ellegren, H. (2002): Dosage compensation: do birds do it as well? *Trends Genet* **18** (1) pp. 25-8.

Esposito, T., Gianfrancesco, F., Ciccodicola, A., Montanini, L., Mumm, S., D'Urso, M. and Forabosco, A. (1999): A novel pseudoautosomal human gene encodes a putative protein similar to Ac-like transposases. *Hum Mol Genet* **8** (1) pp. 61-7.

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** (1-2) pp. 81-9.

Florijn, R.J., Bonden, L.A., Vrolijk, H., Wiegant, J., Vaandrager, J.W., Baas, F., den Dunnen, J.T., Tanke, H.J., van Ommen, G.J. and Raap, A.K. (1995): High-resolution DNA Fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar- coding of large genes. *Hum Mol Genet* **4** (5) pp. 831-6.

Froschauer, A., Körting, 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* **3** pp. 72-80.

Froschauer, A., Körting, 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** (2) pp. 247-54.

Fryssira (1998): 46, XY, del(2)(q32-qter) in a female with multiple congenital abnormalities. *Eur J Hum Genet [Suppl 1]* **6** pp. 88.

Gomez, A., Wellbrock, C., Gutbrod, H., Dimitrijevic, N. and Schartl, M. (2001): Ligand independent dimerization and activation of the oncogenic *Xmrk* receptor by two mutations in the extracellular domain. *J Biol Chem* **276** (5) pp. 3333-40.

Gordon, M. (1927): The genetics of viviparous top-minnow *Platypoecilus*: the inheritance of two kinds of melanophores. *Genetics* **12** pp. 253-83.

Graham, P., Penn, J.K. and Schedl, P. (2003): Masters change, slaves remain. *Bioessays* **25** (1) pp. 1-4.

Graves, J.A. (1998): Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes. *J Exp Zool* **281** (5) pp. 472-81.

Graves, J.A., Wakefield, M.J. and Toder, R. (1998): The origin and evolution of the pseudoautosomal regions of human sex chromosomes. *Hum Mol Genet* **7** (13) pp. 1991-6.

Graves, J.A. & Shetty, S. (2001): Sex from W to Z: Evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *J Exp Zool* **290** (5) pp. 449-62.

Graves, J.A. (2002): Sex chromosomes and sex determination in weird animals. *Cytogenet Genome Res* **96** pp. 161-8.

Guan, G., Kobayashi, T. and Nagahama, Y. (2000): Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab-3)- domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem Biophys Res Commun* **272** (3) pp. 662-6.

Gutbrod, H. & Schartl, M. (1999): Intragenic sex-chromosomal crossovers of *Xmrk* oncogene alleles affect pigment pattern formation and the severity of melanoma in *Xiphophorus*. *Genetics* **151** (2) pp. 773-83.

Hanahan, D.: Techniques for transformation of *E. coli.* In: Glover, D.M. (Ed.), DNA cloning. *IRL Press*, Oxford, 1995, pp. 109-35.

Heery, D.M., Gannon, F. and Powell, R. (1990): A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends Genet* **6** (6) pp. 173.

Hinegardner, R. & Rosen, D.E. (1972): Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. *Am Naturalist* **106** pp. 621-44.

Ho, G. & MacKenzie, R.G. (1999): Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity. *J Biol Chem* **274** (50) pp. 35816-22.

Horie, M., Mitsumoto, Y., Kyushiki, H., Kanemoto, N., Watanabe, A., Taniguchi, Y., Nishino, N., Okamoto, T., Kondo, M., Mori, T., Noguchi, K., Nakamura, Y., Takahashi, E. and Tanigami, A. (2000): Identification and characterization of TMEFF2, a novel survival factor for hippocampal and mesencephalic neurons. *Genomics* **67** (2) pp. 146-52.

Hurst, L.D. & Randerson, J.P. (1999): An eXceptional chromosome. *Trends Genet* **15** (10) pp. 383-5.

Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X. and Nunez, G. (1998): CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J* **17** (9) pp. 2526-33.

Jackson, I.J. (1999): The mahogany mouse mutation: further links between pigmentation, obesity and the immune system. *Trends Genet* **15** (11) pp. 429-31.

Jordan, S.A. & Jackson, I.J. (1998): Melanocortin receptors and antagonists regulate pigmentation and body weight. *Bioessays* **20** (8) pp. 603-6.

Just, W., Baumstark, A., Hameister, H., Schreiner, B., Reisert, I., Hakhverdyan, M. and Vogel, W. (2002): The sex determination in *Ellobius lutescens* remains bizarre. *Cytogenet Genome Res* **96** (1-4) pp. 146-53.

Kallman, K.D. & Schreibman, M.P. (1973): A sex-linked gene controlling gonadotrop differentiation and its significance in determining the age of sexual maturation and size of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Gen Comp Endocrinol* **21** (2) pp. 287-304.

Kallman, K.D.: The platyfish, *Xiphophorus maculatus*. In: King, R.C. (Ed.), Handbook of genetics. *Plenum*, New York, 1975, pp. 81-132.

Kallman, K.D.: A new look at sex determination in poeciliid fishes. In: Turner, B.J. (Ed.), Evolutionary Genetics in Fishes. *Plenum*, New York, 1984, pp. 95-171.

Kim, C.S., Lee, S.H., Kim, R.Y., Kim, B.J., Li, S.Z., Lee, I.H., Lee, E.J., Lim, S.K., Bae, Y.S., Lee, W. and Baik, J.H. (2002): Identification of domains directing specificity of coupling to G-proteins for the melanocortin MC3 and MC4 receptors. *J Biol Chem* **277** (35) pp. 31310-7.

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., Schartl, M. and Shima, A. (2002): Molecular cloning and characterization of *DMRT* genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Gene* **295** (2) pp. 213-22.

Kondo, M., Nanda, I., Hornung, U., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Schmid, M., Shima, A. and Schartl, M. (2003): Absence of the Candidate Male Sex-Determining Gene *dmrt1b(Y)* of Medaka from Other Fish Species. *Curr Biol* **13** (5) pp. 416-20.

Koopman, P., Bullejos, M. and Bowles, J. (2001): Regulation of male sexual development by *Sry* and *Sox9*. *J Exp Zool* **290** (5) pp. 463-74.

Koopman, P. & Loffler, K.A. (2003): Sex determination: the fishy tale of *dmrt1*. *Curr Biol* **13** (5) pp. R177-9.

Kosswig, C. (1928): Über Bastarde der Teleostier *Platypoecilus* und *Xiphophorus*. *Z. Indukt. Abstammungs-Vererbungsl.* **44** pp. 150-8.

Kuhn, C., Vielkind, U. and Anders, F. (1979): Cell cultures derived from embryos and melanoma of poeciliid fish. *In Vitro* **15** (7) pp. 537-44.

Lahn, B.T. & Page, D.C. (1999): Retroposition of autosomal mRNA yielded testis-specific gene family on human Y chromosome. *Nat Genet* **21** (4) pp. 429-33.

Lahn, B.T., Pearson, N.M. and Jegalian, K. (2001): The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nat Rev Genet* **2** (3) pp. 207-16.

Lamatsch, D.K., Steinlein, C., Schmid, M. and Schartl, M. (2000): Noninvasive determination of genome size and ploidy level in fishes by flow cytometry: detection of triploid *Poecilia formosa*. *Cytometry* **39** (2) pp. 91-5.

Lamontagne, B., Larose, S., Boulanger, J. and Elela, S.A. (2001): The RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. *Curr Issues Mol Biol* **3** (4) pp. 71-8.

Le Poole, I.C., Sarangarajan, R., Zhao, Y., Stennett, L.S., Brown, T.L., Sheth, P., Miki, T. and Boissy, R.E. (2001): '*VIT1*', a novel gene associated with vitiligo. *Pigment Cell Res* **14** (6) pp. 475-84.

Logan, D.W., Bryson-Richardson, R.J., Pagan, K.E., Taylor, M.S., Currie, P.D. and Jackson, I.J. (2003): The structure and evolution of the melanocortin and MCH receptors in fish and mammals. *Genomics* **81** (2) pp. 184-91.

Marin, I. & Baker, B.S. (1998): The evolutionary dynamics of sex determination. *Science* **281** (5385) pp. 1990-4.

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** (6888) pp. 559-63.

Matsuda, M., Sato, T., Toyazaki, Y., Nagahama, Y., Hamaguchi, S. and Sakaizumi, M. (2003): *Oryzias curvinotus* has *DMY*, a gene that is required for male development in the medaka, *O. latipes*. *Zoolog Sci* **20** (2) pp. 159-61.

Mäueler, W., Schartl, A. and Schartl, M. (1993): Different expression patterns of oncogenes and proto-oncogenes in hereditary and carcinogen-induced tumors of *Xiphophorus*. *Int J Cancer* **55** (2) pp. 288-96.

Meng, A., Moore, B., Tang, H., Yuan, B. and Lin, S. (1999): A *Drosophila* doublesex-related gene, *terra*, is involved in somitogenesis in vertebrates. *Development* **126** (6) pp. 1259-68.

Meyer, M.K. & Schartl, M. (2002): *Xiphophorus mayae,* a new species of swordtail from Guatemala (Teleostei: Poeciliidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters* **13** (1) pp. 59-66.

Miles, C.G., Rankin, L., Smith, S.I., Niksic, M., Elgar, G. and Hastie, N.D. (2003): Faithful expression of a tagged Fugu WT1 protein from a genomic transgene in zebrafish: efficient splicing of pufferfish genes in zebrafish but not mice. *Nucleic Acids Res* **31** (11) pp. 2795-802.

Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L. and Wu, J.R. (1988): A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** (18) pp. 6622-6.

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** (3) pp. 301-8.

Nanda, I., Weis, S., Fornzler, D., Altschmied, J., Schartl, M. and Schmid, M. (1996): Clustered organization and conservation of the *Xiphophorus maculatus* D locus, which includes two distinct gene sequences. *Chromosoma* **105** (4) pp. 242-9.

Nanda, I., Shan, Z., Schartl, M., Burt, D.W., Koehler, M., Nothwang, H., Grutzner, F., Paton, I.R., Windsor, D., Dunn, I., Engel, W., Staeheli, P., Mizuno, S., Haaf, T. and Schmid, M. (1999): 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nat Genet* **21** (3) pp. 258-9.

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** (3) pp. 173-80.

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** (18) pp. 11778-83.

Niethammer, M., Valtschanoff, J.G., Kapoor, T.M., Allison, D.W., Weinberg, T.M., 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** (4) pp. 693-707.

Ottolenghi, C., Veitia, R., Quintana-Murci, L., Torchard, D., Scapoli, L., Souleyreau-Therville, N., Beckmann, J., Fellous, M. and McElreavey, K. (2000): The region on 9p associated with 46,XY sex reversal contains several transcripts expressed in the urogenital system and a novel doublesex- related domain. *Genomics* **64** (2) pp. 170-8.

Passafaro, M., Sala, C., Niethammer, M. and Sheng, M. (1999): Microtubule binding by CRIPT and its potential role in the synaptic clustering of PSD-95. *Nat Neurosci* **2** (12) pp. 1063-9.

Pasteris, N.G., Trask, B.J., Sheldon, S. and Gorski, J.L. (1993): Discordant phenotype of two overlapping deletions involving the *PAX3* gene in chromosome 2q35. *Hum Mol Genet* **2** (7) pp. 953-9.

Pontiggia, A., Rimini, R., Harley, V.R., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R. and Bianchi, M.E. (1994): Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J* **13** pp. 6115-24.

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** (6668) pp. 691-5.

Raymond, C.S., Parker, E.D., Kettlewell, J.R., Brown, L.G., Page, D.C., Kusz, K., Jaruzelska, J., Reinberg, Y., Flejter, W.L., Bardwell, V.J., Hirsch, B. and Zarkower, D. (1999): A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet* **8** (6) pp. 989-96.

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** (10) pp. 2887-90.

Ringholm, A., Fredriksson, R., Poliakova, N., Yan, Y.L., Postlethwait, J.H., Larhammar, D. and Schiöth, H.B. (2002): One melanocortin 4 and two melanocortin 5 receptors from zebrafish show remarkable conservation in structure and pharmacology. *J Neurochem* **82** (1) pp. 6-18.

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** (3-4) pp. 123-33.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230** (4732) pp. 1350-4.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. *Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

Sanger, F. (1981): Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* **214** pp. 1205-10.

Schartl, A. & Schartl, M. (1990): Genes and Cancer: Molecular biology of the Melanoma Oncogene of *Xiphophorus*. *BFE* **7** (6) pp. 461-6.

Schartl, M. (1988): A sex chromosomal restriction-fragment-length marker linked to melanoma-determining *Tu* loci in *Xiphophorus*. *Genetics* **119** (3) pp. 679-85.

Schartl, M. (1990): Homology of melanoma-inducing loci in the genus *Xiphophorus*. *Genetics* **126** (4) pp. 1083-91.

Schartl, M. (1995): Platyfish and swordtails: a genetic system for the analysis of molecular mechanisms in tumor formation. *Trends Genet* **11** (5) pp. 185-9.

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** (3) pp. 1385-94.

Scherer, S.J., Maier, S.M., Seifert, M., Hanselmann, R.G., Zang, K.D., Muller-Hermelink, H.K., Angel, P., Welter, C. and Schartl, M. (2000): p53 and c-Jun functionally synergize in the regulation of the DNA repair gene *hMSH2* in response to UV. *J Biol Chem* **275** (48) pp. 37469-73.

Schiöth, H.B. & Watanobe, H. (2002): Melanocortins and reproduction. *Brain Research Reviews* **38** pp. 340-50.

Schiöth, H.B., Raudsepp, T., Ringholm, A., Fredriksson, R., Takeuchi, S., Larhammar, D. and Chowdhary, B.P. (2003): Remarkable synteny conservation of melanocortin receptors in chicken, human, and other vertebrates. *Genomics* **81** (5) pp. 504-9.

Schreibman, M.P., Schartl, M., Kallman, K.D. and Magliulo-Cepriano, L.: Molecular approaches to study the genetic regulation of the fish reproductive system. In: Davey, K.G., Peter, R.E. and Tobe, S.S. (Eds.), Perspectives in Comparative Endocrinology. *Natl Res Council of Canada*, Ottawa, 1994, pp. 343-51.

Schultheis, C. (2003): Molekulare Analyse der Geschlechtsbestimmungsregion der Gonosomen des Platyfisches *Xiphophorus maculatus*. Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.

Schwab, M. (1982): Genome organization in *Xiphophorus* (Poeciliidae; Telostei). *Mol Gen Genet* **188** (3) pp. 410-7.

Schwartz, D.C. & Cantor, C.R. (1984): Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37** (1) pp. 67-75.

Selz, Y. (2003): Funktionelle Untersuchungen zur Rolle der Melanocortin-Rezeptoren in der Melanombildung bei dem Fisch *Xiphophorus*. Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.

Shima, A., Himmelbauer, H., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Wittbrodt, J. and Schartl, M. (2003): Fish genomes flying. *EMBO Rep* **4** (2) pp. 121-5.

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** (6281) pp. 240-4.

Slavotinek, A., Schwarz, C., Getty, J.F., Stecko, O., Goodman, F. and Kingston, H. (1999): Two cases with interstitial deletions of chromosome 2 and sex reversal in one. *Am J Med Genet* **86** (1) pp. 75-81.

Smith, C.A., Katz, M. and Sinclair, A.H. (2003): *DMRT1* Is Upregulated in the Gonads During Female-to-Male Sex Reversal in ZW Chicken Embryos. *Biol Reprod* **68** (2) pp. 560-70.

Southern, E.M., Anand, R., Brown, W.R. and Fletcher, D.S. (1987): A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **15** (15) pp. 5925-43.

Swofford, D.L.: PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. *Sinauer Associates*, Sunderland, Massachusetts, 2003.

Thuring, R.W., Sanders, J.P. and Borst, P. (1975): A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Anal Biochem* **66** (1) pp. 213-20.

Trask, B.J. (1991): Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet* **7** (5) pp. 149-54.

Traut, W. & Winking, H. (2001): Meiotic chromosomes and stages of sex chromosome evolution in fish: zebrafish, platyfish and guppy. *Chromosome Res* **9** (8) pp. 659-72.

Uchida, T., Wada, K., Akamatsu, T., Yonezawa, M., Noguchi, H., Mizoguchi, A., Kasuga, M. and Sakamoto, C. (1999): A novel epidermal growth factor-like molecule containing two follistatin modules stimulates tyrosine phosphorylation of erbB-4 in MKN28 gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **266** (2) pp. 593-602.

Van der Ploeg, L.H., Martin, W.J., Howard, A.D., et al. (2002): A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (17) pp. 11381-6.

Veith, A.-M., Froschauer, A., Körting, 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* (im Druck)

Vente, A., Korn, B., Zehetner, G., Poustka, A. and Lehrach, H. (1999): Distribution and early development of microarray technology in Europe. *Nat Genet* **22** (1) pp. 22.

Vogelstein, B., Pardoll, D.M. and Coffey, D.S. (1980): Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. *Cell* **22** (1) pp. 79-85.

Volff, J.N., Körting, C., Sweeney, K. and Schartl, M. (1999): The non-LTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Mol Biol Evol* **16** (11) pp. 1427-38.

Volff, J.N., Körting, C. and Schartl, M. (2000): Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Mol Biol Evol* **17** (11) pp. 1673-84.

Volff, J.N., Körting, C., Altschmied, J., Duschl, J., Sweeney, K., Wichert, K., Froschauer, A. and Schartl, M. (2001a): *Jule* from the fish *Xiphophorus* is the first complete vertebrate *Ty3/Gypsy* retrotransposon from the *Mag* family. *Mol Biol Evol* **18** (2) pp. 101-11.

Volff, J.N., Körting, C., Froschauer, A., Sweeney, K. and Schartl, M. (2001b): Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. *J Mol Evol* **52** (4) pp. 351-60.

Volff, J.N., Körting, C., Meyer, A. and Schartl, M. (2001c): Evolution and discontinuous distribution of *rex3* retrotransposons in fish. *Mol Biol Evol* **18** (3) pp. 427-31.

Volff, J.N. & Schartl, M. (2001): Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica* **111** pp. 101-10.

Volff, J.N., Kondo, M. and Schartl, M. (2003a): Medaka *dmY/dmrt1Y* is not the universal primary sex-determining gene in fish. *Trends Genet* **19** (4) pp. 196-9.

Volff, J.N., Körting, C., Froschauer, A., Zhou, Q., Wilde, B., Schultheis, C., Selz, Y., Sweeney, K., Duschl, J., Wichert, K., Altschmied, J. and Schartl, M. (2003b): The *Xmrk* oncogene can escape non-funcionalization in a highly unstable subtelomeric region of the genome of the fish *Xiphophorus*. *Genomics* (im Druck)

Volff, J.N. & Schartl, M. (2003): Evolution of signal transduction by gene and genome duplication in fish. *J Struct Funct Genomics* **3** (1) pp. 139-50.

Volff, J.N., Zarkower, D., Bardwell, V.J. and Schartl, M. (2003c): Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans. *J Mol Evol* (im Druck)

Wakamatsu, Y. (1981): Establishment of a cell line from the platyfish-swordtail hybrid melanoma. *Cancer Res* **41** (2) pp. 679-80.

Weis, S. & Schartl, M. (1998): The macromelanophore locus and the melanoma oncogene *Xmrk* are separate genetic entities in the genome of *Xiphophorus*. *Genetics* **149** (4) pp. 1909-20.

Wiegant, J., Kalle, W., Mullenders, L., Brookes, S., Hoovers, J.M., Dauwerse, J.G., van Ommen, G.J. and Raap, A.K. (1992): High-resolution in situ hybridization using DNA halo preparations. *Hum Mol Genet* **1** (8) pp. 587-91.

Wikberg, J.E., Muceniece, R., Mandrika, I., Prusis, P., Lindblom, J., Post, C. and Skottner, A. (2000): New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol Res* **42** (5) pp. 393-420.

Wilfinger, W.W., Mackey, K. and Chomczynski, P. (1997): Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22** (3) pp. 474-6, 8-81.

Wilhelm, J., Pingoud, A. and Hahn, M. (2003): Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Res* **31** (10) pp. E56.

Winkler, C., Wittbrodt, J., Lammers, R., Ullrich, A. and Schartl, M. (1994): Ligand-dependent tumor induction in medakafish embryos by a *Xmrk* receptor tyrosine kinase transgene. *Oncogene* **9** (6) pp. 1517-25.

Wittbrodt, J., Adam, D., Malitschek, B., Mäueler, 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** (6241) pp. 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** (11) pp. 4239-46.

Wittbrodt, J., Shima, A. and Schartl, M. (2002): Medaka - a model organism from the far East. *Nat Rev Genet* **3** (1) pp. 53-64.

Wu, H., Xu, H., Miraglia, L.J. and Crooke, S.T. (2000): Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J Biol Chem* **275** (47) pp. 36957-65.

Yang, Y., Chen, M., Lai, Y., Gantz, I., Yagmurlu, A., Georgeson, K.E. and Harmon, C.M. (2003): Molecular determination of agouti-related protein binding to human melanocortin-4 receptor. *Mol Pharmacol* **64** (1) pp. 94-103.

Yeo, G.S., Farooqi, I.S., Aminian, S., Halsall, D.J., Stanhope, R.G. and O'Rahilly, S. (1998): A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* **20** (2) pp. 111-2.

Yeo, G.S., Lank, E.J., Farooqi, I.S., Keogh, J., Challis, B.G. and O'Rahilly, S. (2003): Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. *Hum Mol Genet* **12** (5) pp. 561-74.

Zarkower, D. (2001): Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat Rev Genet* **2** (3) pp. 175-85.

Publikationen

Nanda, I., Volff, J.N., Weis, S., Körting, 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** (3) pp. 173-80.

Froschauer, A., Körting, 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* **3** (7) pp. 72-80.

Volff, J.N., Körting, 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** (2) pp. 101-11.

Volff, J.N., Körting, C., Froschauer, A., Sweeney, K. and Schartl, M. (2001): Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. *J Mol Evol* **52** (4) pp. 351-60.

Froschauer, A., Körting, 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** (2) pp. 247-54.

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., Schartl, M. and Shima, A. (2002): Molecular cloning and characterization of *DMRT* genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Gene* **295** (2) pp. 213-22.

Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Froschauer, A., Jaillon, O., Coutanceau, J.P., Körting, C., Weissenbach, J., Bernot, A. and Volff, J.N. (2003): An active non-LTR retrotransposon with tandem structure in the compact genome of the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Genome Res* **13** (7) pp. 1686-95.

Volff, J.N., Froschauer, A., Körting, C., Bernhardt, W., Nanda, I., Schultheis, C., Schmid, M. and Schartl, M.: Genome fluidity in the fish *Xiphophorus*. In: Shimizu, N., Aoki, T., Hirono, I. and Takashima, F. (Eds.), Aquatic Genomics. *Springer*, Tokyo, 2003, pp. 185-94.

Veith, A.-M., Froschauer, A., Körting, 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* (im Druck).

Volff, J.N., Körting, 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 non-funcionalization in a highly unstable subtelomeric region of the genome of the fish *Xiphophorus*. *Genomics* (im Druck).

Konferenzbeiträge

M. Schartl, J. Altschmied, H. Gutbrod, B. Wilde, A. Froschauer, C. Körting and J.-N. Volff (1999): Pigment pattern genes that act as tumor modifiers in melanoma of *Xiphophorus*. *XVIIth International Pigment Cell Conference, Nagoya, Japan* (Poster von MS). *Pigment Cell Research* **7** (Suppl.): 82.

A. Froschauer, C. Körting, K. Sweeney, K. Wichert, J. Duschl, H. Gutbrod, J. Altschmied, I. Nanda, M. Schmid, M. Schartl and J.-N. Volff (1999): Candidate genes for melanoma phenotype in the *Xmrk* oncogene region of *Xiphophorus*. *Jahrestagung der Gesellschaft fuer Genetik, Munich, Germany* (Poster von AF). *Genes, Chromosomes, Genomes* **7**: 78

A. Froschauer, W. Bernhardt, C. Körting, M. Vucic, M. Schartl and J.-N. Volff (2001): Sex chromosome-specific gene duplications in the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Frühjahrsakademie der Gesellschaft für Genetik: Development and Evolution: the Effect of Gene and Genome Duplication, Wittenberg, Germany* (Poster von AF).

J.-N. Volff, A. Froschauer, W. Bernhardt, C. Körting, I. Nanda, M. Schmid and M. Schartl (2001): Genome plasticity and retroelements in the sex chromosomes of the platyfish *Xiphophorus*. *14th International Chromosome Conference, Würzburg, Germany* (Vortrag von JNV). *Chromosome Research* **9** (Suppl. 1): 57.

A. Froschauer, W. Bernhardt, C. Körting, M. Vucic, I. Nanda, M. Schmid, M. Schartl and J.-N. Volff (2001): Molecular anatomy of the sex chromosomes of the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *14th International Chromosome Conference, Würzburg, Germany* (Poster von AF). *Chromosome Research* **9** (Suppl. 1): 121.

A. Froschauer, W. Bernhardt, C. Körting, Y. Selz, M. Schartl and J.-N. Volff (2001): Sex determination variability and sex chromosome plasticity in fish. *Annual Meeting of the German Genetics Society, Halle, Germany* (Poster von JNV). *Genes, Chromosomes, Genomes* **8**: 47.

A-M. Veith, A. Froschauer, C. Körting, R. Hanel and J.-N. Volff (2002): *DMRT* Genes and Sex Determination in the Fish *Xiphophorus*. *Gemeinsame Herbsttagung von GBM und DGPT, Halle (Saale),Germany, 7.-10.09.2002* (Poster von AMV)

Y. Selz, A. Froschauer, Q. Zhou, C. Körting, R. Hanel, W. Bernhardt, C. Schultheis, M. Schartl and 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, 7.-9.11.2002* (Poster von YS).

R. Hanel, A. Froschauer, C. Körting, A.-M. Veith, W. Bernhardt, Q. Zhou, M. Schartl, J.-N. Volff (2002) Sex determination variability and sex chromosome plasticity in the fish *Xiphophorus*. *6th Evolutionary Biology Meeting, Muséum d'Histoire Naturelle, Palais Longchamp, Marseille, France* (Vortrag von RH)

A. Froschauer, C. Körting, A.-M. Veith, W. Bernhardt, Q. Zhou, R. Hanel und J.-N. Volff (2002): Positionelle Klonierung des Gens für Geschlechtsbestimmung im Platyfish *Xiphophorus*. *1. BioFuture Meeting, Berlin, Germany, 28.-29.01.2002* (Poster von JNV)

Q. Zhou, A.-M. Veith, C. Körting, C. Schultheis, Y. Selz, M. Vucic, R. Hanel, P. Bienert, M. Naciri, A. Froschauer und J.-N. Volff (2003): Positionelle Klonierung des Gens für Geschlechtsbestimmung im Platyfisch *Xiphophorus*. *2. Biofuture Meeting, Berlin, Germany, January 2003* (Poster von JNV).

A. Froschauer, C. Schultheis, Q. Zhou, C. Körting, M. Vucic, Y. Selz, R. Hanel, I. Nanda, M. Schartl and J.–N. Volff (2003): Gene duplications and genomic plasticity in the *Xmrk* oncogene region of the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *12th International AEK Cancer Congress, Würzburg, Germany* (Poster von AF).

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

A. Froschauer, C. Schultheis, Q. Zhou, C. Körting, M. Vucic, Y. Selz, R. Hanel, I. Nanda, M. Schartl and J.–N. Volff (2003): Molecular anatomy of the sex chromosomes of the platyfish. *Evolutions- und Entwicklungbiologie der Fische: Meeting der Arbeitsgruppen Physiologische Chemie I, Universität Würzburg (Prof. Dr. M. Schartl) und dem Lehrstuhl für Entwicklungsbiologie der Universität Konstanz (Prof. Dr. Axel Meyer), Freiburg, Germany, 22. 02. 2003* (Vortrag von AF).

J.–N. Volff, A.-M. Veith, A. Froschauer, M. Kondo, U. Hornung, C. Körting, M. Schartl and C. Winkler (2003): The *Dmrt* transcription factor gene family in teleost fish. *3rd European meeting on Zebrafish and Medaka Development and Genetics, Paris, France, 11.-14.06.2003* (Poster von JNV)

A.-M. Veith, C. Winkler, A. Froschauer, M. Kondo, U. Hornung, C. Körting, M. Schartl und J.-N. Volff (2003) The *dmrt* gene family in fish. *CellbiD, Deutsche Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) and Gesellschaft für Entwicklungsbiologie (GfE), Bonn, Germany* (Poster von AMV).

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

Q. Zhou, *A. Froschauer*, C. Körting, C. Schultheis, M. Vucic, A.-M. Veith, M. Mösl, I. Nanda, M, Schmid, M. Schartl, 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* (Poster von QZ eingereicht).

C. Schultheis, A. Froschauer, C. Körting, Q. Zhou, M. Vucic, A.-M. Veith, M. Schartl, 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* (Poster von CS eingereicht).

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Alexander Froschauer
Geburtsdatum	22. Juli 1970
Geburtsort:	Ludwigshafen am Rhein/ Oggersheim
Nationalität:	deutsch

Schulausbildung:

1977 – 1981	Johann-Hoffmann-Grundschule Mutterstadt
1981 – 1990	Theodor-Heuss-Gymnasium Ludwigshafen Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulausbildung:

1991-1997	Studium der Biologie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Prüfungsfächer: Zoologie, Botanik; Humangenetik, Chemie.
1997-1998	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zoologie I, Thema: *In vivo*-Untersuchungen an *Danio rerio* zum Nachweis gentoxischer Effekte im Comet-Assay. Abschluss des Diploms
seit Dez. 1998	Dissertation am Lehrstuhl für Physiologische Chemie I der Julius-Maximilians-Universität Würzburg bei Prof. Dr. M. Schartl, Thema: Identifizierung und molekulare Analyse *Xmrk*-gekoppelter Gene in der geschlechtsbestimmenden Region des Genoms von *Xiphophorus maculatus*

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und dabei keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

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

Würzburg, 12. August 2003

(Alexander Froschauer)