



*Untersuchungen zum Einfluss der Anzahl  
primordialer Keimzellen auf die  
Geschlechtsbestimmung von Medaka,  
*Oryzias latipes**

**DISSERTATION**

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

vorgelegt von

Peter Fischer

geboren in Oettingen in Bayern

Würzburg, 2014



Eingereicht am: .....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: .....

Gutachter: .....

Gutachter: .....

Tag des Promotionskolloquiums: .....

**Ehrenwörtliche Erklärung:**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Die Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

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

-----  
(Peter Fischer)

## **Danksagung**

Am Ende meiner Zeit als Doktorand möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit in der ein oder anderen Weise beigetragen haben.

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Mentor, Doktorvater und Betreuer dieser Arbeit Prof. Dr. Manfred Scharl bedanken, der mich in allen wissenschaftlichen und persönlichen Belangen gefördert und unterstützt hat. Vielen Dank, für die Ideen, Unterstützung und Hilfe in den Jahren an diesem Lehrstuhl. Durch sein Vertrauen in mich und seine Unterstützung wurde der Erfolg dieser Arbeit ermöglicht.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Ricardo Benavente für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur dieser Arbeit.

Bei Susanne Schories, Amaury Herpin, Robin Wacker, Daniel Liedke, sowie allen anderen aktuellen und früheren Mitgliedern der Physiologische Chemie I bedanke ich mich für das kollegiale und freundschaftliche Miteinander und die Unterstützung. Sei es durch wissenschaftliche Diskussionen, Hilfe bei methodischen Belangen oder durch die Durchführung eines Experiments.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, sowie meinen Brüdern Thomas und Michael bedanken bedanken, dass sie immer an mich geglaubt haben und mich durch Taten und Worte vor und während der Entstehung der Doktorarbeit unterstützt haben. Meinen Eltern und Schwiegereltern gilt auch ein großer Dank für ihre Unterstützung. Nicht zuletzt auch hinsichtlich der Kinderbetreuung, so dass ich meine Zeit im Labor effektiv nutzen konnte.

Meiner Frau Steffi und unserer gemeinsamen Tochter Magdalena möchte ich für ihre Liebe und Unterstützung danken. Es ist schön, dass es euch gibt und ich genieße die gemeinsame Zeit!

## A) Inhaltsverzeichnis

<b>A) Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>B) Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1. <i>Mechanismen der Geschlechtsbestimmung.....</i>	<i>7</i>
1.1. <i>Genetische Geschlechtsbestimmung.....</i>	<i>8</i>
1.2. <i>Umweltbedingte Geschlechtsbestimmung.....</i>	<i>10</i>
2. <i>Geschlechtsbestimmung bei Säugetieren.....</i>	<i>11</i>
3. <i>Geschlechtsbestimmung und Geschlechtsdifferenzierung bei Fischen.....</i>	<i>11</i>
3.1. <i>Temperaturabhängige Geschlechtsbestimmung bei Fischen.....</i>	<i>12</i>
3.2. <i>Entwicklung der Keimzellen.....</i>	<i>14</i>
4. <i>Geschlechtsbestimmung bei Medaka .....</i>	<i>16</i>
5. <i>Gonadenentwicklung bei Medaka .....</i>	<i>19</i>
6. <i>Ziele der Doktorarbeit .....</i>	<i>20</i>
<b>C) Ergebnisse.....</b>	<b>22</b>
1. <i>Einfluss von unterschiedlichen Temperaturen auf die Geschlechtsbestimmung bei Medaka.....</i>	<i>22</i>
1.1. <i>Erniedrigung der Temperatur bei der Embryonalentwicklung.....</i>	<i>22</i>
1.2. <i>Erhöhung der Temperatur bei der Embryonalentwicklung.....</i>	<i>23</i>
1.3. <i>Einfluss des genetischen Hintergrunds auf die Temperatursensitivität.....</i>	<i>24</i>
2. <i>Expression von DMRT1a während der Embryonalentwicklung .....</i>	<i>26</i>
3. <i>Die Wanderung der primordialen Keimzellen und der Einfluss von sdf1a/b auf diese.....</i>	<i>31</i>
3.1. <i>Knockdown von sdf1a.....</i>	<i>32</i>
3.2. <i>Knockdown von sdf1b.....</i>	<i>35</i>
3.3. <i>Doppelknockdown von sdf1a und sdf1b .....</i>	<i>38</i>
4. <i>Manipulation der Anzahl der primordialen Keimzellen und deren Einfluss auf die Geschlechtsbestimmung.....</i>	<i>40</i>
4.1. <i>Vollständige Beseitigung der Urgeschlechtszellen .....</i>	<i>40</i>
4.2. <i>Erniedrigung der Anzahl der primordialen Keimzellen .....</i>	<i>46</i>
4.3. <i>Erhöhung der Anzahl der Urgeschlechtszellen .....</i>	<i>49</i>
5. <i>Einfluss der Temperaturerhöhung auf die Anzahl der Urgeschlechtszellen .....</i>	<i>52</i>
6. <i>Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Embryonalentwicklung und Geschlechtsbestimmung</i>	<i>54</i>
7. <i>Knockdown von fanc-L und dessen Einfluss auf die Geschlechtsbestimmung.....</i>	<i>57</i>
<b>D) Diskussion.....</b>	<b>58</b>
1. <i>Einfluss der Temperatur auf die Geschlechtsentwicklung.....</i>	<i>58</i>
2. <i>Der genetische Hintergrund beeinflusst das Verhältnis der XX-Männchen .....</i>	<i>60</i>
3. <i>Die Expression von dmrt1a unter dem Einfluss höherer Temperaturen.....</i>	<i>63</i>
4. <i>Einfluss von sdf1a/b auf die Wanderung der Urgeschlechtszellen.....</i>	<i>65</i>
5. <i>Ablation der Urgeschlechtszellen führt zur Entwicklung von Männchen.....</i>	<i>66</i>
6. <i>Erhöhung der Urgeschlechtszellen-Anzahl .....</i>	<i>68</i>
7. <i>Einfluss von hohen Temperaturen auf die Anzahl der Urgeschlechtszellen .....</i>	<i>69</i>
8. <i>Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Geschlechtsbestimmung .....</i>	<i>70</i>
9. <i>Der Einfluss von fanc-L auf die Entwicklung von Medaka.....</i>	<i>72</i>
10. <i>Die Geschlechtsausbildung von Oryzias latipes wird teilweise durch die Anzahl der PGCs bestimmt</i>	<i>73</i>
<b>E) Zusammenfassung .....</b>	<b>75</b>
<b>F) Summary .....</b>	<b>77</b>
<b>G) Material .....</b>	<b>79</b>
1. <i>Fischzucht und verwendete Stämme.....</i>	<i>79</i>
2. <i>Medien .....</i>	<i>81</i>

3.	<i>Morpholinos</i> .....	82
4.	<i>Oligonukleotide</i> .....	83
5.	<i>Technische Geräte</i> .....	83
6.	<i>Software und online-Werkzeuge</i> .....	84
<b>H)</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>86</b>
1.	<i>DNA-Extraktion mit Chelex</i> .....	86
2.	<i>DNA-Extraktion durch Proteinase K</i> .....	86
3.	<i>Anfertigung von Paraffinschnitten</i> .....	87
4.	<i>Anfertigung von Gefrierschnitten</i> .....	89
5.	<i>DNA Färbung mit Hoechst bzw. CellMask Deepred</i> .....	89
6.	<i>Herstellung DIG/FLU markierten RNA-Antisense-Proben</i> .....	90
7.	<i>In Situ Hybridisierung in Gewebe und Embryonen</i> .....	91
8.	<i>Herstellung von „gecapter“ RNA zur Mikroinjektion</i> .....	93
9.	<i>Polymerase Kettenreaktion</i> .....	94
10.	<i>Auftrennung von DNA Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese</i> .....	95
11.	<i>Mikroinjektion von Morpholinos und RNA in Embryonen</i> .....	96
<b>I)</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>98</b>
<b>J)</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>109</b>

## B) Einleitung

Im Allgemeinen wird bei der sexuellen Fortpflanzung zwischen Gonochoristen (getrenntgeschlechtlichen Individuen) und Hermaphroditen (Zwittern) unterschieden. Dabei versteht man unter Gonochoristen solche Arten, bei denen es Individuen gibt, die entweder männlich oder weiblich sind und ihr Geschlecht zeitlebens auf natürliche Art und Weise nicht ändern können. Individuen, die beide Geschlechter ausprägen, bezeichnet man als Hermaphroditen. Diese wiederum werden in Simultanzwitter, die gleichzeitig männlich und weiblich sind, und Konsektivzwitter, die ihr Geschlecht im Laufe ihres Lebens ändern unterteilt. Bei den Konsektivzwittern unterscheidet man, je nach zuerst vorherrschendem Geschlecht, Proterandrie-Konsektivzwitter, bei denen sich zuerst das männliche Geschlecht entwickelt und danach eine weibliche Phase folgt und Protergynie-Konsektivzwitter, bei denen die weibliche vor der männlichen Phase liegt.

### 1. Mechanismen der Geschlechtsbestimmung

Es gibt mehrere Mechanismen, welche die Ausbildung des Geschlechts bestimmen. Sexueller Dimorphismus wird durch regulative Hierarchien gesteuert, wobei ein primäres Signal, ein exogener Initiator bei der umweltbedingten Geschlechtsbestimmung (environmental sex determination; ESD) oder das Mastergen bei der genetischen Geschlechtsbestimmung (genetic sex determination; GSD) über Signalkaskaden die Information zur Differenzierung der undifferenzierten Gonade steuert. Die Differenzierung endet in der Ausbildung von zwei unterschiedlichen Geschlechtern (Zarkower, 2001). Die Ausbildung verschiedener Geschlechter ist im evolutionären Sinne eine sehr „kostenintensive“ Form der Fortpflanzung. Denn es müssen sich zwei Individuen unterschiedlicher Geschlechter entwickeln und treffen, damit Nachkommen entstehen. Dagegen ist bei Spezies, die sich durch Teilung oder Selbstbefruchtung vermehren nur ein Individuum nötig ist und es fallen keine Kosten für die Partnersuche an. Dennoch entwickelten viele Organismen im Laufe der Evolution unterschiedliche Geschlechter.

## 1.1. Genetische Geschlechtsbestimmung

Bei der Erzeugung der Nachkommen verschmelzen ein weiblicher Gamet und ein männlicher Gamet und bilden dadurch ein Individuum mit neuen Genkompositionen. Dieser Nachkomme gehört wieder einem der beiden Geschlechtsformen an. Die Entwicklung zu einem der Geschlechter kann hierbei durch verschiedene Faktoren gesteuert werden. In vielen Fällen bestimmen Gene diese Entwicklung (genetic sex determination, GSD). Dabei unterscheidet die klassische Einteilung drei Ebenen der genotypischen Geschlechtsbestimmung.

### 1.1.1. Chromosomale Geschlechtsbestimmung

Bei der chromosomalen Geschlechtsbestimmung können die Geschlechter oft, aber nicht immer anhand ihres Karyotyps unterschieden werden. Dabei besitzen Männchen und Weibchen ein Paar von morphologisch unterscheidbaren Heterochromosomen (Geschlechtschromosomen). Bei vielen Organismen, wie zum Beispiel bei den Säugetieren, ist das Weibchen homogametisch (XX), während das Männchen heterogametisch (XY) ist. Umgekehrt verhält es sich beispielsweise bei den Vögeln, bei denen das homogametische Geschlecht (ZZ) männlich ist und das weibliche heterogametisch (ZW). Die aktuelle Forschung geht davon aus, dass sich die Geschlechtschromosomen aus früheren Autosomen entwickelt haben (Ohno, 1967).

### 1.1.2. Genotypische Geschlechtsbestimmung

Bei der genotypischen Geschlechtsbestimmung beruht die geschlechtliche Differenzierung auf der Segregation eines oder mehrerer geschlechtsbestimmender Gene.

Im einfachsten Fall liegt wie bei der Stechmücke (*Culex molestus*), eine monogene Geschlechtsbestimmung vor. Dabei lassen sich die Chromosomensätze zytologisch nicht unterscheiden. Die Geschlechtsbestimmung findet auf DNA-Ebene über einen dominant-rezessiven Mechanismus statt. Die Weibchen der Stechmücke sind für das geschlechtsbestimmende Allel homozygot rezessiv (m/m), während Männchen heterozygot

sind und ein dominantes Allel haben (M/m). Bei der Befruchtung entstehen so m/m – Weibchen und M/m – Männchen.

### 1.1.3. Haploid-Diploid-Mechanismus

Auch bei Hymenopteren (Wespen, Bienen und Ameisen), die einen Haplo-Diplo-Mechanismus haben, bestimmt nur ein einzelner Locus über das Geschlecht. So sind haploide Tiere männlich, diploide Tiere weiblich. Dabei entscheidet ein anfängliches Signal darüber, ob sich das Individuum als Männchen oder Weibchen entwickelt. Das geschlechtsbestimmende Gen weist dabei einen Polymorphismus auf. Diese verschiedenen Allele entscheiden darüber, ob sich ein Tier zu einem Männchen oder Weibchen entwickelt. Befinden sich zwei unterschiedliche Allele im embryonalen Genom entsteht ein Weibchen. Befinden sich dagegen ein Allel oder auch zwei Kopien desselben Allels im embryonalen Genom entwickelt sich der Embryo zu einem Männchen. Bei der Honigbiene (*Apis mellifera*) kodiert das Gen *csd* (*complementary sex determiner*,) ein an Arginin und Serin reiches Protein. Kommen zwei Allele des *csd*-Gens vor wird ein aktives Protein gebildet, das die weibliche Entwicklung initiiert. Ein einzelnes Allel generiert dagegen ein inaktives Protein und führt damit zur Entwicklung eines männlichen Individuums (Beye, 2004). Knockdown-Experimente eines zweiten Gens (*fem*) weisen darauf hin, dass auch dieses Gen die Geschlechtsbestimmung beeinflusst, denn wird das Gen ausgeschaltet, entwickeln sich diploide (weibliche) Tiere zu Männchen (Hasselmann et al., 2008). *Csd* ist dabei die duplizierte Version von *fem* und setzte sich bei den Bienen an die Spitze der Geschlechtsbestimmungskaskade. Es reguliert die Expression von *fem*, indem es verschiedene Spleißvarianten bei den unterschiedlichen Geschlechtern erzeugt (Hasselmann et al., 2008).

Als weitere Form der genetischen Geschlechtsbestimmung tritt bei manchen Invertebraten das X0-System auf. Dabei haben zum Beispiel bei der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) die Weibchen zwei Geschlechtschromosomen (XX), während die Männchen nur ein Geschlechtschromosom (X0) besitzen. Entscheidend ist hierbei das Verhältnis von X-Chromosomen zu Autosomen. Liegt das Verhältnis bei größer oder gleich Eins entsteht ein Weibchen, ist das Verhältnis 0,5 oder kleiner entsteht ein Männchen (Burtis and Baker, 1989; Penalva and Sánchez, 2003).

Bei dem Nematoden *C. elegans* hingegen sind XX-Tiere Hermaphroditen und XO-Tiere Männchen.

## 1.2. Umweltbedingte Geschlechtsbestimmung

Amphibien, Reptilien und Fische haben verschiedenste Formen der Geschlechtsbestimmung entwickelt. So tritt neben der genetischen Geschlechtsbestimmung (GSD), die das XX/XY-System und das ZZ/ZW-System umfasst, auch eine umweltbestimmte Geschlechtsbestimmung (ESD) auf. Darunter versteht man den Einfluss von Faktoren der Umwelt auf Kaskaden regulatoriver Gene, die bewirken, dass die Bildung eines Geschlechts begünstigt wird. Wichtige Faktoren können dabei vor allem Temperatur, Hormone, pH-Wert aber auch soziale Effekte sein (Valenzuela, 2004; Wehner and Gehring, 2013). Bei dem Korallen besiedelnden Fisch *Gobiodon erythrospilus* kann das Geschlecht angenommen werden, das in der jeweiligen Situation am besten passt. Trifft ein einzelnes Jungtier auf ein Weibchen entwickelt es sich zu einem Männchen; trifft es jedoch auf ein Männchen, entwickelt es sich zu einem Weibchen. So wird der größtmögliche Fortpflanzungserfolg gewährleistet (Hobbs et al., 2004). Als ökotoxologisches Phänomen kann es in der Natur auch vorkommen, dass Hormone aus der Umwelt die Ausbildung des Geschlechts von Individuen entgegen ihrer eigentlichen genetischen Anlage beeinflussen. Dies kann in Abhängigkeit von der Konzentration zu einer völligen Geschlechtsumkehr führen. Beispiele dafür, dass Hormone zu einer kompletten Geschlechtsumkehr mit fertilen Individuen führen können, finden sich beim Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) oder auch beim Medaka (*Oryzias latipes*) (Wehner and Gehring, 2013).

Das wohl am besten untersuchte Beispiel für umweltbedingte Geschlechtsbestimmung ist sicherlich der Einfluss von verschiedenen Temperaturen (temperature dependent sex determination, TSD) auf die Geschlechtsbestimmung bei Krokodilen, Schildkröten und Eidechsen (Bull 1980; Ewert et al. 1994; Deeming 2004; Gamble 2010). Bei einigen Schildkröten schlüpfen bei niedrigen Nesttemperaturen fast ausschließlich Männchen, während bei wärmeren Inkubationstemperaturen nahezu nur Weibchen schlüpfen. Bei einigen Eidechsen ist das Gegenteil der Fall. Hohe Temperaturen führen hier zu Weibchen und niedrige zu Männchen. Bei den Krokodilen, einigen Eidechsen und einigen Schildkröten

schlüpfen nur bei mittleren Temperaturen Männchen, bei wärmeren oder kälteren dagegen Weibchen. Bei manchen Schildkröten und vielen Eidechsen gibt es aber auch eine genetische Geschlechtsbestimmung. Nur bei den Krokodilen ist ausschließlich TSD bekannt (Ewert et al., 2004; Lance, 2009; Lang and Andrews, 1994; Viets et al., 1994).

## 2. Geschlechtsbestimmung bei Säugetieren

Die meisten Säugetiere, einschließlich des Menschen, besitzen eine genotypische Geschlechtsbestimmung. Individuen mit einem XY-Gonosomensatz werden männlich und Individuen mit einem XX-Gonosomensatz werden weiblich. Bei vielen sind die wesentlichen Gene für die Entwicklung zum Männchen oder Weibchen bekannt, obgleich ihre Position in der Geschlechtsbestimmungskaskade, als auch der Wirkmechanismus oft noch unklar ist. Die ersten Hinweise, welches der Testis determinierende Faktor sein könnte, lieferten Untersuchungen an Mäusen. XY-Tiere, denen das Gen *Sry* fehlte, entwickelten sich zu Weibchen und transgene XX-Tiere, die ein genomisches Fragment hatten, welches *Sry* enthielt, entwickelten sich zu Männchen (Gubbay et al., 1990; Koopman et al., 1990)

## 3. Geschlechtsbestimmung und Geschlechtsdifferenzierung bei Fischen

Es gibt viele Gründe die Geschlechtsbestimmungsmechanismen an Fischen zu erforschen. Schon die riesige Artenvielfalt der Fische mit mehr als 27000 Arten (Nelson, 1994), die deren weltweite Verteilung in den unterschiedlichsten Habitaten ermöglicht, macht diese Tiergruppe für die Erforschung der Geschlechtsbestimmung so interessant. Innerhalb der Wirbeltiere sind die Fische die artenreichste Gruppe und präsentieren eine ungeheure Diversität auf allen Ebenen biologischer Organisation. Außerdem finden sich bei Fischen Beispiele für alle Geschlechtsbestimmungsmechanismen, die auch bei anderen Vertebraten verwirklicht sind. Durch die ungeheure Anzahl verschiedener Geschlechtsbestimmungsmechanismen bei Fischen kann man alternative regulatorische Mechanismen studieren und dadurch grundlegende Schlüsse ziehen, wie die Geschlechtsbestimmung vor sich geht (Devlin and Nagahama, 2002).

Die Entwicklung der Gonade in die männliche oder weibliche Richtung wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Gene gesteuert. Durch einen Schlüsselreiz angeregt differenziert sich die Gonade und induziert damit selbst die somatische Geschlechtsausbildung und die Entwicklung sekundärer Geschlechtsmerkmale. Dies geschieht meist durch die Produktion von Geschlechtshormonen. Der Impuls für die Entwicklung des Geschlechts in die eine oder andere Richtung kann unterschiedlicher Natur sein. Dabei wird oft eine mehrstufige Kaskade verschiedenster Prozesse durchlaufen, bei der jeder einzelne Schritt durch Einflüsse aus der Umwelt, wie zum Beispiel der Veränderungen der Wassertemperatur, des pH-Werts oder der Einfluss sozialer Effekte, die Geschlechtsentwicklung beeinflussen kann (Slanchev et al., 2005; Volff and Schartl, 2002).

Ein anderer Grund, die Geschlechtsbestimmungsmechanismen an Fischen zu untersuchen ist, dass durch die Bevölkerungszunahme immer mehr Nahrung in aquatischen Systemen generiert werden muss, um die Bevölkerung zu ernähren und eine ausreichende Proteinversorgung auch in Zukunft sicherstellen zu können. Die Überfischung der Ozeane und der dadurch zurückgehende Fischfang erhöht den Druck, die benötigte Biomasse in künstlichen Aquakulturen zu produzieren. Schon allein deshalb ist es zwingend erforderlich zu verstehen, wie die Reproduktion der verschiedenen Arten abläuft, um ein effektives Management zu gewährleisten und Voraussagen treffen zu können, welche Folgen durch diesen Eingriff entstehen. Zudem ist das Verständnis und die Kontrolle der Geschlechterentwicklung ein zentraler Punkt für die industrielle Aquakultur. Bei manchen Fischen wachsen die beiden Geschlechter unterschiedlich schnell heran. Deshalb ist es nötig, dass die Fische zuverlässig und synchron heranreifen, um den maximalen reproduktiven Erfolg zu gewährleisten (Devlin and Nagahama, 2002).

### **3.1. Temperaturabhängige Geschlechtsbestimmung bei Fischen**

Lange Zeit glaubte man bei Fischen nicht an eine Beeinflussung der Geschlechtsausprägung durch die Wassertemperatur. Obwohl Untersuchungen an Schildkröten veröffentlicht wurden, die eine temperaturabhängige Geschlechtsbestimmung belegten, beachtete man in der Fischforschung die TSD nur am Rande. Die ersten Ergebnisse fand man vor allem bei im Labor gezüchteten Fischen. Mittlerweile hat man bei über 59 Fischarten einen Einfluss der

Temperatur auf das Geschlecht nachgewiesen (Ospina-Alvarez and Piferrer, 2008). Es scheint aber so zu sein, dass es sich bei diesen Formen der TSD nicht um eine ursprüngliche, primitive Form der Geschlechtsbestimmung handelt. Bei der Mehrzahl der Fische nimmt die Prozentzahl der Weibchen mit steigender Temperatur ab, obwohl es auch hier Ausnahmen gibt. Bei dem europäischen Wolfsbarsch *Dicentrarchus labrax* ist nämlich genau das Gegenteil der Fall. Hier schlüpfen bei steigenden Temperaturen mehr Weibchen (Baroiller et al., 1999; Blázquez et al., 1998), wobei es auch Berichte gibt, nach denen sich bei steigender Temperatur mehr Männchen entwickeln (Koumoundouros et al., 2002). Bei der Flunder *Paralichthys lethostigma* ist die Quote der Weibchen bei mittleren Temperaturen am höchsten, während hohe und niedrige Temperaturen zur Entwicklung von mehr Männchen führen (Luckenbach et al., 2003). Kurioserweise neigen XX-Genotypen des Niltilapia *Oreochromis niloticus* bei höheren Temperaturen dazu das männliche Geschlecht auszubilden, während YY-Genotypen bei gleichen Bedingungen eher weiblich werden (Conover 2004).

Die sensitive Phase der Geschlechtsbestimmung scheint zwischen dem Ende der Larvalentwicklung und dem Beginn der histologischen Gonadenentwicklung zu liegen. Dies entspricht auch dem Zeitpunkt, während dem die Geschlechtsentwicklung durch eine künstliche Hormonzugabe beeinflusst werden kann (Conover, 2004).

In der aktuellen Forschung wurden bei verschiedensten Fischarten mehrere Hinweise und Beweise dafür gefunden, dass die Geschlechtsbestimmung temperaturabhängig ist, jedoch fehlt bei den meisten der ökologische Bezug. Treten thermische Einflüsse auf die Geschlechtsbestimmung nur bei Extremtemperaturen auf, die in der Natur nur selten erreicht werden, so scheint der temperaturabhängige Mechanismus den genetischen Geschlechtsbestimmungsmechanismus unter experimentellen Bedingungen zu überlagern (Ospina-Alvarez and Piferrer, 2008).

Untersuchungen an dem atlantischen Ährenfisch *Menidia menidia* zeigen, dass bei dieser Art zwar TSD vorkommt, jedoch zwischen den Populationen in freier Wildbahn beachtliche Unterschiede auftreten. Dabei gibt es eine Korrelation mit den ebenfalls sehr unterschiedlich langen Laichzeiten. Da bei *Menidia menidia* die Körpergröße der Weibchen ausschlaggebend für den reproduktiven Erfolg ist, haben Weibchen die früh in der Laichperiode schlüpfen eine längere Wachstumsphase und damit mehr Erfolg in der nächsten Laichperiode. Bei kühleren

Temperaturen entwickeln sich vorwiegend Weibchen, während bei wärmeren Temperaturen mehr Männchen schlüpfen. Dementsprechend ist bei Populationen, in denen TSD eine Rolle spielt, der Anteil der Weibchen am Anfang der Laichzeit höher als am Ende. Populationen deren Laichperiode aufgrund der Temperaturen fast das ganze Jahr dauert oder nur einen Monat kurz ist, zeigen keine Abhängigkeit von der Temperatur (Conover and Kynard, 1981; Lagomarsino and Conover, 1993).

Da die meisten Veröffentlichungen über TSD bei Fischen vor allem aus experimenteller Aquarienzucht stammen, ohne die ökologische Relevanz zu überprüfen, untersuchten Ospina-Alvarez und Piferrer die Frage, ob es sich bei den Ergebnissen um ein Artefakt oder einen natürlichen Mechanismus zur Geschlechtsbestimmung handelt. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass echte temperaturabhängige Geschlechtsbestimmung weniger weit verbreitet ist als angenommen. Der Einfluss von erhöhten Temperaturen auf eine ansonsten genetisch determinierte Geschlechtsbestimmung besteht jedoch teilweise durchaus (Ospina-Alvarez and Piferrer, 2008).

### 3.2. Entwicklung der Keimzellen

Die Struktur der Gonaden bei Fischen ist ähnlich der Struktur bei anderen Wirbeltieren. Sie bestehen aus Keimzellen die mit unterstützenden somatischen Zellen vermischt sind. Dabei lassen sich die Keimzellen und die somatischen Zellen klar voneinander unterscheiden. Während die Keimzellen sich mitotisch teilen und dann die Meiose durchlaufen, differenzieren sich die somatischen Zellen zu assoziierten strukturellen und endokrinen Zellen. Die Spezifikation der primordialen Keimzellen (Primordial Germ Cells, PGCs) erfolgt dabei oft durch ein spezielles Keimplasma. Dieses enthält maternal hinterlegte RNA und Proteine. Dabei ist jedoch die Zusammensetzung und die einzelnen Komponenten oft noch nicht vollständig geklärt. Dieses Keimplasma wurde unter anderem beim Zebrafisch, aber auch beim Medaka nachgewiesen (Herpin et al., 2007a; Knaut et al., 2000). Die primordialen Keimzellen entwickeln sich schließlich zu den Gameten in den Gonaden. Von *Drosophila* war bekannt, dass maternal hinterlegte mRNAs, die eine bestimmte DNA-Helikase codieren, nämlich *oskar*, *vasa* und *tudor* für die Urkeimzellentwicklung benötigt werden (Ephrussi and Lehmann, 1992). Auch bei Zebrafischen ist eine solche DNA-Helikase RNA (kodiert durch das

*vas* Gen) von Bedeutung (Krøvel and Olsen, 2004; Olsen et al., 1997; Yoon et al., 1997). Diese RNA konzentriert sich im Zwei-Zell-Stadium entlang der Furchungsebene und verbleibt dann mit den vermeintlichen Urgeschlechtszellen assoziiert bis ins 1000-Zell-Stadium. *Vas* dient bei Zebrafischen somit als früher Keimzellmarker. Diese *vas*-positiven Zellen ordnen sich nach einigen Teilungen während der Somitogenese entlang der Keimzelleiste an. Nach dem Schlüpfen kann die Expression von *vas* nur noch in den Keimzellen und der sich entwickelnden Gonade beobachtet werden (Yoon et al., 1997). Auch bei *Tilapia* ist *vas* Expression nach der Embryogenese nur noch in den Keimzellen sichtbar (Kobayashi et al., 2000, 2002). Dies macht es wahrscheinlich, dass die Expression von *vas* für die Unterscheidung zwischen Keimzellen und somatischen Zellen eine entscheidende Rolle spielt. Bei der Regenbogenforelle (Yoshizaki et al., 2000a, 2000b) und Medaka (Shinomiya et al., 2000; Tanaka et al., 2001) konnte durch die Expression von *vasa*-ähnlichen homologen Reporter-genpromotoren und in-situ Hybridisierungen nachgewiesen werden, dass ebenfalls eine urgeschlechtszellspezifische Expression dieses Gens vorliegt. Nachdem die Urgeschlechtszellen gebildet sind, wandern sie im sich entwickelnden Embryo zu der Region der späteren Gonade.

Neben den PGCs bilden somatische Zellen einen weiteren Bestandteil der späteren Gonade. Die äußerste somatische Schicht der sich entwickelnden Gonade wird von Zellen aus dem Keimleitenepithelium gebildet. Es ist aber auch möglich, dass sich einige somatische Zellen vom Einfalten des Mesenchyms ableiten, ähnlich wie es bei den primitiven Keimsträngen von Säugetieren der Fall ist (Devlin and Nagahama, 2002). Vor der Differenzierung der Gonade scheinen alle somatischen Zellen einen gemeinsamen Ursprung zu haben und sehen in den späteren Weibchen und Männchen ähnlich aus. Nach der Einwanderung der Urgeschlechtszellen in die Keimleiste fangen diese an sich zu teilen und in Spermatogonien und Oogonien zu differenzieren. Zeitgleich erfolgt die Differenzierung der somatischen Zellen (Devlin and Nagahama, 2002).

Bei den Säugetieren besteht hinsichtlich des Wanderungsmusters der Zellen ein Unterschied zwischen den Geschlechtern. In die männliche Gonade wandern mesonephrische Zellen aktiv durch die Expression von *Sry* ein (Brennan et al., 1998; Koopman, 1999). Im Hoden verschiedener Fische entwickeln sich die somatischen Zellen schrittweise zu Hodenkanälchen, unterstützendes Bindegewebe und zu Zellen, die den Sertoli- und

Leydigzellen von Säugetieren ähnlich sind (Pudney and Callard, 1984; Van Vuren and Soley, 1990). Außerdem wurde postuliert, dass die physikalische Nähe zwischen Urgeschlechtszellen und den somatischen Zellen vorhanden sein muss, dass eine funktionsfähige Gonade gebildet werden kann (Miura et al., 1996).

Bei den späteren Weibchen beginnen sich die somatischen Zellen und die Urgeschlechtszellen zu Follikeln zu differenzieren. Diese werden aus Oozyten gebildet, die aus einer inneren Schicht Granulosazellen und einer äußeren Schicht Thecazellen bestehen (Nagahama et al., 1982). Dabei ist bei den meisten Arten die Proliferation der somatischen Zellen und der Oogonien das erste erkennbare Zeichen der Ovarentwicklung. Anschließend erfolgt die Differenzierung der frühen Oozyten und die Bildung der Ovarialhöhle. Die Entwicklung des Hodens geschieht meist erst später im Vergleich zu der weiblichen Gonadenentwicklung (Guraya, 1994; Nakamura et al., 1998).

#### 4. Geschlechtsbestimmung bei Medaka

Medakas (*Oryzias latipes*) besitzen ein XX/XY-Geschlechtsbestimmungssystem. Dabei ist *dmrt1bY* das Gen, das ausschlaggebend ist für die Entwicklung der Fische zu Männchen. *Dmrt1bY* ist die Y-chromosomale Kopie von *dmrt1a*. Die Entstehung von *dmrt1bY* lief wahrscheinlich wie von Schartl (2004) beschrieben ab (Abbildung 1):

Durch die Duplikation eines Stückes der Kopplungsgruppe 9 (Linkage Group LG9), das neben anderen Genen auch das autosomale *dmrt1* enthielt und dessen Translokation auf die LG1 entstand ein Proto-Y-Chromosom. Das andere Chromosom der LG1 wurde dadurch zum Proto-X-Chromosom. Dies geschah vor ca. 10 Millionen Jahren in dem gemeinsamen Vorfahren von *Oryzias latipes*, *Oryzias curvinotus* und *Oryzias luzonensis*. Von den duplizierten Genen blieb nur *dmrt1bY* funktionstüchtig, da alle anderen durch Degeneration und Mutationen funktionsuntüchtig wurden. Im weiteren Verlauf akkumulierten sich repetitive Sequenzen und duplizierte DNA Stücke aus dem restlichen Genom in der Y-spezifischen Region. Dadurch wuchs dieses Stück von 43kb auf 258kb an (Kondo et al., 2004, 2006).

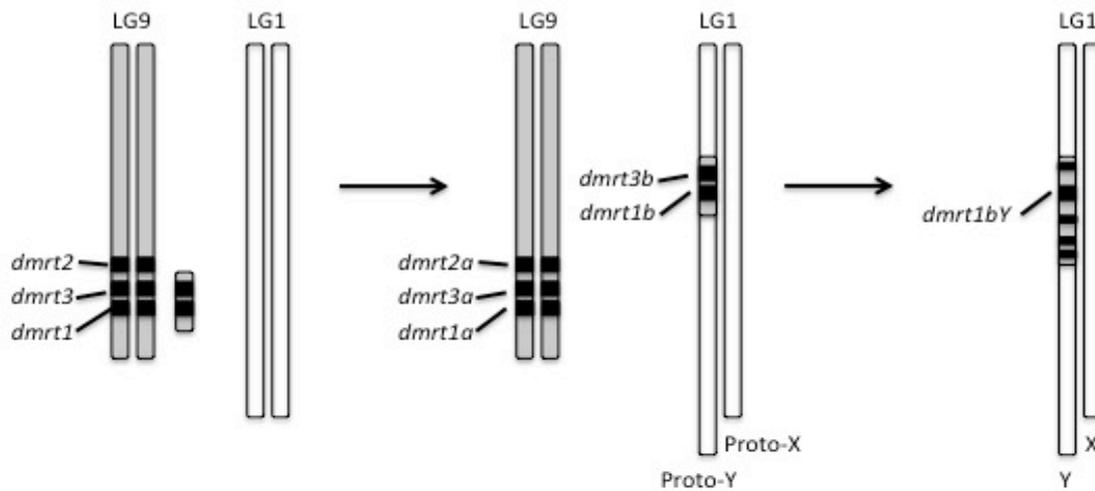


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Evolution des Y-Chromosoms bei Medaka

Ein Stück von LG9 wird dupliziert und in ein Chromosom von LG1 transloziert. Dieses Stück enthält das *dmrt1* Gen und benachbarte Gene, wie *dmrt3*. Dadurch wird ein Chromosom der LG1 zum Proto-Y, das ursprüngliche zum Proto-X. Durch die Akkumulation von Mutationen werden die anderen Gene funktionsuntüchtig und nur *dmrt1bY* bleibt als funktionales Gen des duplizierten Stücks übrig. Modifiziert nach Schartl, 2004

Ähnlich wie *Sry* bei den Säugetieren ist *dmrt1bY* bei Medaka der hauptverantwortliche Schalter der Geschlechtsbestimmungskaskade (Matsuda et al., 2002; Nanda et al., 2002). *Dmrt1*, der Vorläufer von *dmrt1bY*, spielt auch bei der Geschlechtsbestimmungskaskade der Säugetiere eine Rolle und ist bei der Entwicklung der Männchen dem *Sry*-Gen untergeordnet. Die Kopie des *dmrt1*, die sich bei Medaka auf dem Y-Chromosom befindet, wird durch den Erwerb einer neuen Funktion an die Spitze der Kaskade gestellt. Dadurch wird auch ein neues regulatorisches Netzwerk benötigt. *Dmrt1a* kann *dmrt1bY* regulieren, indem es an eine Zielsequenz bindet, die nahe der Promotorregion von *dmrt1bY* liegt. Diese Sequenz wurde durch ein Transposon vor der codierenden Region von *dmrt1bY* eingefügt (Herpin et al., 2010).

Beim Medaka fungieren beide *dmrt1* Paraloge als Transkriptionsfaktoren. Für *dmrt1bY* konnte gezeigt werden, dass es während der Geschlechtsentwicklung dafür verantwortlich ist, dass sich in den männlichen Gonaden die Urgeschlechtszellen nicht weiter teilen. Dieser Teilungsstopp tritt zeitgleich mit der Entscheidung der Geschlechtsbestimmung auf (Herpin et al., 2007b). Bei natürlich vorkommenden Mutanten, die entweder eine verkürzte Version

des *dmrt1bY* exprimieren oder eine verminderte Expression des normalen *dmrt1bY* aufweisen, entwickeln sich die genetisch männlichen Tiere (XY) dennoch zu phänotypisch normalen Weibchen (Matsuda et al., 2002; Otake et al., 2006; Shinomiya et al., 2004). Auch die künstliche Herunterregulierung des *dmrt1bY* Gens führt zu geschlechtsumgewandelten XY Weibchen (Paul-Prasanth et al., 2006).

Matsuda und Mitarbeiter konnten zeigen, dass sowohl ein 117-kb Fragment, das *dmrt1bY* enthält, als auch die Überexpression von *dmrt1bY* cDNA unter einem CMV-Promotor ausreichend ist, dass sich genetische Weibchen (XX-Tiere) zu Männchen entwickeln (Matsuda et al., 2007).

Während der Entwicklung der Gonade wird *dmrt1bY* in der frühen Gonadenanlage der XY-Embryonen exprimiert; und zwar ausschließlich in den somatischen Zellen, die die Urgeschlechtszellen umgeben. Diese Expression tritt auf, bevor die ersten morphologischen Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen sichtbar sind (Kobayashi et al., 2004). Als ersten morphologischen Unterschied kann man die unterschiedliche Anzahl der Urgeschlechtszellen bei Männchen und Weibchen erkennen. Dies tritt im Entwicklungsstadium 38 auf (Hamaguchi, 1982; Satoh and Egami, 1972). Nachdem die Urgeschlechtszellen die spätere Gonadenregion erreicht haben, bleiben sie in den männlichen XY-Gonaden mitotisch inaktiv, während sie sich in den weiblichen XX Gonaden vermehren (Kobayashi et al., 2004; Satoh and Egami, 1972) und in die Meiose eintreten.

Im Gegensatz dazu ist das autosomale *dmrt1a* ausschlaggebend dafür, dass der Hoden der Männchen weiterhin als solcher bestehen bleibt. Wird *dmrt1a* in den juvenilen und adulten Fischen nicht exprimiert oder transkribiert, wird zwar zunächst eine Hodenstruktur gebildet, der schon ausgebildete Hoden wandelt sich dann aber in ein Ovar um (Masuyama et al., 2012).

## 5. Gonadenentwicklung bei Medaka

Während der Embryonalentwicklung separieren sich die Keimzellen von den somatischen Zellen. Diese frühen Urkeimzellen enthalten eine keimzellspezifische intrazelluläre Struktur, die „Nuage“ (Wolke) genannt wird. Diese elektronendichte Struktur wird bei *Xenopus* und *Drosophila* Keimplasma, bei den Nematoden P-Körnchen und bei den Säugetieren Chromatoid-Körper genannt. Sie beinhaltet verschiedene Proteine und RNAs. Die Zusammensetzung ist weitestgehend konserviert (Hashimoto et al., 2004). Eine dieser konservierten Komponenten sind die *Nanos*-Proteine. Der Reiskärpfling *Oryzias latipes* besitzt vier verschiedene Gene der *Nanos*-Familie. Dabei ist unter den Vertebraten *nanos3* am besten konserviert und ausschließlich in den PGCs exprimiert (Aoki et al., 2009; Kurokawa et al., 2006). Schaltet man das Gen während der Embryonalentwicklung aus, wird die Wanderung der PGCs gestört und es entwickeln sich Gonaden ohne Keimzellen (Kurokawa et al., 2007). Die 3′untranslatierte Region von *nanos* enthält eine Sequenz, die dazu führt, dass die *nanos* RNA spezifisch in den primordialen Keimzellen stabilisiert wird. Durch die Injektion von *GFP* RNA, die mit der 3′untranslatierten Region von *nanos* gekoppelt ist, können die PGCs ab der frühen Gastrula spezifisch markiert werden (Kurokawa et al., 2006; Saito et al., 2006). Kurokawa und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Wanderung in mehrere Phasen unterteilt werden kann und dass sowohl *cxcr4*, als auch *sdf1b* eine wichtige Rolle dabei spielen. Durch Injektionen von Morpholinos gegen die jeweilige RNA konnten sie zeigen, dass die frühe Wanderung der PGCs vom animalen Pol zur Randzone durch *cxcr4* beeinflusst wird, *sdf1b* jedoch erst die dritte Phase der Wanderung der PGCs von dem vorderen zum hinteren Teil des Seitenplattenmesoderms steuert. Die Phase dazwischen, in der die PGCs von der Marginalzone zur Körperachse wandern und sich zusammen mit den somatischen Zellen entlang der Körperachse ausrichten, ist unabhängig von *cxcr4* und *sdf1b* (Kurokawa et al., 2006).

Kurz vor dem Schlüpfen, zu der Zeit, zu der die *dmrt1bY*-Expression in der männlichen Gonadenanlage beobachtet wurde, fangen die Urgeschlechtszellen in den weiblichen Gonaden an sich stark zu vermehren und die Meiose zu durchlaufen. Bei den männlichen Embryonen bleibt die Anzahl der Urgeschlechtszellen weitestgehend konstant (Herpin et al., 2007b; Kobayashi et al., 2004). Circa 10 Tage danach kann man erste somatische Unterschiede in den Gonaden erkennen. Die weiblichen Gonaden bilden die ersten Follikel, während in den

männlichen Gonaden die Vorläufer der Samenkanälchen gebildet werden (Shinomiya et al., 2001).

Bei den Weibchen wurden unlängst ovarielle Strukturen gefunden, die dafür verantwortlich sind, dass während des Lebenszyklus des adulten Ovars fertile Eier gebildet werden. Diese so genannten Keimwiegen (germinal cradles) beinhalten Stammzellen der Keimbahn. Gebildet werden die Stammzellnischen aus somatischen Zellen, die *sox9b* exprimieren und aus mitotischen Oogonien, die *nos2* exprimieren (Nakamura et al., 2010, 2011).

## 6. Ziele der Doktorarbeit

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass bei vielen Vertebraten die Anzahl der Urgeschlechtszellen bei den späteren Weibchen höher ist als bei Männchen, bevor die entsprechende Differenzierung zur geschlechtsspezifischen Gonade erfolgt. Es ist also zum einen denkbar, dass die Anzahl der Urgeschlechtszellen den Ausschlag gibt, ob sich ein Individuum zu einem Weibchen oder Männchen entwickelt, andererseits könnte auch das genetische Geschlecht der somatischen Zellen der Gonade zu einer Vermehrung der Urgeschlechtszellen bei den späteren Weibchen führen. Deswegen sollte im Rahmen der Doktorarbeit untersucht werden, welche der beiden genannten Alternativen wahrscheinlicher ist.

Die Voraussetzung hierfür war zu untersuchen, welche Faktoren einen Einfluss auf die Wanderung der Urgeschlechtszellen vom Ort ihrer Entstehung bis zur späteren Gonade hin haben, um eventuelle Manipulationen an der Anzahl der Urgeschlechtszellen vornehmen zu können. Somit sollte beigetragen werden, das Verständnis der Bedeutung der PGCs bei der Geschlechtsentwicklung zu mehren.

Da es zudem Berichte gab, nach denen eine erhöhte Temperatur während der Embryonalentwicklung bei Medaka einen maskulinisierenden Effekt hat, wurde in dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss verschiedene Temperaturen auf die Anzahl der Urgeschlechtszellen und damit die Geschlechtsentwicklung haben. Deshalb sollten eventuelle

Unterschiede in der Anzahl der PGCs bei unterschiedlichen Temperaturen ermittelt werden. Diese Ergebnisse sollten die eine oder andere These über die Geschlechtsbestimmung stützen.

## C) Ergebnisse

### 1. Einfluss von unterschiedlichen Temperaturen auf die Geschlechtsbestimmung bei Medaka

Die Geschlechtsbestimmung bei *Oryzias latipes* (Medaka) erfolgt über eine Kaskade von Genen bei der *dmrt1bY*, das auf dem Y-Chromosom lokalisiert ist, das Gen ist, das zur Ausbildung des männlichen Phänotyps führt (Matsuda et al., 2002, 2007; Nanda et al., 2002; Paul-Prasanth et al., 2006). Dennoch gibt es Berichte über XX-Männchen und einen Zusammenhang zwischen höheren Temperaturen und dem vermehrten Auftreten dieser XX-Männchen (Aida, 1936). Um den Zusammenhang zwischen der Geschlechtsbestimmung und verschiedenen Umwelteinflüssen zu überprüfen, wurden bei einem Laborstamm von Medaka, der als Carbio bezeichnet wird, die befruchteten Eier verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Nach dem Schlüpfen wurden die Tiere bei normalen Hälterungsbedingungen (25°C; 14h Licht; 10h Dunkelheit) bis zur Geschlechtsreife gehalten und das phänotypische und genotypische Geschlecht bestimmt.

#### 1.1. Erniedrigung der Temperatur bei der Embryonalentwicklung

Eine Erniedrigung der Temperatur auf 20°C verlängerte die Entwicklungszeit der Embryonen bis zum Schlüpfen auf bis zu 20 Tage. Das Schlüpfen an sich verlief normal und es wurden kaum Defekte oder Missbildungen beobachtet. Der Vergleich Zwischen dem Phänotyp und dem Genotyp der adulten Tiere ergab, dass die überwiegende Mehrzahl der Fische sich entsprechend ihres genetischen Geschlechts entwickelte. Knapp 99% der XX-Tiere entwickelten sich zu morphologisch normalen Weibchen. Sie waren von unbehandelten Weibchen nicht zu unterscheiden. Nur gut 1% der XX-Tiere bildete einen männlichen Phänotyp aus und keines der XY-Tiere entwickelte sich zu einem Weibchen (Tabelle1). Dieses Ergebnis zeigt, dass niedrige Temperaturen weder einen maskulinisierenden, noch einen feminisierenden Effekt auf die Geschlechtsausbildung haben. Bei Niedrigen Temperaturen entwickeln sich die Embryonen von *Oryzias latipes* gemäß ihres genetischen Geschlechts.

Temperatur in °C	XX-Männchen	XX-Weibchen	Geschlechtsumgewandelte XX-Tiere in %
<b>20°C</b>	3	291	1,02
<b>25°C</b>	58	554	9,48
<b>28°C</b>	24	95	20,17
<b>30°C</b>	45	113	28,48
<b>34°C</b>	321	315	50,47

**Tabelle 1: Einfluss der Temperatur auf die Anzahl der geschlechtsumgewandelten XX-Tiere**

Mit zunehmender Temperatur nimmt der Prozentsatz der XX-Tiere zu, die sich anstatt zu Weibchen zu Männchen entwickeln.

## **1.2. Erhöhung der Temperatur bei der Embryonalentwicklung**

Die Entwicklungszeit der Embryonen betrug von der Befruchtung bis zum Schlüpfen bei 25°C zwischen 8 und 10 Tage. Wurden die befruchteten Eier bei höherer Temperatur als bei 25°C gehalten, nahm die Entwicklungszeit ab. Bei 30°C inkubiert, konnten die ersten geschlüpften Tiere schon nach 6 Tagen beobachtet werden. Allerdings stieg mit der Temperatur auch die Anzahl der Fehl- und Missbildungen an. Während bei 25°C Normaltemperatur kaum Missbildungen auftraten, hatten bei 34°C knapp 25% der Embryonen Fehlbildungen, welche zum Absterben während oder nach dem Schlüpfen führten.

Verglich man die Anzahl der adulten XX-Tiere mit der Anzahl der adulten XY-Tiere aus den verschiedenen Temperaturversuchen, so ließ sich feststellen, dass das Verhältnis kaum vom theoretischen 1:1-Verhältnis abwich (Tabelle 2). Die Überprüfung mittels Chi-Quadrat-Test ergab, dass sich weder der 20°C Versuch (p-Wert=0,561) noch der 30°C Versuch (p-Wert=0,296) vom 25°C Versuch hinsichtlich ihrer Verteilung unterschieden. Damit konnte eine erhöhte Sterblichkeit der XX- oder XY-Tiere durch Temperatureinwirkung ausgeschlossen werden.

Bei einigen Versuchen wurde daraufhin eine Kreuzung zwischen XX-Männchen und XX-Weibchen angesetzt, um die Zahl der XX-Tiere zu erhöhen.

Inkubationstemperatur während der Embryonalentwicklung	Anzahl der XX-Tiere	Anzahl der XY-Tiere
20°C	81	80
25°C	101	86
30°C	32	38

**Tabelle 2: Einfluss der Temperatur auf die Anzahl das Verhältnis der geschlechtsreifen XX/XY – Tiere:**

**Die Verteilung der XX- bzw. XY-Tiere unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Temperaturen nicht**

Mit der Temperatur stieg auch die relative Anzahl der XX-Tiere, die sich zu Männchen entwickelten. Während sich bei 25°C nur knapp 10% der XX-Tiere zu Männchen entwickelten, waren es bei 28°C schon über 20%. Die Rate erhöhte sich auf über 50% bei einer Inkubationstemperatur von 34°C während der Embryonalentwicklung (Tabelle 1). Somit konnte bei einer erhöhten Temperatur während der Embryonalentwicklung ein Effekt festgestellt werden, der maskulinisierend auf die Geschlechtsdifferenzierung wirkt.

Weiterhin konnten durch die Untersuchung des Genotyps sowohl bei niedrigeren Temperaturen, als auch bei erhöhten Temperaturen keine XY-Weibchen gefunden werden. Somit kann ein feminisierender Effekt von verschiedenen Temperaturen ausgeschlossen werden.

### 1.3. Einfluss des genetischen Hintergrunds auf die Temperatursensitivität

Um herauszufinden, ob die unterschiedlichen Stämme von *Oryzias latipes* an das jeweilig vorherrschende Klima adaptiert sind und dort die vorherrschende Temperatur einen Effekt auf die Geschlechtsbestimmung hat, wurde die Temperatursensitivität verschiedener Stämme untersucht. Außerdem wurde ermittelt, inwieweit das ursprüngliche Verbreitungsgebiet der einzelnen Stämme diesen Einfluss widerspiegelt. Deswegen wurden in verschiedenen Stämmen, die ihren Ursprung in verschiedenen Regionen Japans haben untersucht, wie hoch das Verhältnis der geschlechtsumgewandelten Tiere ist (Tabelle 3). Es konnten Unterschiede im Prozentsatz der zu Männchen geschlechtsumgewandelten XX-Tiere festgestellt werden. Diese Unterschiede waren deutlich zu erkennen, obwohl die Embryonalentwicklung nur bei 25°C stattfand. Teilweise war der Unterschied zwischen verschiedenen Stämmen hoch signifikant. Während bei dem Kaga-Stamm nur gut 2% der XX-Tiere Männchen waren,

wurden bei dem HdrR–Stamm über 60% geschlechtsumgewandelte Tiere gefunden (Chi-Quadrat-Test: p-Wert= 6.993e-06). Bei anderen Stämmen war zwar eine Tendenz zu sehen, jedoch waren die Zahlen noch zu gering, um statistisch belastbare Aussagen machen zu können (Tabelle 3). Der von mir hauptsächlich verwendete Carbio-Stamm lag mit knapp 10% zwischen diesen Werten. Aus den Ergebnissen konnte aber nicht geschlossen werden, dass die nördlichen Stämme (HNI, Kaga) anfälliger für den maskulinisierenden Effekt waren, da bei 25°C schon zwischen 1,3% (Kaga) und 46,7% (HNI) der XX-Tiere einen männlichen Phänotyp aufwiesen. In der Gruppe der südlichen Medakas (Carbio, drR und HdrR) lag der Prozentsatz zwischen 2% (drR) und 61,3% HdrR. Bei *Oryzias curvinotus*, welches die Schwester-Art zu *Oryzias latipes* ist und auch über das geschlechtsbestimmende Gen *dmrt1bY* verfügt, wurden bei 25°C 16,7% geschlechtsumgewandelte XX-Tiere gefunden.

Stammbezeichnung	XY-Männchen	XX-Männchen	XX-Weibchen	XX-Männchen in %
<b>HNI</b>	27	7	8	46,7
<b>Kaga</b>	62	1	75	1,3
<b>Carbio</b>	86	10	91	9,9
<b>drR</b>	49	1	48	2,0
<b>HdrR</b>	222	138	87	61,3
<b><i>O. curvinotus</i></b>	17	2	10	16,7

**Tabelle 3: Einfluss des genetischen Hintergrunds auf die Stabilität der genetischen Geschlechtsbestimmung: Untersucht wurde die Verteilung bei 25°C. Grün sind die nördlichen Stämme, rot die südlichen Stämme von *Oryzias latipes* dargestellt.**

Bei unseren Versuchen mit den verschiedenen Stämmen von *Oryzias latipes* traten auch schon bei normalen Hälterungsbedingungen immer wieder XX-Männchen auf. Kollegen aus Japan berichteten, dass sich bei ihnen unter denselben Bedingungen (25°C, 14h Licht pro Tag) keine XX-Tiere zu Männchen entwickelten (Hattori et al., 2007). Der einzig offensichtliche Unterschied war die Hälterung der Stämme in „grünem“, also planktonreichem Wasser. Deswegen wurden Embryonen des HdrR-Stamms sowohl bei Klarwasser, als auch bei planktonreichem Wasser bei 25°C inkubiert. Interessanterweise unterschieden sich die Aufzucht bei grünem Wasser und normalem Wasser bei 25°C statistisch nicht (Chi-Quadrat-

Test, p-Wert: 0,323) (Tabelle 4). Ob sich die Aufzucht auf den kühleren Fensterbänken (ca. 18°C bis 20°C) auswirkt konnte statistisch noch nicht abschließend beurteilt werden, weil die Anzahl dieser Tiere noch zu gering war.

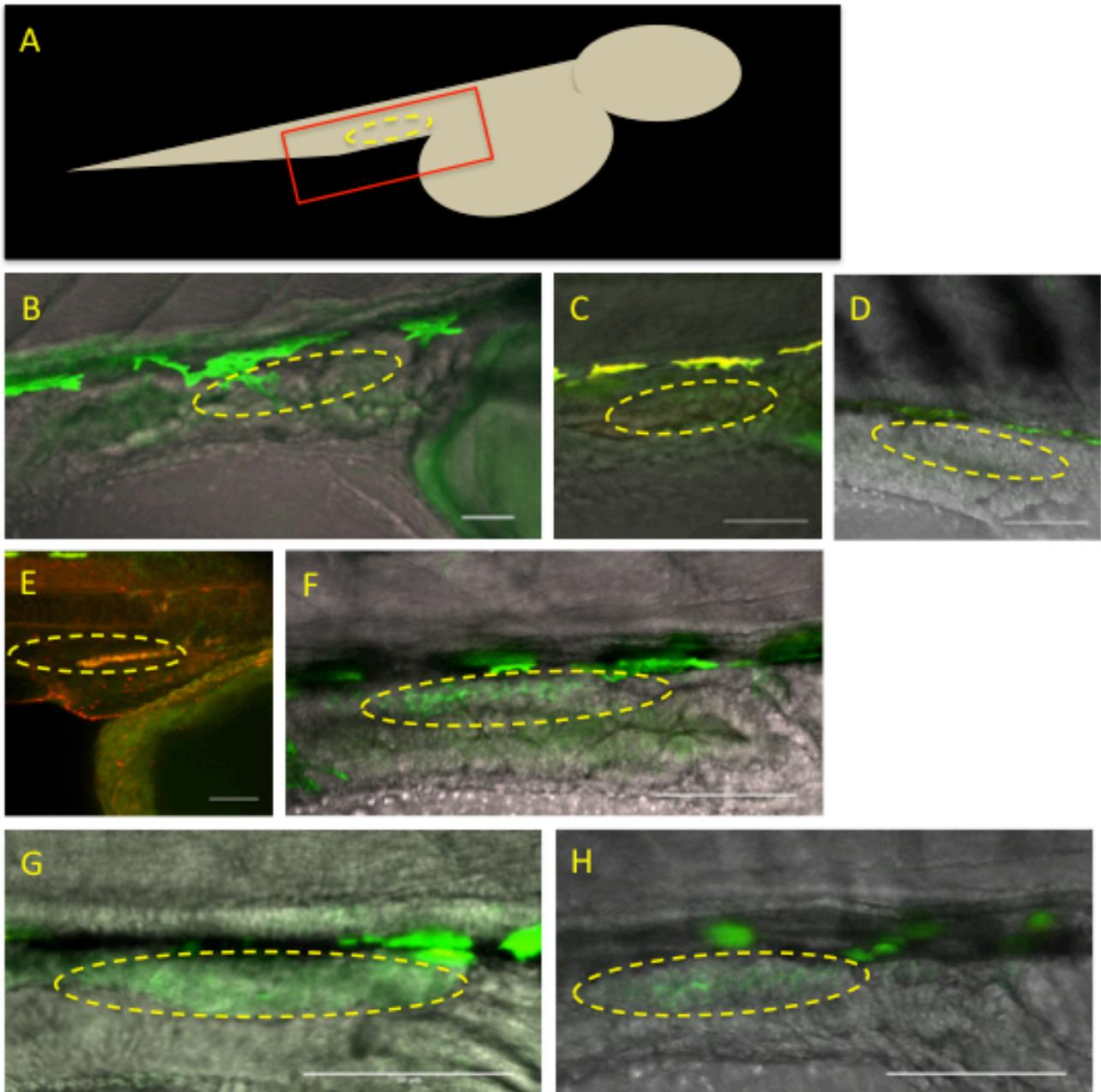
Aufzuchtbedingungen des HdrR Stamm	XY-Männchen	XX-Männchen	XX-Weibchen	XX-Männchen in %
Klarwasser, 25 °C	222	138	87	61,33
„Grünes Wasser“, 25°C	80	32	36	47,06
Klarwasser, ca .20°C	14	5	8	38,46

Tabelle 4: Auswirkung verschiedener Aufzuchtbedingungen auf die Geschlechtsentwicklung bei Medaka.

## 2. Expression von *DMRT1a* während der Embryonalentwicklung

Aus der Literatur war bekannt, dass die Expression von *dmrt1a* erst ab circa 20 Tagen nach dem Schlüpfen mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen werden kann (Hornung et al., 2007; Nanda et al., 2002; Ohmuro-Matsuyama et al., 2003). Diese Expression ist zudem nur in den männlichen Individuen (XY-Tieren) nachweisbar. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe einer transgenen Linie versucht herauszufinden, ab wann eine Expression des *dmrt1a*:GFP-Reporterkonstrukts sichtbar war, und ob sich diese Expression durch eine höhere Temperatur beeinflussen lässt. Diese BAC transgene Linie enthielt im Konstrukt vor dem GFP wahrscheinlich alle regulatorischen Sequenzen des *dmrt1a* Gens, weil durch diese Methode eine sehr große genomische Region vor dem eigentlichen Gen mit übertragen wurde. Deswegen sollte die Expression von GFP der Expression von *dmrt1a* entsprechen.

Bei den geschlüpften Tieren, die sich bei 25°C entwickelt hatten, war die erste Expression nach circa 11 Tagen sichtbar (Abbildung 2, E). Deutlich ist zu erkennen, dass das Konstrukt ausschließlich in den Sertolizellen, nicht aber in den Urgeschlechtszellen exprimiert wurde (Abbildung 2, F).



**Abbildung 2:** Expression von GFP unter dem *dmrt1a*-Promotor bei Hatchlingen, die bis zum Schlüpfen bei 25°C gehalten wurden:

**A:** Schematische Darstellung eines geschlüpften Embryos; Gestrichelte Linie: Gonadenregion; Rotes Rechteck: Region der Detailbilder B-H (Maßstab 50 µm); **B-E:** Lateralansicht der Gonadenregion ohne GFP-Expression (**B:** 1-2 dph; **C:** 3-4 dph; **D:** 5-6 dph; **E:** 8-9 dph) **F:** erste sichtbare GFP-Expression in den Sertolizellen (11 dph); **G** und **H:** Deutlich sichtbare *dmrt1a*::GFP Expression in den Sertolizellen an Tag 12 und 14 nach dem Schlüpfen

Waren die Embryonen jedoch bis zum Schlüpfen bei 34°C gehalten worden, konnte bei den meisten Tieren eine deutlich frühere Expression von GFP beobachtet werden (Abbildung 3). Da wir wissen wollten, ob die frühere Expression zu mehr Männchen führt, haben wir unsere

Analysen hauptsächlich auf diese Gruppe beschränkt. Jedoch waren auch wenige Tiere dabei, die keine Expression in den Sertolizellen und kaum Expression in den Pronephros aufwiesen.

Bei der Gruppe der Fische, die eine frühere *dmrt1a::GFP* Expression hatten, zeigte sich die spezifische Expression in den Sertolizellen schon in den gerade geschlüpften Fischen (Abbildung 3, B), teilweise aber auch schon vor dem Schlüpfen (nicht gezeigte Daten). Zum anderen konnte vor allem im hinteren Teil der embryonalen Niere (Pronephros), also vom Anus ab anterior, die Expression des *dmrt1a::GFP* Konstrukts beobachtet werden. Die Expression in den Nierenvorläuferzellen war bei den frisch geschlüpften Tieren sehr stark (Abbildung 3 B), verblasste aber circa ab dem 6 Tag (Abbildung 3, E) nachdem die geschlüpften Embryonen in 25°C warmes Embryonenmedium transferiert waren. So konnte im Laufe der Entwicklung die Expression zwischen dem 20. und 30. Tag nach dem Schlüpfen kaum mehr wahrgenommen werden (Abbildung 3, K bis N). Die GFP-Expression in den Sertolizellen war jedoch, wie auch bei den Embryonen aus den 25°C Versuchen weiterhin sichtbar.

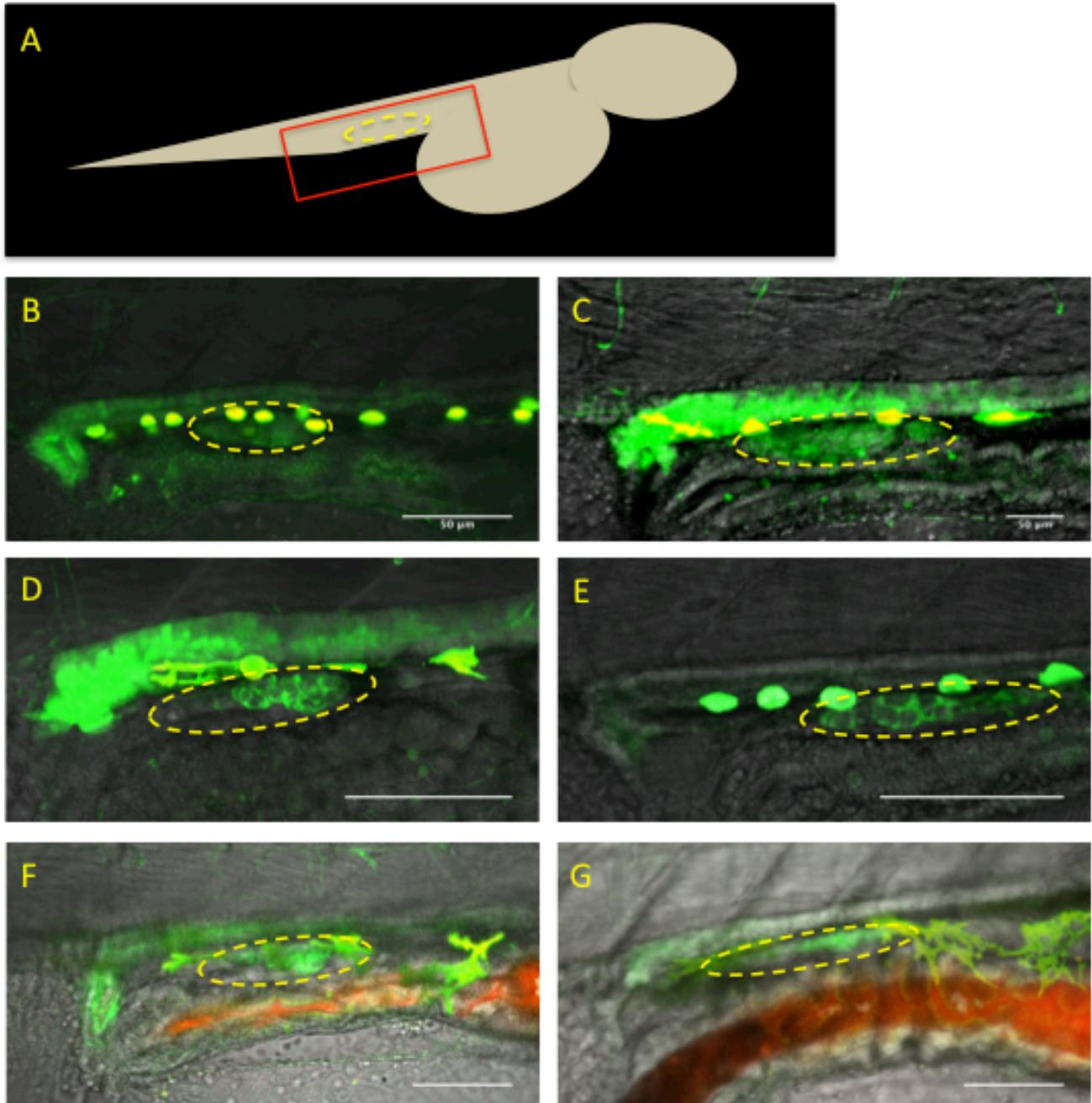


Abbildung 3: *dmrt1a::GFP* Expression bei Hatchlingen, die bis zum Schlüpfen bei 34°C gehalten wurden und danach bei 25°C aufgezogen wurden.

A: Schematische Darstellung eines geschlüpften Embryos; Gestrichelte Linie: Gonadenregion; Rotes Rechteck: Region, der Detailbilder B-G (Maßstab 50µm); Expression des *dmrt1a::GFP*-Konstrukts ist bei 34°C schon beim Schlüpfen sichtbar. Neben der Expression in den Sertolizellen ist eine Expression in den pronephrischen Zellen zu sehen. B: 1-2 dph; C: 2-3 dph; D: 4-6 dph; E: 7 dph; F: 8 dph; G: 9dph

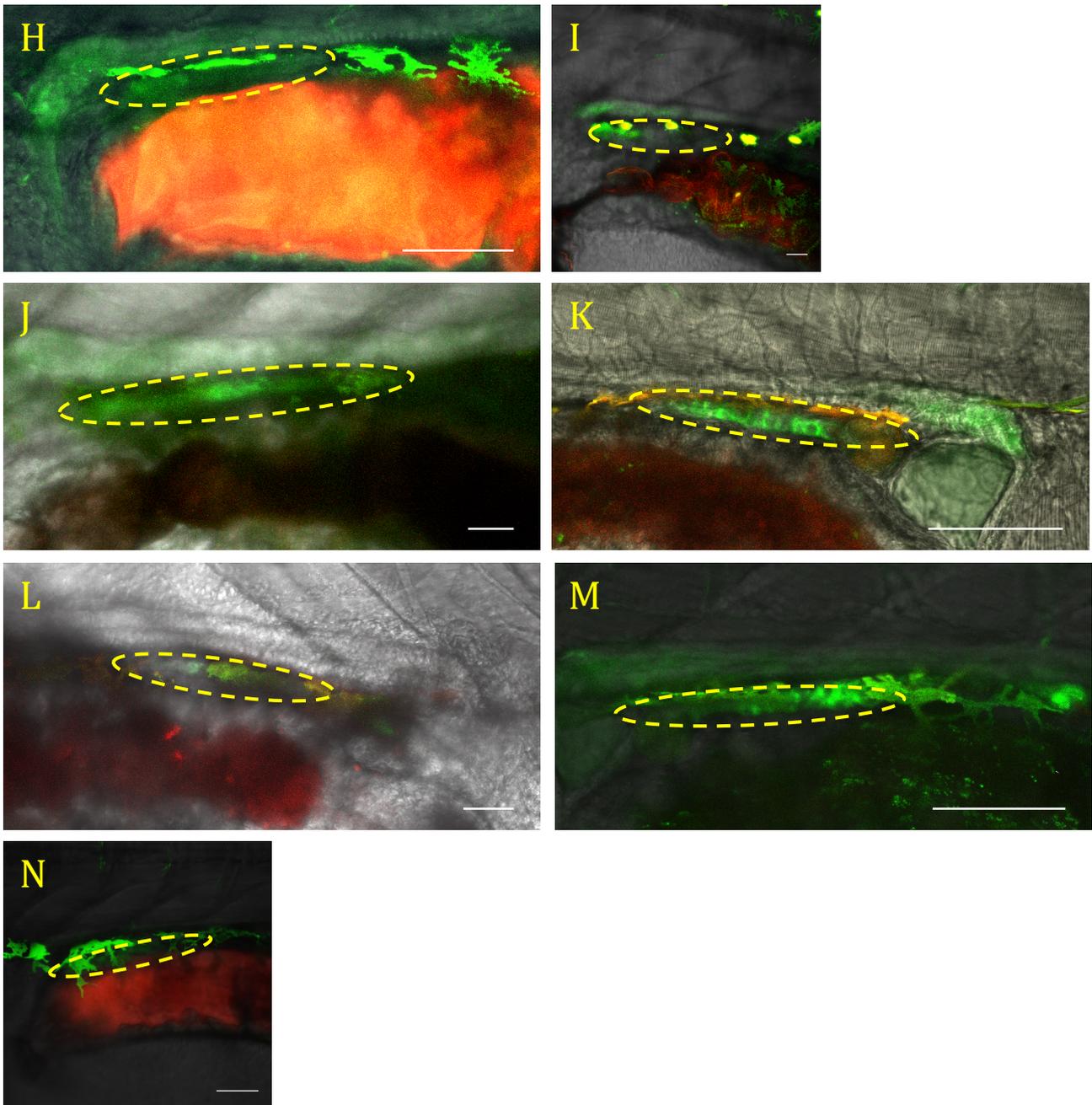


Abbildung 3 - Fortsetzung: *dmrt1a::GFP* Expression bei Hatchlingen, die bis zum Schlüpfen bei 34°C gehalten wurden und danach bei 25°C aufgezogen wurden.

Detailbilder H-N (Maßstab 50 µm) der Gonadenregion; Expression des *dmrt1a::GFP*-Konstrukts ist bei den 34°C Embryonen auch nach dem Schlüpfen weiterhin sichtbar. Die Expression in den Pronephrischen Zellen fängt ab 11 dph (H) an zu verblassen. H: 11 dph; I: 14 dph; J: 16 dph; K: 18 dph; L: 22 dph; M: 24 dph; N: 35 dph

Die Embryonen, bei denen die Expression des Konstrukts beim Schlüpfen sowohl in den Sertolizellen, als auch in den Nierenvorläuferzellen sichtbar war, waren genotypisch sowohl

männlich (XY), als auch weiblich (XX) (Tabelle 5). Jedoch stimmte bei den getesteten adulten Tieren der Genotyp und der Phänotyp überein.

Entwicklungszustand	XX-Tiere	XY-Tiere
<b>Embryonen</b>	8	13
<b>Adulte Tiere</b>	5 (alles Weibchen)	5 (alles Männchen)

**Tabelle 5: Verteilung des genetischen Geschlechts**

Die Tiere wurden als Embryonen bei 34°C inkubiert und zeigten die Expression von *dmrt1a::GFP* beim Schlüpfen sowohl in den Sertolizellen, als auch in den pronephrischen Zellen.

Jedoch traten auch bei der transgenen Linie mit dem Konstrukt *dmrt1a::GFP* mehr XX-Männchen auf, wenn die Embryonen bis zum Schlüpfen statt bei 25°C bei 34°C inkubiert wurden (Tabelle 6). So betrug der Prozentsatz über 30% (34°C) statt der knapp 17% (25°C). Dabei wurden alle Tiere berücksichtigt ungeachtet der Expression des Konstrukts.

Temperatur	XY-Männchen	XX-Weibchen	XX-Männchen	Prozentsatz der XX-Männchen
<b>25°C</b>	25	15	3	16,67
<b>34°C</b>	32	26	11	30,56

**Tabelle 6: Geschlechterverteilung der transgenen Linie *DMRT1a::GFP* bei verschiedenen Temperaturen**

Die Embryonen wurden bis zum Schlüpfen bei 25°C bzw. 34°C gehalten. Bei höherer Temperatur treten mehr XX-Männchen auf.

### 3. Die Wanderung der primordialen Keimzellen und der Einfluss von *sdf1a/b* auf diese

Als Voraussetzung für die Manipulation der Anzahl der primordialen Keimzellen wurden zunächst die Faktoren untersucht, welche die normale Wanderung und die Anzahl in der prospektiven Gonade beeinflussen. Da bekannt war, dass *sdf1b* die Wanderbewegungen beeinflusst (Kurokawa et al., 2006), wurde auch die Rolle von *sdf1a* und die potentielle Substitution durch *sdf1b* untersucht. Dazu wurden Morpholinos gegen den Translationsstart

und gegen das korrekte Spleißen von *sdf1a* beziehungsweise *sdf1b* injiziert. Zusätzlich wurde GFP-*nanos*:3'UTR mRNA in das Ein-Zell-Stadium der Embryonen injiziert, um die Wanderung der Urgeschlechtszellen verfolgen zu können.

### 3.1. Knockdown von *sdf1a*

Schon früh in der Entwicklung der Embryonen, im Embryonalstadium 15, wenn bei Wildtyp-Embryonen die PGCs von ihren verstreuten Bildungsorten zur dorsalen Randzone wandern (Abbildung 4, A), bleiben die Urgeschlechtszellen bei den *sdf1a*-Morphanten eher um den animalen Pol verstreut (Abbildung 4, D). Zum Zeitpunkt des Abschlusses der Neurulation sind diese PGCs, die zunächst großflächig verstreut waren, in Richtung Körperachse gewandert. Dennoch blieben sie entlang der gesamten Achse verstreut (Abbildung 4, E und F) und nicht konzentriert auf den hinteren Bereich, wie in den Kontrollen (Abbildung 4, B und C). Während der Somitogenese gruppierten sich sowohl bei den Kontroll-Embryonen, als auch bei den *sdf1a*-Morphanten die PGCs, die sich im Seitenplattenmesoderm („lateral plate mesoderm“) befanden. Dennoch fanden sich bei den Morphanten auch noch einige PGCs, die es nicht geschafft hatten in die richtige Region zu wandern (Abbildung 4, Detailbilder P und R), über den ganzen Dottersack verstreut.

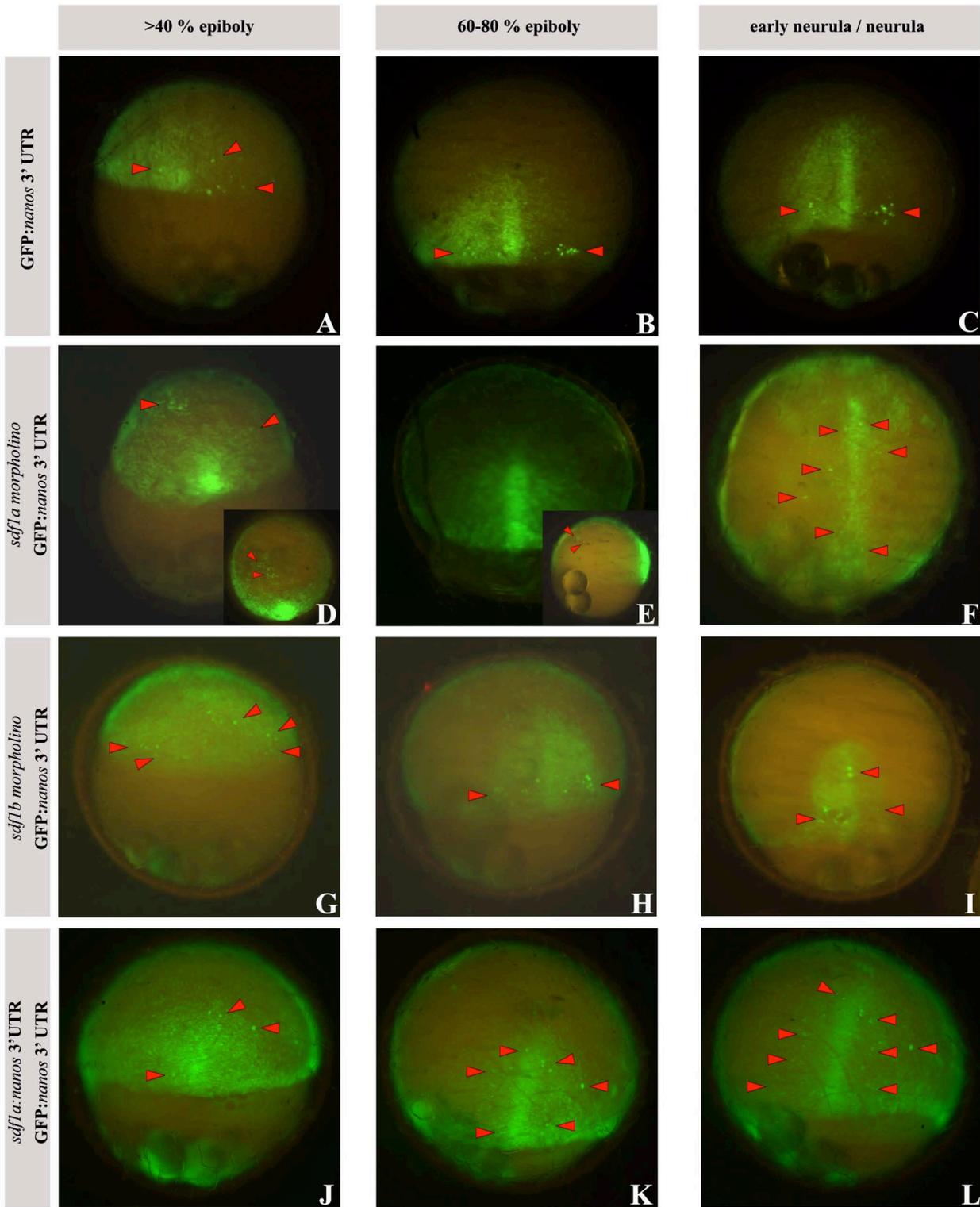


Abbildung 4: Einfluss von *sdf1a* und *sdf1b* Knockdown bzw. *sdf1a* Überexpression auf die Wanderung der Urgeschlechtszellen während der Embryonalentwicklung.

Die Embryonen wurden injiziert mit GFP:*nanos* 3' UTR und *sdf1a*- bzw. *sdf1b*- Morpholinos oder *sdf1a:nanos* 3' UTR. Die Wanderung der PGCs wurde verglichen: 40% Epibolie (A, D, G, J), 80% Epibolie (B, E, H, K), frühe Neurula (C, F, I, L), späte Neurula (M, P, S, V), 15 Somiten-Stadium (N, Q, T, W) und 22 Somiten-Stadium (O, R, U, X). Die verschiedenen Einfügungen zeigen falsch gewanderte PGCs, wie im Aufsichtsbild (D), laterale Ansicht (E, P) und die Vergrößerung des Kopfes (R, T) des jeweiligen Embryos

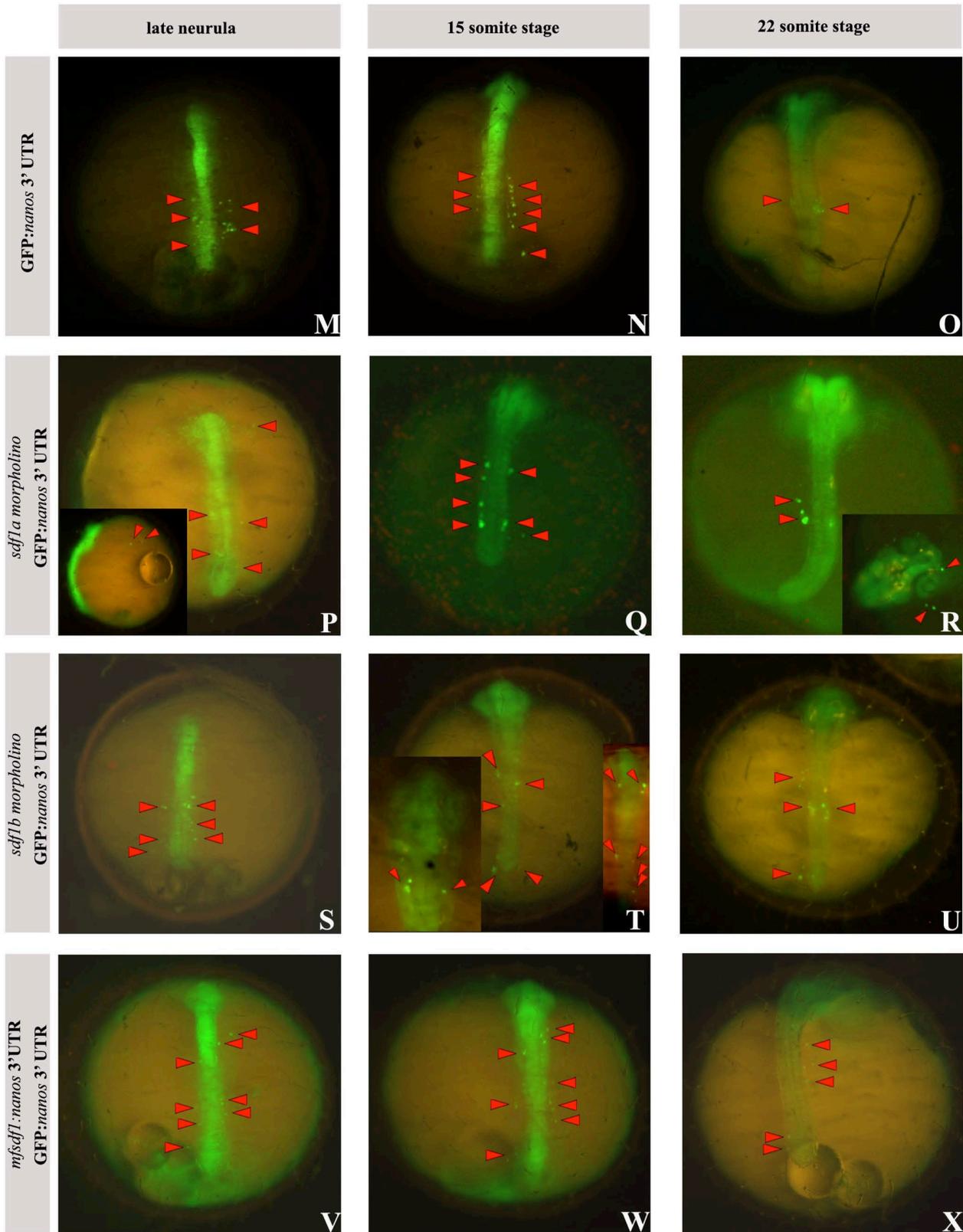


Abbildung 4 - Fortsetzung: Einfluss von *sdf1a* und *sdf1b* Knockdown bzw. *sdf1a* Überexpression auf die Wanderung der Urgeschlechtszellen während der Embryonalentwicklung.

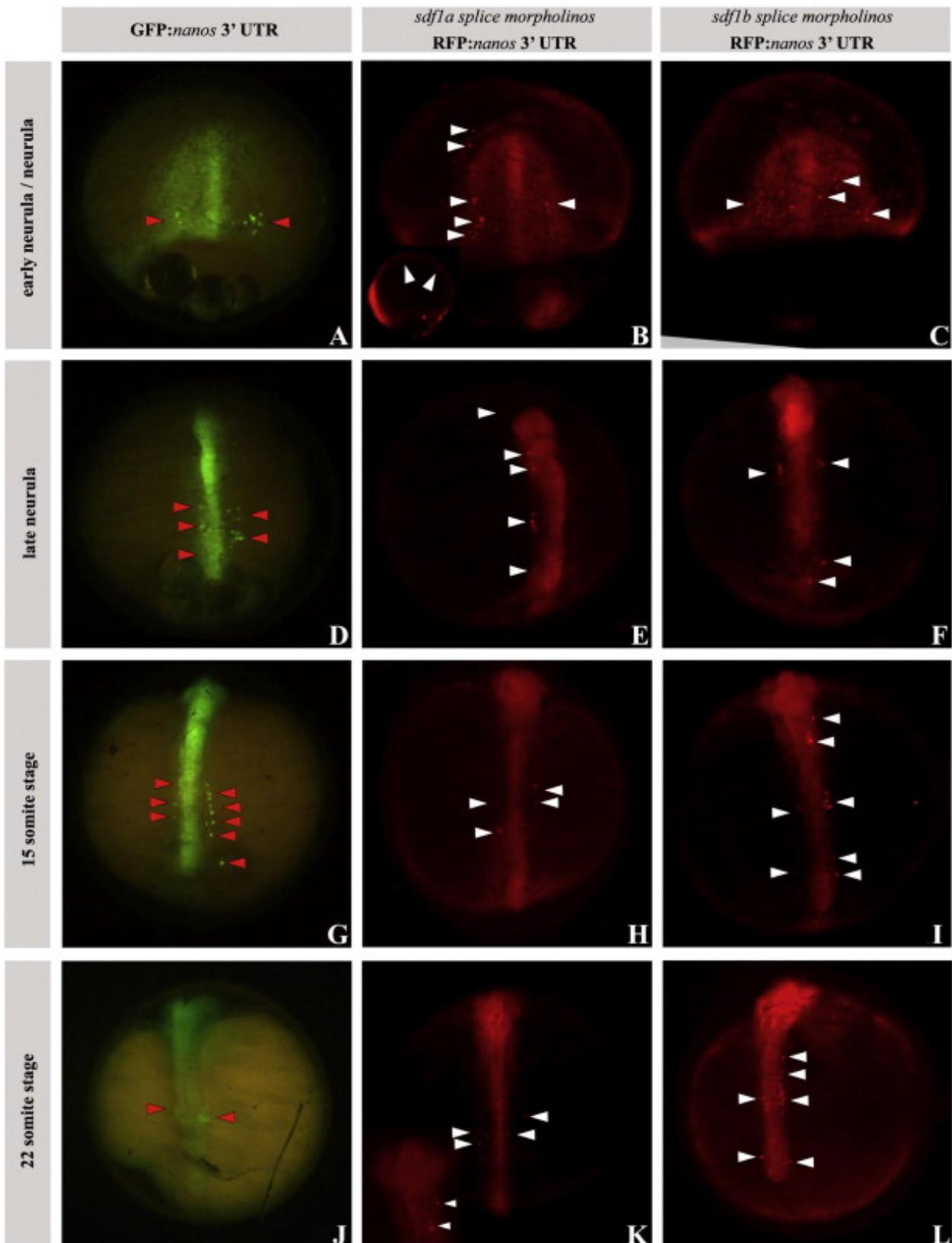
### 3.2. Knockdown von *sdf1b*

Embryonen, denen Morpholinos gegen *sdf1b* injiziert wurden, zeigten gegenüber den Kontrollen in den frühen Entwicklungsstadien keine Unterschiede in der Wanderung der PGCs (Abbildung 4, G bis I). Nach der Blastula konzentrierten sich die PGCs in beiden Fällen in der Randzone und wanderten dann zum dorsalen Teil dieser Zone (Abbildung 4, G und H). Danach, während der Neurula, sammelten sich die PGCs zu Gruppen im hinteren Teil der embryonalen Achse (Abbildung 4, I) herum. Die ersten Unterschiede bei der Wanderung der PGCs wurden zu dem Zeitpunkt beobachtet, zu dem die PGCs von der Schwanzknospe in Richtung Seitenplattenmesoderm wanderten. Dies geschah in den Stadien 24 -25. Im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 4, M bis O) verblieben bei den Morphanten (Abbildung 4, S bis U) die meisten PGCs im Seitenplattenmesoderm und wanderten nicht weiter in die zukünftige Gonade.

Für beide *sdf1*-Varianten wurden sowohl translationshindernde Morpholinos, als auch Morpholinos gegen das korrekte Spleißen eingesetzt. Die beiden Arten der Morpholinos gegen ein Gen führten jeweils zum selben Phänotyp mit der gestörten Wanderung der Urgeschlechtszellen (Vergleich zwischen Abbildung 4 und Abbildung 5). Durch die Spleiß-Morpholino Variante konnte nachgewiesen werden, dass durch deren Injektion die Transkriptmenge von *sdf1* zu 30% oder mehr unterdrückt wurde (Abbildung 6, E bis G). Dies wiederum war ausreichend, um eine korrekte Wanderung der PGCs entlang des *sdf1*-Gradienten zu unterdrücken.

**Abbildung 5: Beeinträchtigung der Wanderung der primordialen Keimzellen nach der Injektion von Spleiß-Morpholinos.**

Die Embryonen wurden mit RFP:*nanos* 3'UTR und zusätzlich entweder dem Spleiß-verhindernden Morpholino gegen *sdf1a* oder *sdf1b* coinjiziert. Die Morphanten wurden hinsichtlich der Wanderung der Urgeschlechtszellen während der frühen Embryogenese verglichen: frühe Neurula (A, B und C), späte Neurula (D, E und F), 15 Somiten-Stadium (G, H und I) und das 22 Somiten-Stadium (J, K und L). Die Beeinträchtigung der Wanderung der primordialen Keimzellen war bei den Spleißen-verhindernden und Translationsblockenden Morpholinos vergleichbar.



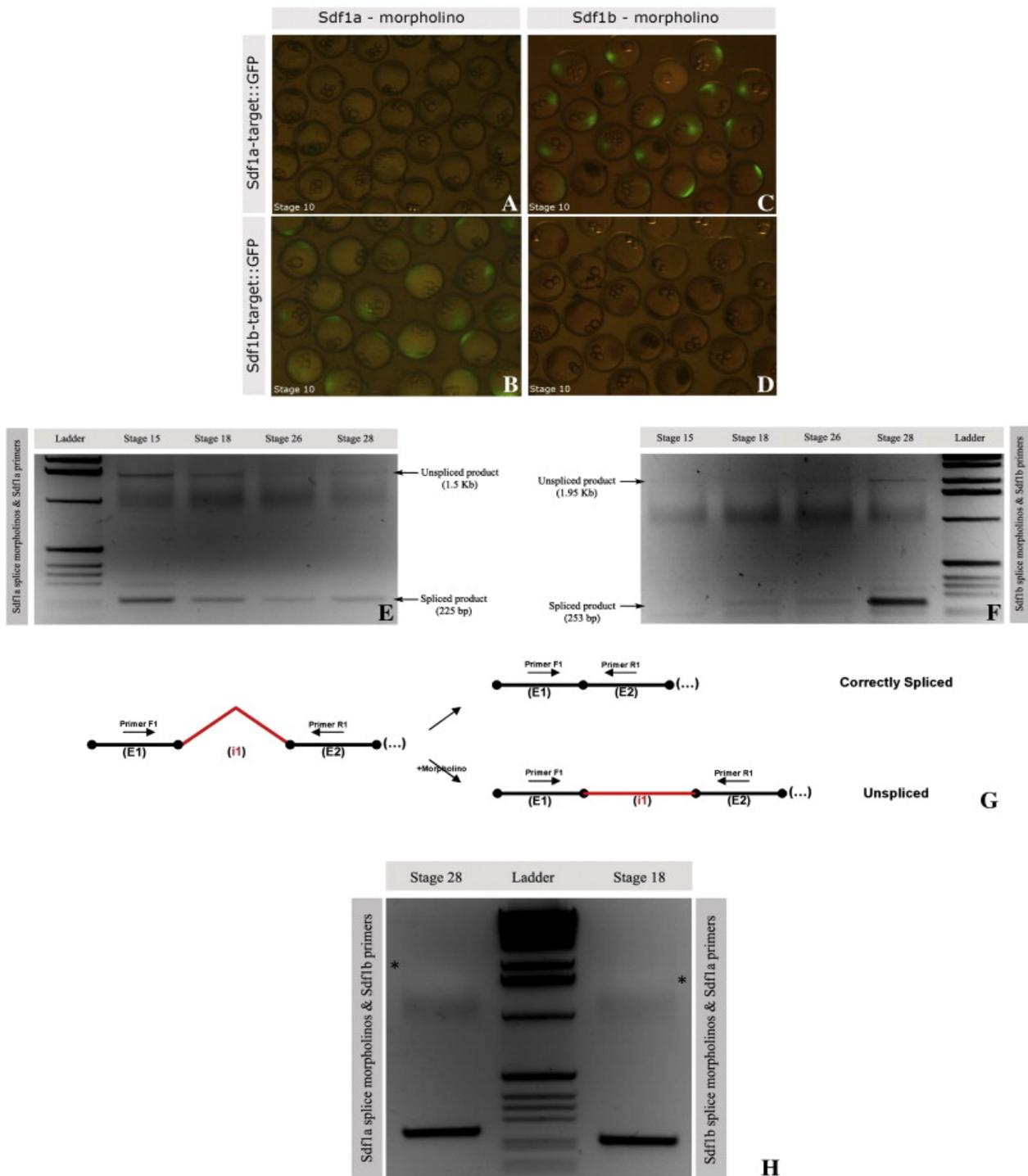


Abbildung 6: Analyse der Effektivität und Spezifität des *sdf1*-Knockdowns:

(A-D) Es wurden Plasmide mit *sdf1a* bzw. *sdf1b* Morpholino Zielsequenzen, die mit dem offenen Leseraster von GFP fusioniert wurden hergestellt und *in vitro* transkribiert. Die RNA alleine zeigte starke GFP-Expression. In Kombination mit dem korrespondierenden Morpholino konnte keine GFP-Expression festgestellt werden. Die Spezifität der Morpholinos wurde gezeigt, da die Expression nicht gemindert wurde, wenn die RNA mit dem jeweils anderen Morpholino injiziert wurde.

(F-H) Das Maß der Aktivitätsminderung von *sdf1a* und *sdf1b* wurde durch Spleiß-Morpholinos überprüft. Dafür wurde eine RT-PCR mit Intron-überspannenden Primern mit cDNA von unterschiedlichen Stadien Morpholino-injizierter Embryonen durchgeführt (E-G). Die Spezifität der Spleiß-Morpholinos wurde auf demselben Weg gezeigt (H), indem keine ungespleißten Produkte in der RT-PCR auftraten.

### 3.3. Doppelknockdown von *sdf1a* und *sdf1b*

Zusätzlich wurde neben den Einzelknockdowns von *sdf1a* und *sdf1b*, auch ein zeitgleicher Doppelknockdown von *sdf1a* und *sdf1b* durchgeführt. Um potentiell synergistische Effekte zu untersuchen (Abbildung 7) wurde der Knockdown der einzelnen Gene mit dem zeitgleichen Knockdown beider Gene verglichen. Dabei wurden die Urgeschlechtszellen in verschiedenen Embryonalstadien gezählt und deren Verteilung in verschiedenen Bereichen festgehalten. Dabei zeigte sich, dass verglichen mit den Einzelknockdowns die PGCs in der Gastrula und zu Beginn der Neurula beim Doppelknockdown etwas weiter verstreut waren. Zum Zeitpunkt, an dem sich die PGCs vom Seitenplattenmesoderm zur zukünftigen Gonade bewegen (Stadium 26), war die Verteilung jedoch kaum unterschiedlich bei Einzel- und Doppelknockdown. Deswegen können synergistische Effekte in späteren Stadien ausgeschlossen werden, auch wenn es wahrscheinlich ist, dass in den frühen Entwicklungsstadien (vor dem Stadium 15) *sdf1a* und *sdf1b* zu einem gewissen Teil redundante Aufgaben haben.

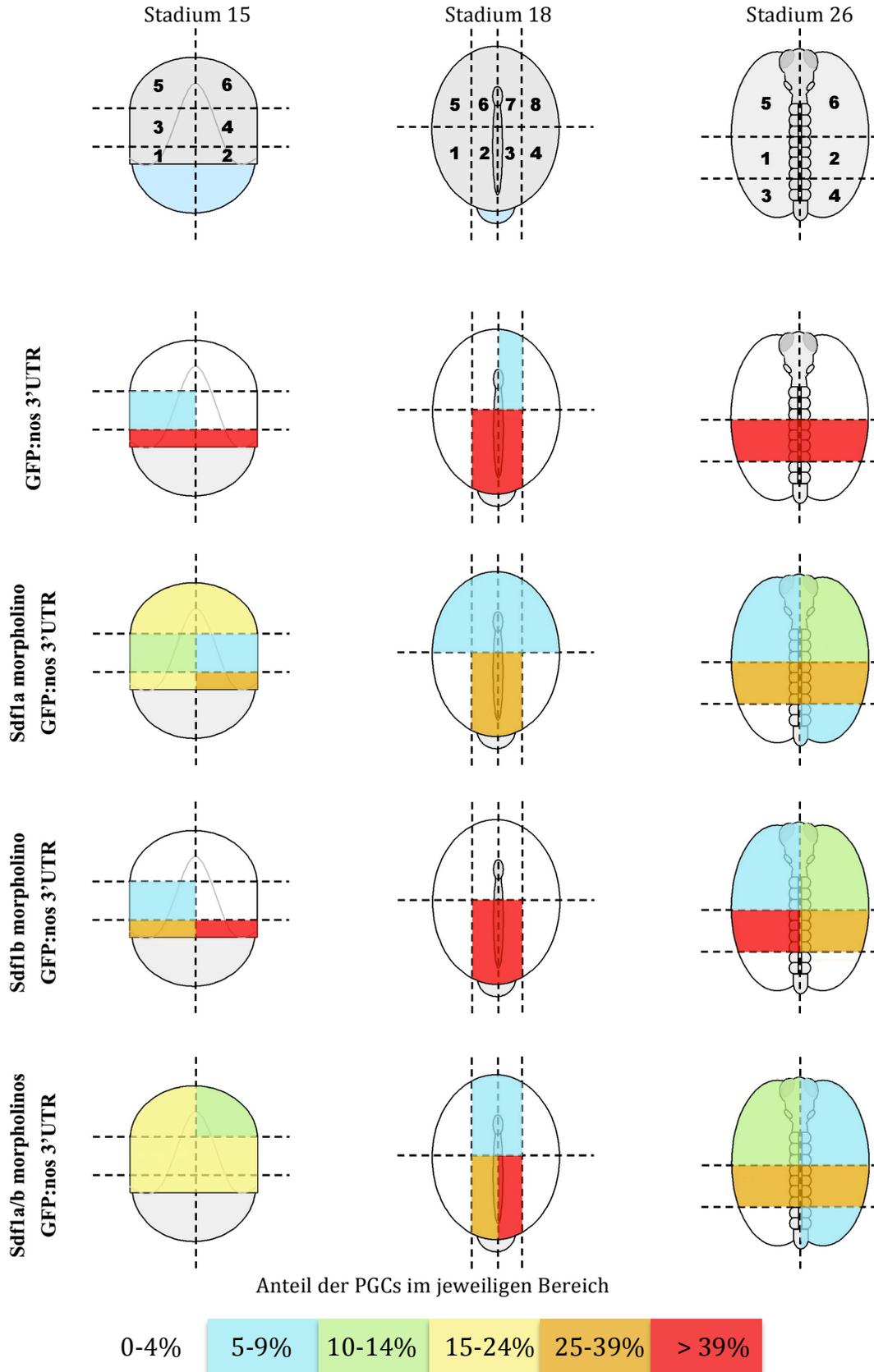


Abbildung 7: Schematische Darstellung der PGC-Verteilung

Die Embryonen wurden mit GFP:*nanos* 3'UTR und dem translationsverhindernden Morpholino gegen *sdf1a* bzw. *sdf1b*, oder gegen beide *sdf1* injiziert. Die Urgeschlechtszellen wurden in verschiedenen Entwicklungsstadien (Gastrula, frühe Neurula und 22 Somiten-Stadium) gezählt und den entsprechenden Bereichen zugeordnet. Die Kontrollembryonen wurden nur mit GFP:*nanos* 3'UTR injiziert.

#### 4. Manipulation der Anzahl der primordialen Keimzellen und deren Einfluss auf die Geschlechtsbestimmung

Die Anzahl der Urgeschlechtszellen bei *Oryzias latipes* ist bei Männchen und Weibchen während der Embryonalentwicklung bis kurz vor dem Schlüpfen identisch. Dann jedoch erhöht sich die Anzahl bei den späteren Weibchen drastisch, während sie bei den späteren Männchen ungefähr gleich bleibt (Kobayashi et al., 2004). Damit ist die Anzahl der Urgeschlechtszellen der erste morphologische Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern. Um zu klären, ob die Anzahl der Urgeschlechtszellen drüber entscheidet welches Geschlecht gebildet wird, wurde versucht im Experiment die Anzahl der Urgeschlechtszellen zu manipulieren und so den möglichen Einfluss auf das spätere Geschlecht zu untersuchen.

##### 4.1. Vollständige Beseitigung der Urgeschlechtszellen

Durch Injektion eines Morpholinos gegen *deadend (dnd)*, das im Zebrafisch im Keimplasma und in den primordialen Keimzellen exprimiert wird, konnte die Einnistung der PGCs in die tiefe Dotter-Syncytium-Schicht (yolk syncytial layer) verhindert werden. Weiterhin wird durch das Morpholino die aktive Migration der PGCs unterdrückt und so das Absterben dieser bewirkt (Weidinger et al., 2003). Das Morpholino gegen das *deadend*-Gen von Medaka injiziert in das Ein-Zell-Stadium der Medakaembryonen sorgte dafür, dass hier im beobachteten Zeitraum keine primordialen Keimzellen erkennbar waren. Während durch die Injektion von *GFP:nanos-3'UTR* in den Kontrollen (Abbildung 8, A bis C) deutlich die Wanderung der Urgeschlechtszellen beobachtet werden konnte, waren bei den Embryonen, die zusätzlich das *dnd* Morpholino erhielten, in vergleichbaren Stadien (Abbildung 8, D bis F) keinerlei PGCs zu sehen. Danach konnten auch während der gesamten weiteren Embryonalentwicklung keine primordialen Keimzellen beobachtet werden (Abbildungen 8 und 9).

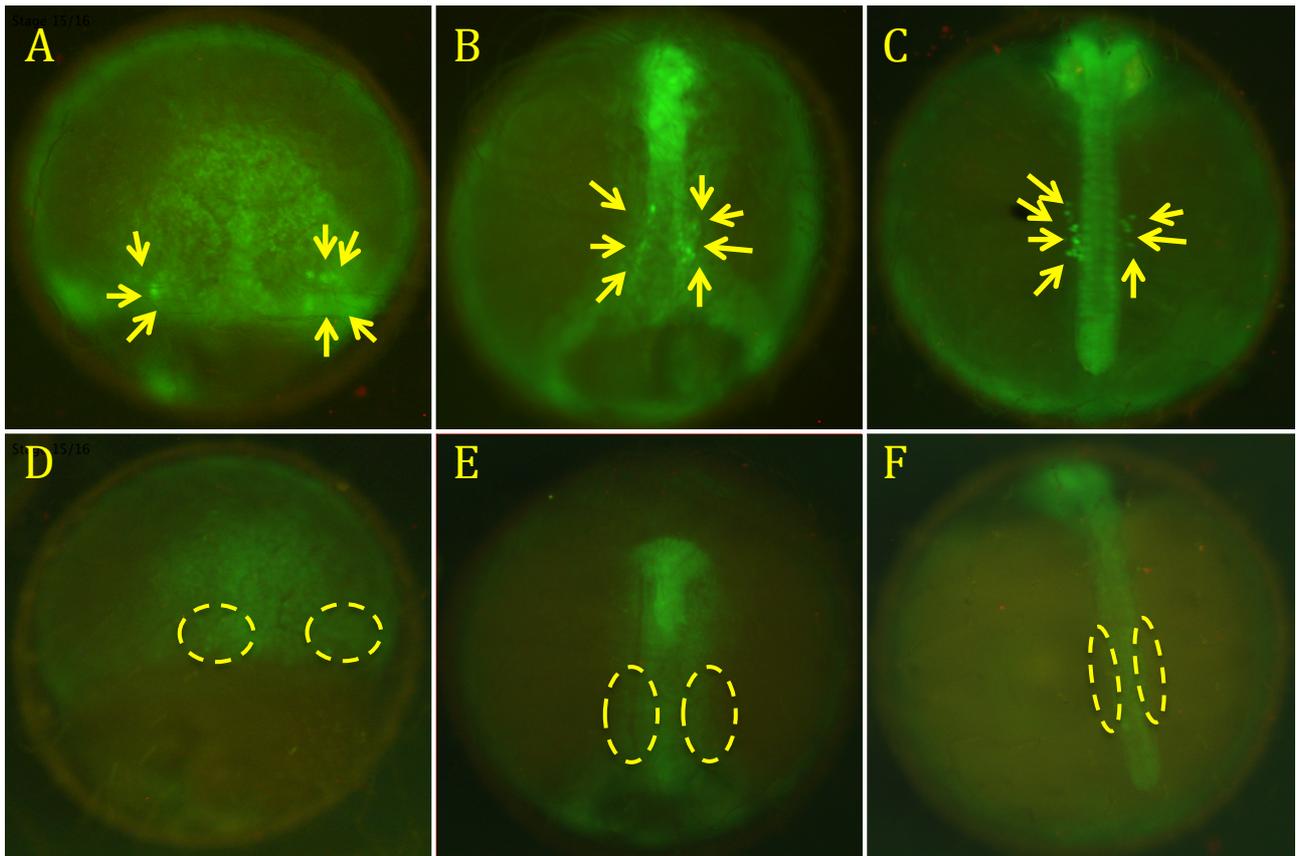
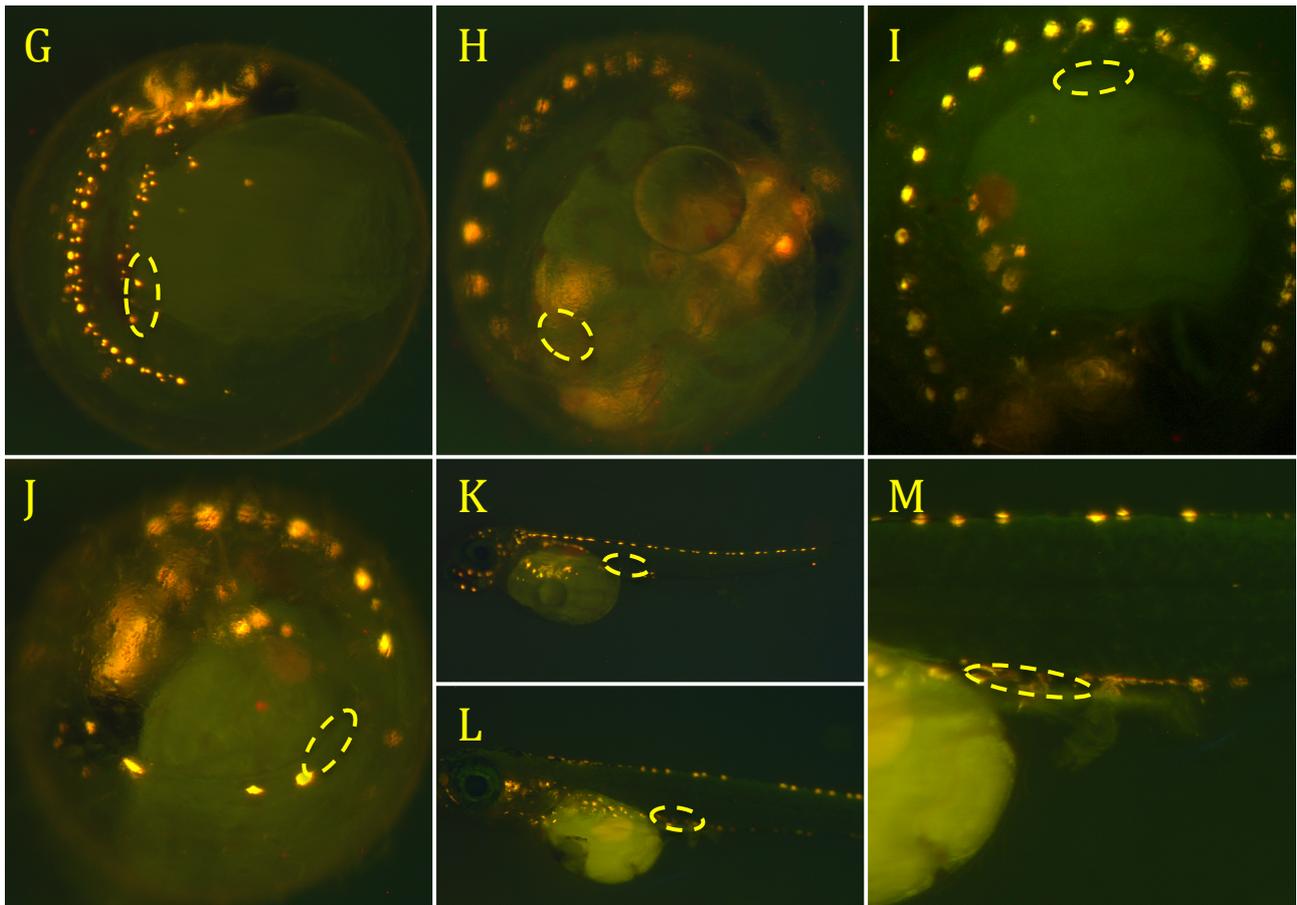


Abbildung 8: Ablation der Keimzellen durch *deadend* Morpholino Injektion (frühe Entwicklungsstadien):

A -C Kontrolle, D-E: *deadend* Morpholino Injektionen; Pfeile zeigen auf die primordialen Keimzellen; Gestrichelte Ovale zeigen die Region, in der die primordialen Keimzellen zu finden sein sollten. A, D Stadium 15; B, E Stadium 18; C, F Stadium 26; Zu keinem Entwicklungszeitpunkt können in den *deadend* Morpholino injizierten Embryonen primordiale Keimzellen entdeckt werden.



**Abbildung 9: Ablation der Keimzellen durch deadend-Morpholino Injektion (spätere Entwicklungsstadien):**

Es sind während der gesamten Embryonalentwicklung keine Urgeschlechtszellen sichtbar. Gestrichelte Ovale: Region, in der die Urgeschlechtszellen zu finden sein sollten. G: Stadium 29; H: Stadium 33; I: Stadium 37; J: Stadium 39; K-M: Stadium 40 = Tag des Schlüpfens

Um sicher zu gehen, dass das Fehlen der primordialen Keimzellen nicht auf zu wenig *GFP:nanos-3'UTR* beruht, wurde das *deadend* -Morpholino auch in das Ein-Zell-Stadium einer *vasa:GFP* transgenen Linie injiziert. Ohne dieses Morpholino waren die primordialen Keimzellen während der Embryonalentwicklung sichtbar (Abbildung 10, A bis D). Vergleicht man die frisch geschlüpften Embryonen mit *deadend*-Morpholino Injektion (Abbildung 10, F) und ohne Injektion (Abbildung 10, E) kann man gut erkennen, dass auch bei dieser transgenen Linie keinerlei Keimzellen mehr zu sehen sind.

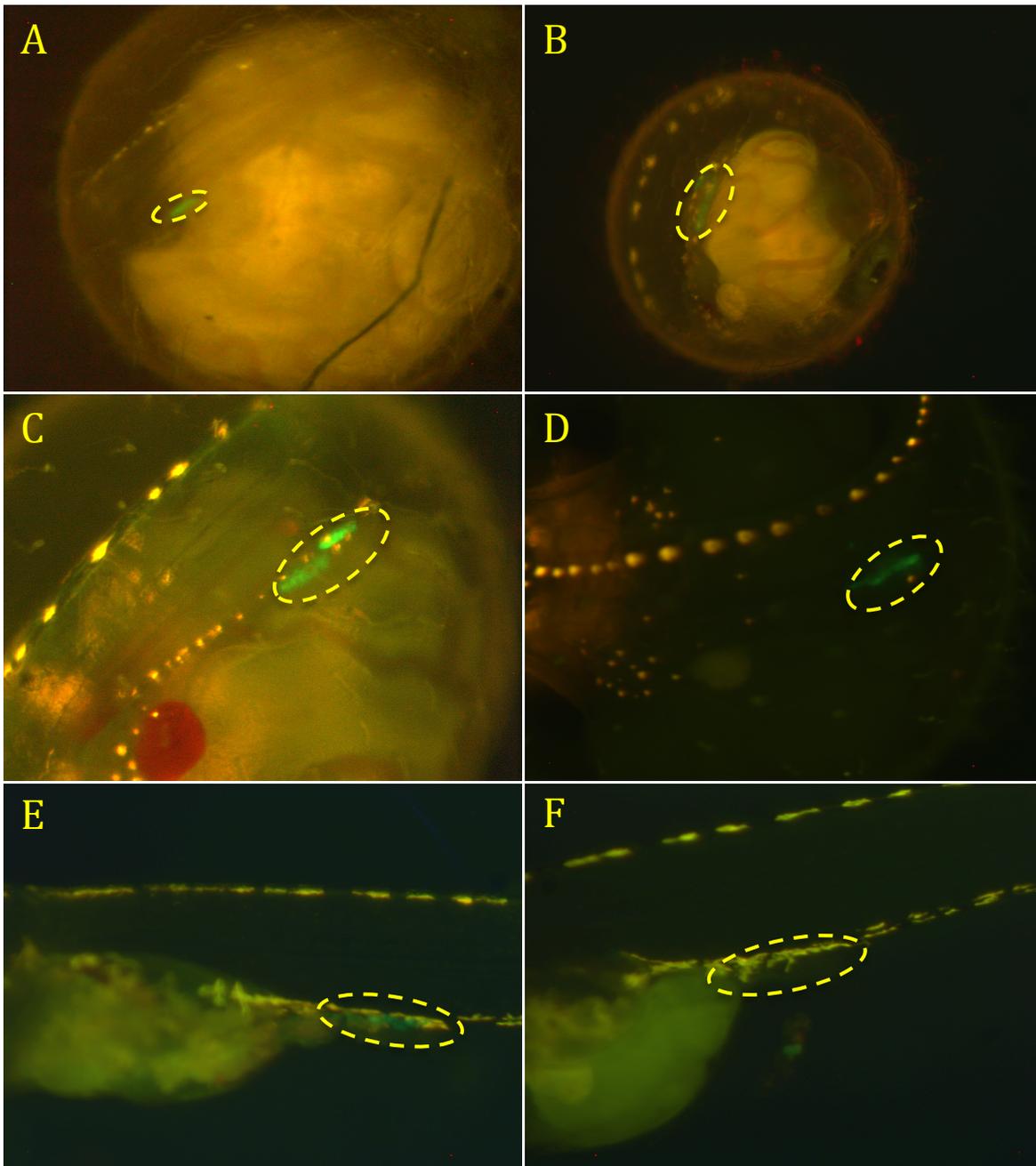
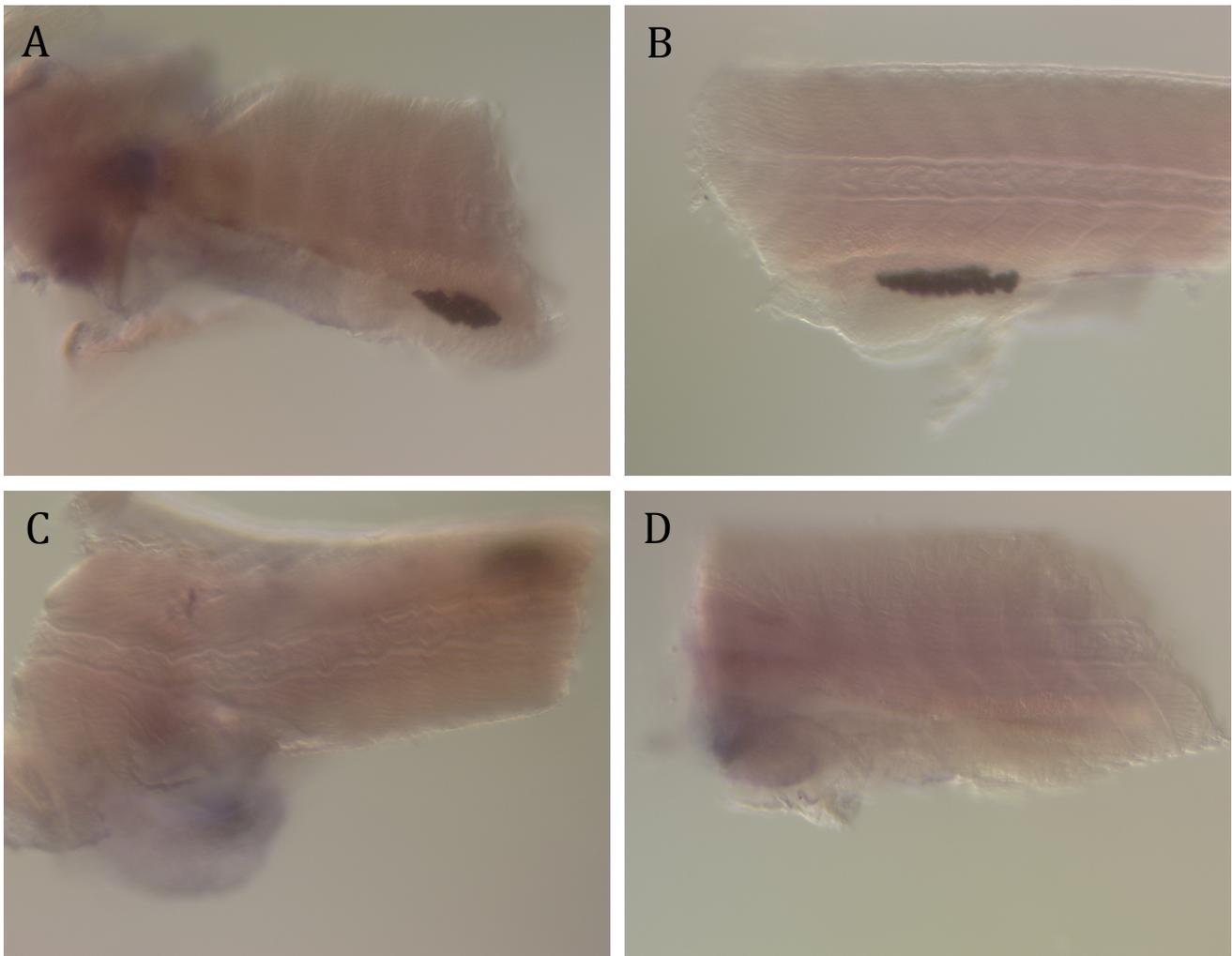


Abbildung 10: : Entwicklung der Keimzellen bei *vasa:GFP* transgenen Fischen:

Während der Embryonalentwicklung können durch das *vasa:GFP* Konstrukt die primordialen Keimzellen sichtbar gemacht werden. Gestrichelte Ovale: Region, in der die Keimzellen zu finden sind oder sein sollten. A, B: Stadium 31; C, D: Stadium 37; E,F: Stadium 40 = Tag des Schlüpfens

Als weitere Kontrolle, ob alle primordialen Keimzellen im sich entwickelnden Embryo ablatiert wurden, wurde eine In-situ-Hybridisierung mit einer *vasa*-Probe, die bei Medaka spezifisch die Urgeschlechtszellen markiert, durchgeführt (Abbildung 11). Während in den Kontrollen deutlich die *vasa*-positiven Zellen in der Gonadenregion angefärbt wurden, konnte in den *deadend*-Morphanten keine verbliebenen Urgeschlechtszellen nachgewiesen werden.



**Abbildung 11: Vasa In-situ-Hybridisierung von *deadend* – Morpholino injizierten Fischen:**

**Vasa - positive Zellen in den Kontroll-Fischen A (Stadium 29) und B (Stadium 31); Abwesenheit von Vasa-positiven Zellen in den *deadend* – Morpholino injizierten Fischen in den gleichen Stadien (C und D).**

Um zu analysieren, welchen Einfluss die vollständige Abwesenheit von primordialen Keimzellen auf die Geschlechtsdifferenzierung hat, wurden die *deadend*-Morphanten bei normalen Hälterungsbedingungen aufgezogen. Die Embryonen ohne Urgeschlechtszellen entwickelten sich mehrheitlich zu phänotypisch normalen Männchen (Tabelle 7) mit regelgerechter Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale (Rückenflosse, Haken an den Flossenstrahlen der Afterflosse) (Abbildung 12, A und B).

Konzentration des <i>deadend</i> -Morpholinos	Anzahl der phänotypischen Männchen	Anzahl der phänotypischen Weibchen	Summe der <i>deadend</i> -Morphanten
3,125ng/µl	103	7	110

Tabelle 7: Verteilung des Phänotyps adulter Fische bei der Injektion von *deadend* – Morpholino.

Diese zeigten mit Wildtyp-Weibchen normales Balz- und Begleitverhalten und konnten die Weibchen zum Eier legen animieren. Um zu überprüfen, ob die Männchen fertil sind, wurden diese jeweils mit mehreren normalen Weibchen verpaart und 2 Wochen lang täglich Eier abgenommen. Die Entwicklung der Eier wurde beobachtet, jedoch waren die Eier (< 250 Stück je Männchen) allesamt unbefruchtet. Von den 110 phänotypischen Männchen wurden 98 Stück verpaart. Diese waren alle infertil. Anschließend wurde das genetische Geschlecht bestimmt. 48 der infertilen Männchen hatten einen Chromosomensatz mit zwei X-Chromosomen, die restlichen 50 einen mit je einem X- und Y-Chromosom. Von diesen getesteten Männchen wurden 20 seziiert. Die Sektion der *deadend*-Morphanten ergab, dass der Hoden schmaler und farbloser war als bei Wildtyp-Männchen (Abbildung 12, C). Schnitte durch einen normal entwickelten Wildtyp-Hoden (Abbildung 12, D) zeigten die verschiedenen Entwicklungsstadien der Spermien. In den Hoden der *deadend*-Morphanten waren keinerlei Spermien oder Spermiovorläufer zu sehen (Abbildung 12, E und F). Diese Schlauchgonaden waren somit nicht in der Lage Spermien zu produzieren. Dieses Ergebnis war unabhängig vom genetischen Geschlecht der Morphanten.

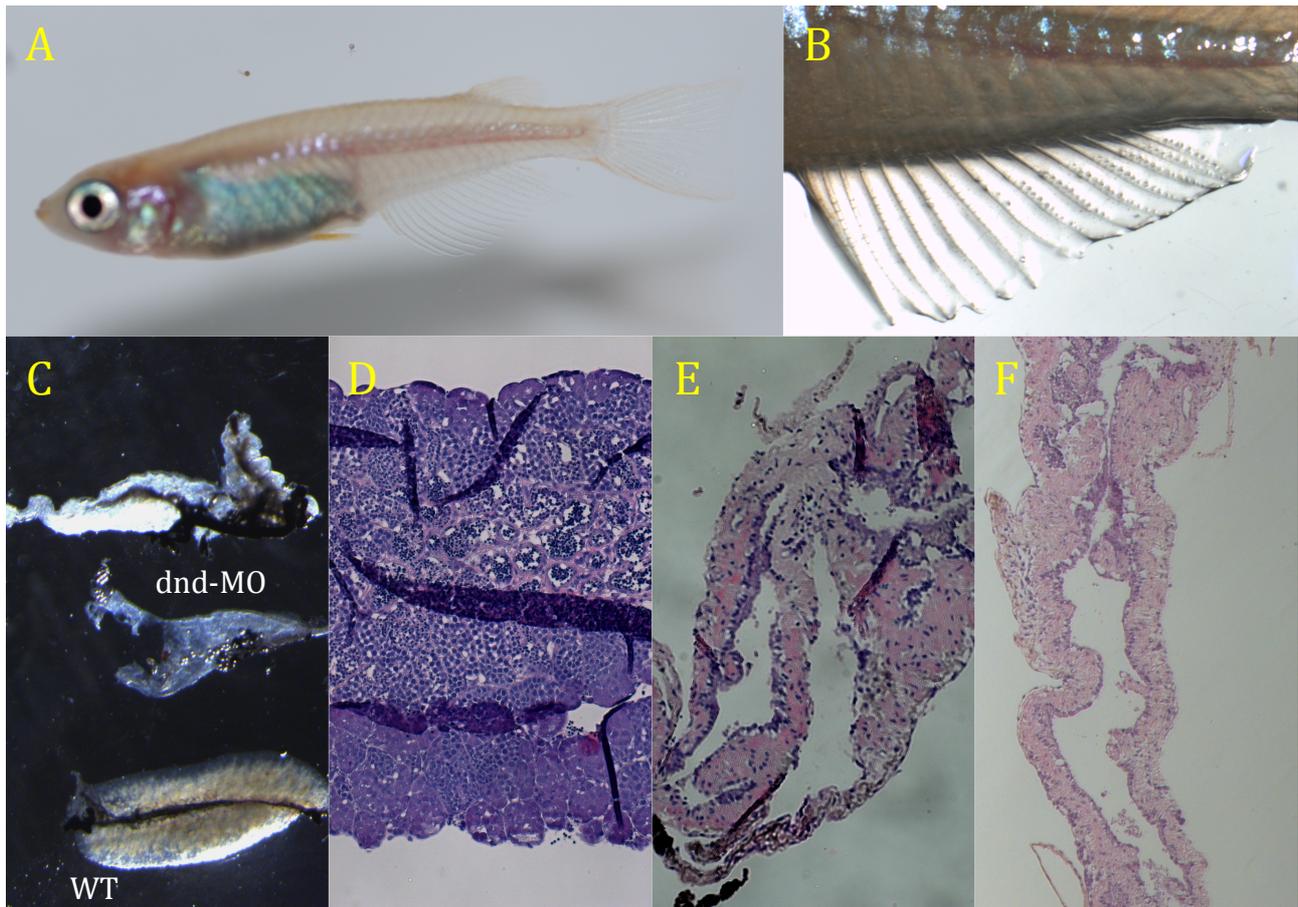


Abbildung 12: Adulte Fische und Schnitte von *deadend* (*dnd*) injizierten Fischen.

A: *dnd*-Morphant: infertiles Männchen; B: Afterflosse *dnd*-Morphant, geschlechtsspezifische Ausprägung; C: Hoden WT=Wildtyp, *dnd*-MO = *dnd*-Morphant; D: Schnitt durch den Hoden eines Wildtyp-Männchens; E,F: Schnitt durch eine Schlauchgonade eines DND-Morpholino injizierten Männchens

Nähere morphologische Untersuchungen an den weiblichen Morphanten waren nicht möglich, da diese verstarben, bevor die Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Bei der Verpaarung mit Wildtyp-Männchen produzierten sie jedoch keine Eier.

#### 4.2. Erniedrigung der Anzahl der primordialen Keimzellen

Um zu untersuchen, ob eine bestimmte Anzahl an primordialen Keimzellen unweigerlich zur Ausbildung eines männlichen Phänotyps, ein Wert über dieser Grenze aber zur Entwicklung eines weiblichen Phänotyps führt, wurden verschiedene Konzentrationen des *deadend*-Morpholinos injiziert. Zur Sichtbarmachung der Keimzellen wurde zusätzlich 3'nanos

UTR:GFP-RNA in das Ein-Zell-Stadium der Embryonen injiziert. Die Anzahl der primordialen Keimzellen wurde durch das GFP-Reporterproteins im UV-Licht kontrolliert und im Laufe der Individualentwicklung der Embryonen verfolgt.

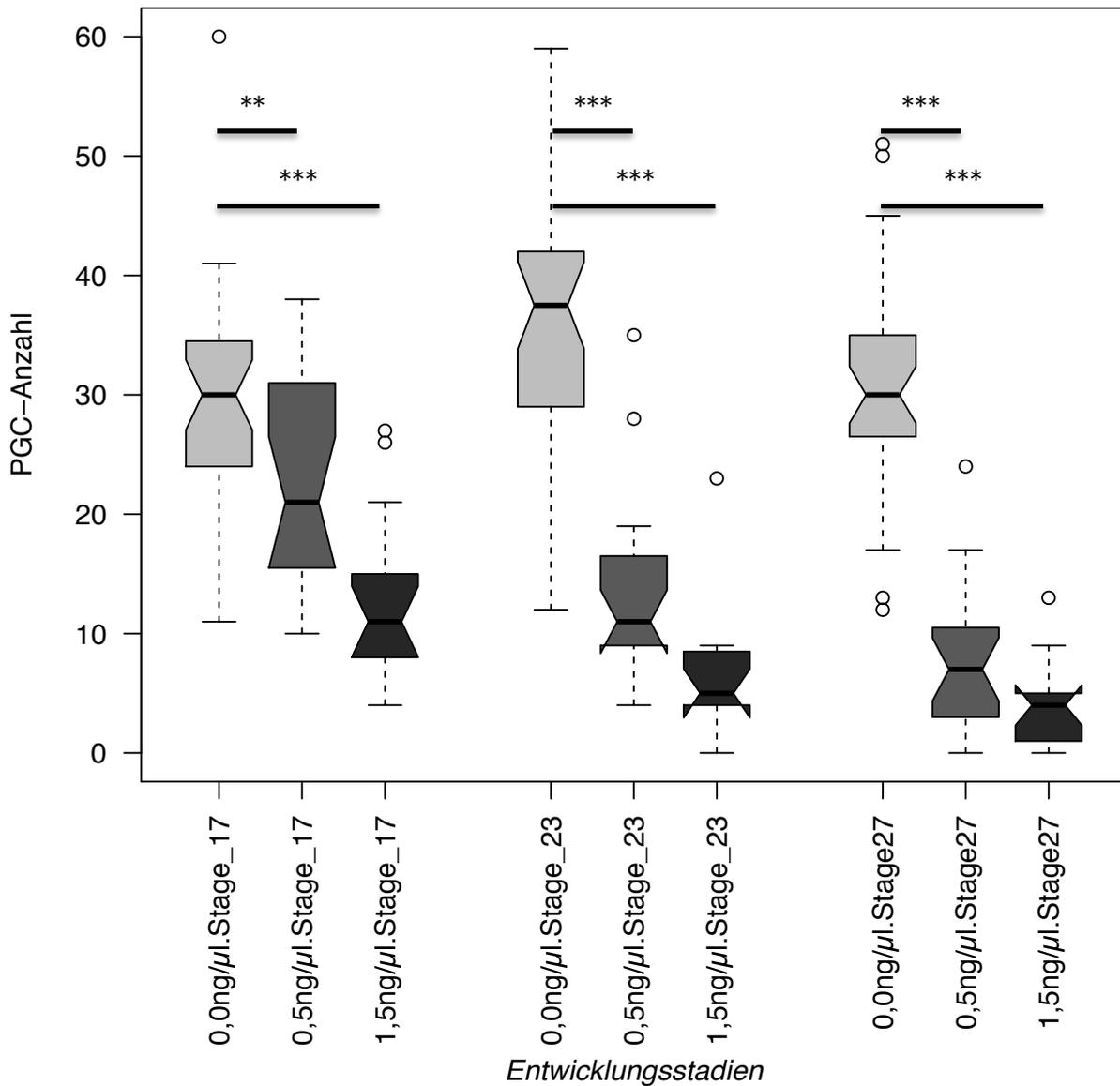


Abbildung 13: Anzahl der Urgeschlechtszellen während der Embryonalentwicklung:

Zu jedem Entwicklungszeitpunkt ist die Anzahl der Urgeschlechtszellen bei den *deadend* - Morpholino injizierten Fischen geringer als bei den Kontrollen. Je höher die Konzentration des Morpholinos, desto geringer ist die Anzahl der PGCs.

Nachdem eine Morpholino-Konzentration von 3,125ng/µl zur kompletten Ablation der Urgeschlechtszellen führte und sich dadurch fast ausschließlich Männchen entwickelten,

wurde versucht, durch die Erniedrigung der Morpholino-Konzentration einen Gradienten in der Anzahl von Urgeschlechtszellen zu erzeugen. Bei einer Konzentration von 1,5ng/μl bzw. 0,5ng/μl konnten während der Embryonalentwicklung Urgeschlechtszellen beobachtet und gezählt werden. Deren Anzahl war aber im Vergleich zu Kontrollfischen, die keine Morpholino-Injektionen erhielten vermindert (Abbildung 13). Der Unterschied bei der Anzahl der Urgeschlechtszellen zwischen den Kontrollfischen (n=32) und den mit 0,5ng/μl (n=20) bzw. den Kontrollfischen (n=32) und den mit 1,5ng/μl (n=12) *deadend*-Morpholino injizierten Embryonen war im Stadium 17 signifikant bzw. hoch signifikant (Mann Whitney-U Test; p-Wert: 0.008145 bzw.  $2,227 \cdot 10^{-6}$ ). Im Stadium 23 war der Unterschied zwischen der Keimzellanzahl der Morpholino-injizierten Fische und der Keimzellanzahl der Kontrollfische hoch signifikant (Mann Whitney-U Test; p-Wert:  $3,855 \cdot 10^{-8}$  für die 0,5ng/μl Morphanten bzw.  $6,102 \cdot 10^{-7}$  für die 1,5ng/μl Morphanten). Auch im Stadium 27 war der Unterschied gegenüber den Kontrollfischen hoch signifikant (Mann Whitney-U Test; p-Wert:  $3,822 \cdot 10^{-9}$  bzw.  $1,056 \cdot 10^{-7}$ ).

Von den Morphanten, die mit 0,5ng/μl Morpholino injiziert waren, erreichten 25 das adulte Stadium. Von diesen Fischen waren 6 XX-Männchen, 16 XY-Männchen und 3 XX-Weibchen (Tabelle 8). Bei der Injektion von 1,5ng/μl erreichten 20 das adulte Stadium. Davon waren 13 XY-Männchen, 5 XX-Männchen und 2 XX-Weibchen. XY-Weibchen wurden in keiner der Gruppen beobachtet. Die Fertilität der Fische, die mit 1,5ng/μl *deadend*-Morpholino injiziert wurden, wurde durch Verpaarung mit Wildtyp-Fischen getestet.

Alle phänotypischen Männchen konnten zwar jeweils mehrere Weibchen zur Eiablage animieren, jedoch waren diese Eier alle unbefruchtet (> 50 Eier je Männchen). Die Männchen wurden somit als infertil eingestuft. Die Sektion der Fische zeigte, dass die Männchen, wie auch die Fische, die mit 3,125ng/μl *deadend*-Morpholino injiziert worden waren, eine schlauchförmige Gonade entwickelt hatten.

Die beiden phänotypischen Weibchen der 1,5ng/μl Morphanten konnten mit Wildtyp-Männchen verpaart jedoch keine Eier legen. Auch die Sektion der Weibchen zeigte eine schlauchförmige Gonade. Weitere histologische Untersuchungen zu den Schlauchgonaden fanden bislang noch nicht statt.

Konzentration des <i>deadend</i> Morpholinos	Anzahl der XY-Männchen	Anzahl der XX-Männchen	Anzahl der XX-Weibchen	Anzahl der XY- Weibchen
0,5 ng/μl	16	6	3	0
1,5 ng/μl	13	5	2	0

Tabelle 8: Verteilung der Genotypen und Phänotypen bei niedrigen *deadend*-Morpholino Konzentrationen: Die Injektion von 0,5ng/μl bzw. 1,5ng/μl *deadend*-Morpholino führte sowohl zur Entwicklung phänotypischer Männchen als auch Weibchen.

### 4.3. Erhöhung der Anzahl der Urgeschlechtszellen

Beim Zebrafisch konnte gezeigt werden, dass durch die Injektion von *bucky ball* RNA die Anzahl der Urgeschlechtszellen erhöht werden kann (Bontems et al., 2009). Dabei wird der Aufbau des Keimplasmas noch besser als bei Wildtypfischen organisiert und es können sich dadurch mehr Urgeschlechtszellen bilden. Der Versuch auch bei Medaka diesen Effekt zu erzielen, gelang nach Injektion der Zebrafisch *bucky ball* RNA. Die Anzahl der Urgeschlechtszellen einzelner Embryonen wurde danach bei verschiedenen Entwicklungsstadien bestimmt. Im Vergleich zu den Kontrollembryonen (Abbildung 14, A-C) hatten Embryonen, denen *bucky ball* RNA injiziert wurde (Abbildung 14, D-F) deutlich mehr primordiale Keimzellen in den Embryonalstadien 15-27.

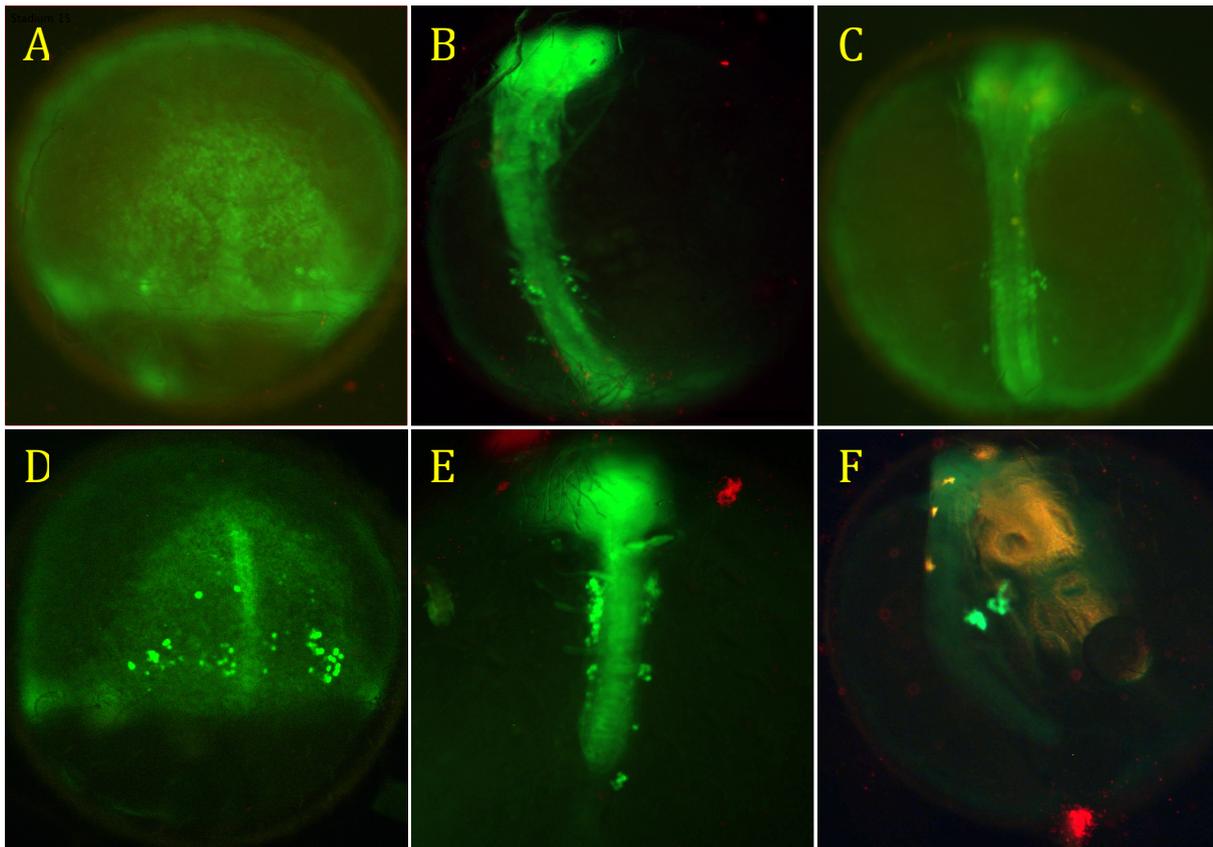


Abbildung 14: Erhöhung der Anzahl der Urgeschlechtszellen nach der Injektion von *bucky ball* RNA:

obere Reihe: Kontrolle; untere Reihe: *bucky ball* RNA injiziert; A und D Stadium 15/16; B und E Stadium 22/23; C und F Stadium 26/27; Während der gesamten Zeitspanne der beobachteten Embryonalentwicklung sind durch die Injektion von *bucky ball* RNA mehr Urgeschlechtszellen zu beobachten.

Die injizierten Embryonen wurden bei 25°C bis zum Schlüpfen gehalten und danach bei 25°C aufgezogen. Vergleicht man den Anteil der XX-Männchen mit und ohne *bucky ball* RNA Injektion (Tabelle 9) zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Chi-Quadrat-Test; 25°C p-Wert: 0,902) bestand.

Temperatur	Zuordnung	XX-Tiere	XX-Männchen	Prozentsatz der XX-Männchen
25°C	<i>bucky ball</i>	97	8	8,25
25°C	Kontrolle	101	10	9,90
34°C	<i>bucky ball</i>	63	32	50,79
34°C	Kontrolle	636	321	50,47

Tabelle 9: Einfluss von *bucky ball* RNA auf den Anteil der männlichen XX-Tiere bei verschiedenen Temperaturen.

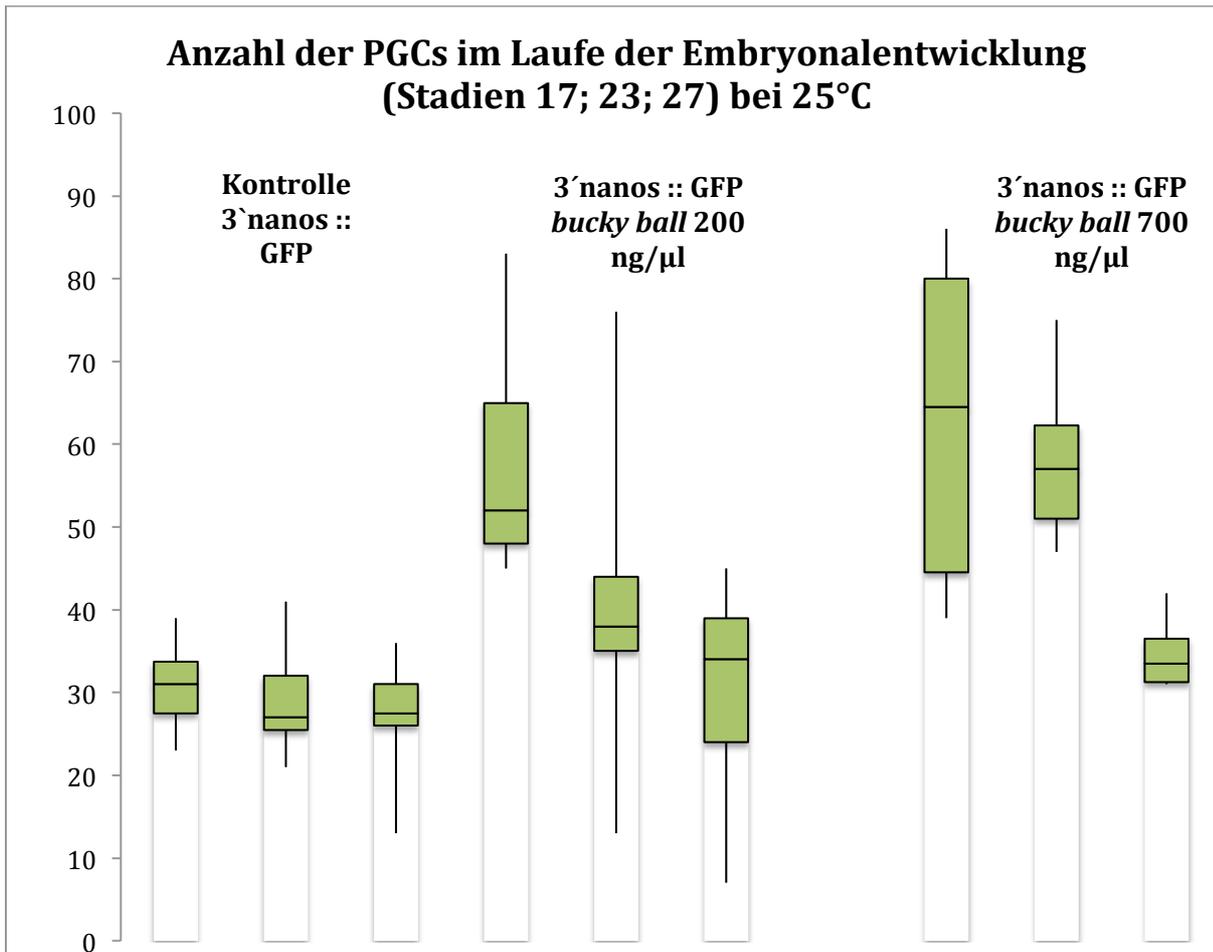
Mit dieser Methode sollte getestet werden, ob durch die Erhöhung der primordialen Keimzellen der maskulinisierende Effekt einer erhöhten Temperatur während der Embryonalentwicklung abgemildert oder sogar vermieden werden konnte. Auch bei den bei 34°C gehaltenen Embryonen bestand im adulten Stadium kein Unterschied hinsichtlich des Prozentsatzes der XX-Männchen (Tabelle 9) (Chi-Quadrat-Test; 34°C p-Wert: 1). Dagegen bestand, wie bei den Wildtyp-Fischen (siehe oben), auch bei den *bucky ball* injizierten Fischen ein signifikanter Unterschied zwischen den bei 25°C inkubierten Embryonen und den bei 34°C inkubierten Embryonen (Chi-Quadrat-Test; p-Wert: 0,009646).

Eine weitergehende Analyse zeigte, dass sich die Differenz der Anzahl der primordialen Keimzellen zwischen injizierten Fischen und Wildtyp-Fischen im Laufe der Embryogenese verringerte (Abbildung 15). Zwar wurde durch die Injektion der *bucky ball* RNA im Stadium 17 die Anzahl der Urgeschlechtszellen zunächst stark erhöht, dennoch verringerte sich der Unterschied im Stadium 23 wieder und entsprach dann im Stadium 27 der durchschnittlichen Anzahl der PGCs bei den Kontrollfischen (Abbildung 15). Durch die Injektion von 700ng/µl *bucky ball* RNA, was knapp über der LD50 (Letale Dosis 50) (Tabelle 10) für die Embryonen lag, wurde versucht eine maximale Erhöhung der PGCs zu erreichen.

Konzentration	Anzahl der injizierten Embryonen	Anzahl der gestorbenen Embryonen	Prozentsatz der gestorbenen Embryonen
<b>700ng/µl</b>	369	199	53,93
<b>800ng/µl</b>	363	241	66,39
<b>900ng/µl</b>	79	59	74,68

**Tabelle 10: Bestimmung der Sterblichkeit in Abhängigkeit verschiedener *bucky ball* RNA Konzentrationen: Die Sterblichkeit der Embryonen wurde innerhalb der ersten beiden Tage nach der Injektion bestimmt.**

Durch die Konzentrationserhöhung der *bucky ball* RNA konnte die Anzahl der PGCs im Stadium 17 von durchschnittlich 31 bei den Kontrollen, beziehungsweise 57 bei 200ng/µl RNA noch weiter bis auf 63 erhöht werden. Dennoch war auch in diesem Fall die Anzahl der primordialen Keimzellen im Stadium 27 wieder bis auf die durchschnittliche Anzahl der Kontrollfische reduziert.



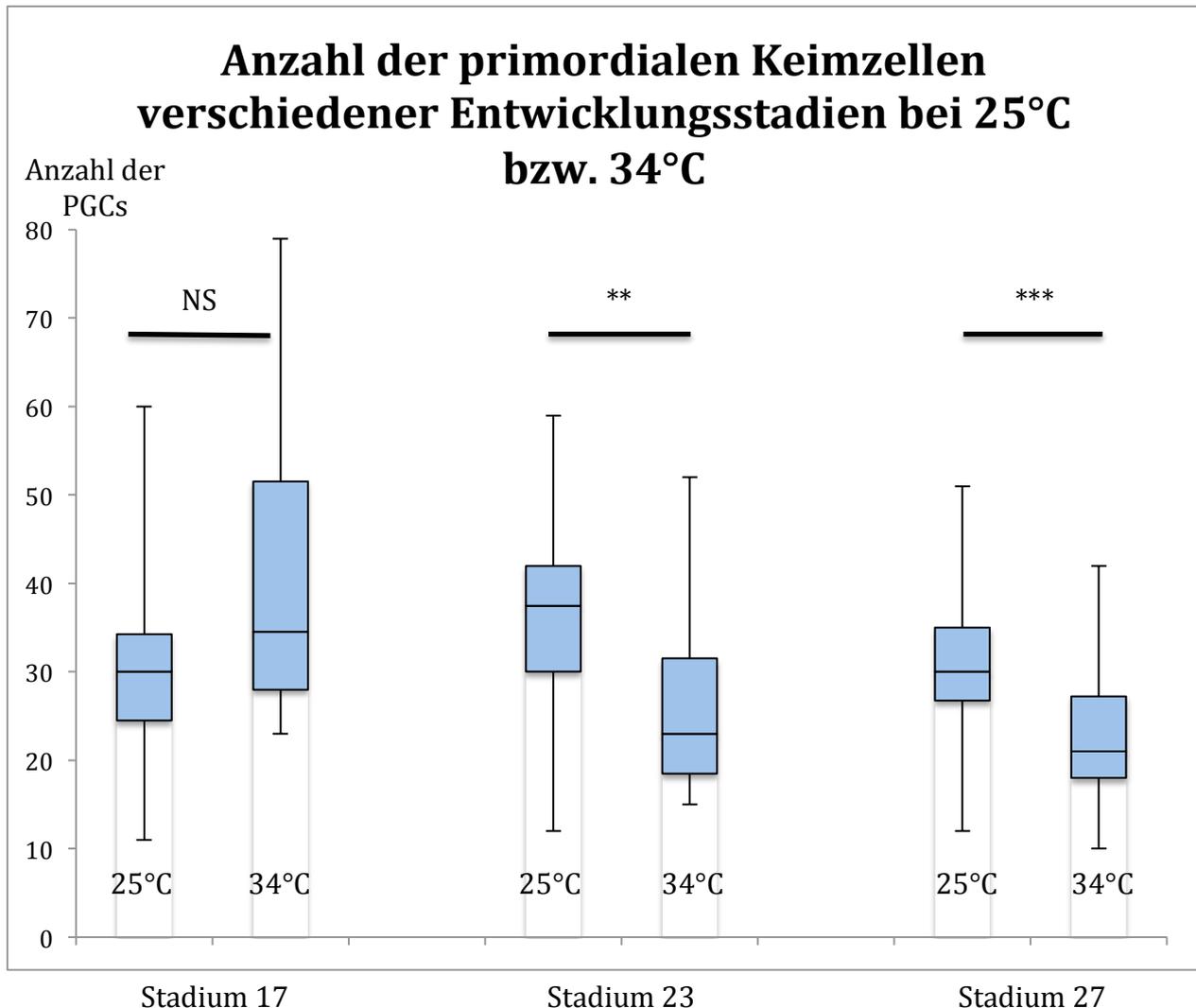
**Abbildung 15: Anzahl der Urgeschlechtszellen während der Embryonalentwicklung in Abhängigkeit von verschiedenen *bucky ball*-Konzentrationen:**

Die Anzahl der primordialen Keimzellen ist durch die *bucky ball* RNA Injektion im Stadium 17 (jeweils der erste Wert) stark erhöht, pendelt sich aber bis zum Stadium 27 (jeweils der letzte Wert) auf dem Level der Kontrollfische ein.

## 5. Einfluss der Temperaturerhöhung auf die Anzahl der Urgeschlechtszellen

In einem Bericht von Shimada und Egami wurde darauf hingewiesen, dass die kurzzeitige Temperaturerhöhung (41°C für 60min) während bestimmter Phasen der embryonalen Entwicklung zur Ausbildung von weniger Urgeschlechtszellen im Vergleich zu den Kontrollembryonen führt (Shimada and Egami, 1984). Zur Überprüfung der These, dass auch eine weniger starke, dafür aber längere Temperaturerhöhung Einfluss auf die Anzahl der Urgeschlechtszellen hat, wurden Embryonen nach der Befruchtung bis zum Schlüpfen bei 34°C inkubiert. Dies könnte der potentielle Auslöser für ein vermehrtes Auftreten von

geschlechtsumgewandelten XX-Tieren bei höheren Temperaturen sein. Die primordialen Keimzellen wurden während der Embryonalentwicklung zu verschiedenen Stadien ermittelt und die Anzahl, sowie die Geschlechtsentwicklung der einzelnen Embryonen verfolgt (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Anzahl der Keimzellen in Abhängigkeit von der Temperatur:**

Im Stadium 17 unterscheidet sich die Anzahl der primordialen Keimzellen kaum (t-Test;  $p > 0,01$ ), im Stadium 23 (t-Test;  $p < 0,01$ ) und 27 (t-Test;  $p < 0,001$ ) ist sie bei den unterschiedlichen Temperaturen jedoch signifikant unterschiedlich.

Im Stadium 17 ist die Anzahl der primordialen Keimzellen bei beiden untersuchten Temperaturen (25°C bzw. 34°C) statistisch nicht unterschiedlich (t-Test; p-Wert: 0,021541045). Erfasst man die Anzahl der Urgeschlechtszellen jedoch zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt zeigen sich deutliche Unterschiede bei beiden Temperaturen. Bei der

erhöhten Temperatur sind deutlich weniger PGCs vorhanden. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant bzw. hoch signifikant (t-Test; Stadium 23 p-Wert: 0,006152707 bzw. Stadium 27 p-Wert: 0,000693473).

**6. Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Embryonalentwicklung und Geschlechtsbestimmung**

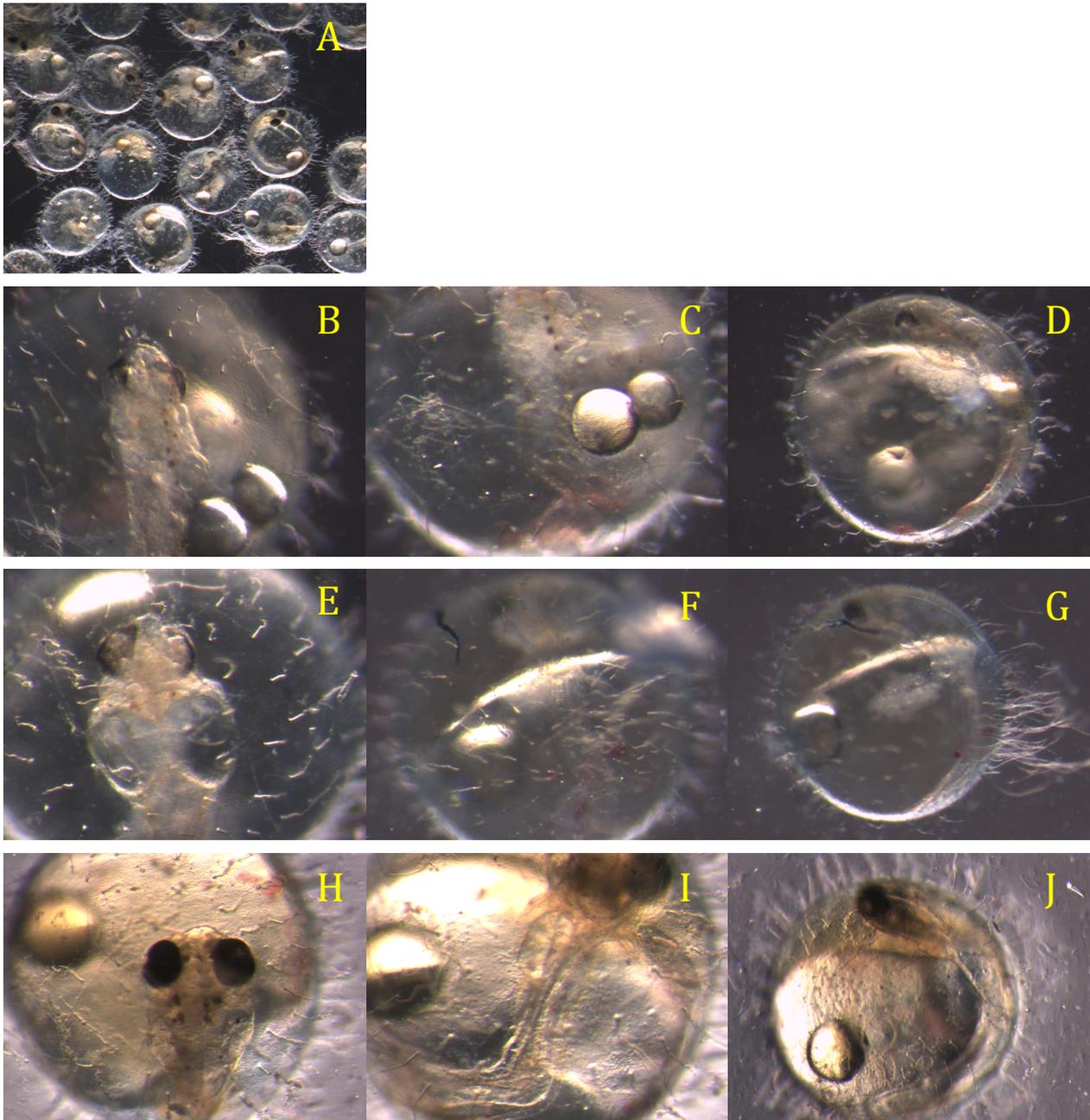
Da eine höhere Temperatur bei der Embryonalentwicklung zu prozentual mehr XX-Männchen führt, sollte untersucht werden, inwieweit eine niedrigere Sauerstoffkonzentration hierfür ausschlaggebend ist. Erhöht man nämlich die Temperatur von 25°C auf 34°C löst sich statt 8,11mg/l nur noch maximal 7,13mg/l Sauerstoff im Wasser. In dem Versuch (Tabelle 11) wurden die Embryonen in einem Brutschrank bei 25°C inkubiert, in dem der Luftsauerstoff von 21% auf 10% bzw. 5% reduziert war. Dadurch wurde die Menge an gelöstem Sauerstoff von 8,11mg/l auf 3,86mg/l bzw. 1,9mg/l gesenkt. Das Medium wurde mindestens einen Tag vor der Zugabe der Embryonen an den Sauerstoffgehalt im Brutschrank angepasst. Embryonen, die nur 10% Luftsauerstoff ausgesetzt waren schlüpften deutlich später (Abbildung 17, A) als in der Kontrolle. Während bei 21% Luftsauerstoff die meisten Embryonen nach 8 Tagen zu schlüpfen begannen, war kein Embryo in der Hypoxie-Gruppe nach 25 Tagen geschlüpft. Die Embryonen schlüpften unter dem reduzierten Luftsauerstoff nicht während der ersten 30 Tage und begannen dann größtenteils abzusterben. Die Embryonen, die nach den 30 Tagen wieder an den normalen Luftsauerstoffgehalt gestellt wurden, begannen nach kurzer Zeit abzusterben oder zu schlüpfen.

Die wenigen überlebenden Embryonen wurden auf ihr genetisches Geschlecht hin untersucht. Sie zeigten jedoch keine Tendenz zu vermehrt geschlechtsumgewandelten XX-Tieren.

Menge des gelösten Sauerstoffs	Abgesammelte Eier	Geschlüpfte Embryonen	Anzahl der XX-Männchen	Anzahl der XX-Weibchen
<b>1,9mg/l</b>	580	4	0	4
<b>3,86mg/l</b>	1627	27	0	27
<b>8,11mg/l</b>	530	511	48	463

**Tabelle 11: Einfluss von verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen auf die Schlupfrate und die Geschlechtsbestimmung von *Oryzias latipes*.**

Nach einigen Tagen der Entwicklung unter Sauerstoffmangel zeigten die Embryonen nicht nur eine verlangsamte Entwicklung, sondern auch Fehlbildungen an verschiedenen Organen. Diese Fehlbildungen konnten in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden. Die Klasse 1 Embryonen zeigte neben einer stark reduzierten Größe verhältnismäßig viel zu kleine Augen. Außerdem bildete sich kein Blutgefäßsystem, sondern nur vereinzelte Blutinseln (Abbildung 17, B bis D). Die Embryonen der Klasse 2 zeigten eine meist relativ normale Größe des Körpers und der Augen, aber eine drastische Vergrößerung der otogenen Vesikel. Wie die Klasse 1 hatten auch die Embryonen der Klasse 2 zwar vereinzelte Blutinseln, aber kein durchgängiges Gefäßsystem (Abbildung 17, E bis G). Die Klasse 3 der Embryonen zeigte keine makroskopisch auffälligen Defekte in der Entwicklung. Die Entwicklung war wie bei den beiden anderen Klassen aber auch sehr zeitverzögert (Abbildung 17, H bis J).



**Abbildung 17: Einfluss von Hypoxie auf die Embryonalentwicklung: Entwicklung nach 25 Tagen bei 10% Sauerstoff und 25°C:**

**A Übersicht: nach 25 Tagen Hypoxie sind noch keine Embryonen geschlüpft.**

**B bis D: Klasse 1: reduzierte Größe, kleine Augen, Inseln mit Blut;**

**E bis G: Klasse 2: vergrößerte otogene Vesikel, Inseln mit Blut, kein durchgängiges Gefäßsystem;**

**H bis J: Klasse 3: Optisch unauffällige Entwicklung, ohne scheinbare Defekte, jedoch auch sehr Zeitverzögert.**

## 7. Knockdown von *fanc-L* und dessen Einfluss auf die Geschlechtsbestimmung

Fanc-L ist ein Mitglied des Fanconi Anämie/BRCA DNA Reparatur Signalwegs. Bei Zebrafischen konnte gezeigt werden, dass eine homozygote Mutation im *fanCL* Gen zur Entwicklung fertiler Männchen führt (Rodríguez-Marí et al., 2010). Deswegen wurde untersucht, ob *fanc-L* auch bei Medakas die Geschlechtsbestimmung beeinflusst. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen eines translationsinhibierenden Morpholinos gegen das *fanc-L* Gen von Medaka injiziert (Tabelle 12). Dabei stellt die Konzentration von 12,5ng/μl die Dosis dar, bei der über 50% der injizierten Embryonen aufgrund der Menge des Morpholinos starben. Die statistische Überprüfung der einzelnen Verhältnisse, mit Hilfe eines  $\chi^2$ -Testes, ergaben, dass die Ergebnisse sich für die Injektionen von 6, 10 oder 12,5ng/μl nicht signifikant gegenüber den Kontrollen unterscheiden (p-Wert:0,8258; 0.1045 bzw. 0.5936). Es lässt sich daraus also folgern, dass *fanc-L* bei der Geschlechtsentwicklung von *Oryzias latipes* keine entscheidende Rolle spielt.

	Konzentration	XX-Männchen	XX-Weibchen	geschlechtsumgewandelte XX-Tiere in %
<b>Kontrolle</b>		58	554	9,48
<b><i>fanc-L</i> Morpholino</b>	6ng/μl	3	18	14,29
<b><i>fanc-L</i> Morpholino</b>	10ng/μl	6	20	23,08
<b><i>fanc-L</i> Morpholino</b>	12,5ng/μl	19	147	11,45

Tabelle 12: Auswertung des genetischen und phänotypischen Geschlechts nach der Injektion von verschiedenen Konzentrationen des Morpholinos gegen *fanc-L*.

## D) Diskussion

### 1. Einfluss der Temperatur auf die Geschlechtsentwicklung

Die Geschlechtsausbildung kann bei Fischen vor der Differenzierung der Gonade durch die Temperatur beeinflusst werden (Baroiller et al., 1999). Bei einigen Arten wurde festgestellt, dass eine erhöhte Temperatur zur Entwicklung von mehr Männchen führt, wie zum Beispiel bei Goldfischen, *Carassius auratus* (Goto-Kazeto et al., 2006), beim Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Baroiller et al., 2009), beziehungsweise *Oreochromis aureus* (Desprez and Mélard, 1998) und beim Medaka, *Oryzias latipes* (Aida, 1936; Shinomiya et al., 2004). Es gibt aber auch Berichte, nach denen eine erhöhte Temperatur zu mehr Männchen und gleichzeitig die Erniedrigung der Temperatur zu mehr Weibchen führt, wie zum Beispiel bei Guppies, *Poecilia reticulata* (Karayucel et al., 2006), dem atlantischen Ährenfisch, *Menidia menidia* (Conover and Kynard, 1981) oder dem Wolfsbarsch, *Dicentrarchus labrax* (Koumoundouros et al., 2002). Außerdem gibt es auch noch Fälle, bei denen sowohl eine hohe, als auch eine niedrige Temperatur zur Entwicklung vieler Männchen führt. Dies ist nachgewiesen für verschiedene Scheinbuttarten, *Paralichthys olivaceus* (Yamamoto, 1999) und *Paralichthys legostigma* (Luckenbach et al., 2003). Auf der anderen Seite sind auch Fälle bekannt, bei denen eine erhöhte Temperatur zur Entwicklung von mehr Weibchen führt. Erhöht man die Temperatur während der geschlechtssensitiven Periode steigt die Zahl der Weibchen zum Beispiel bei dem getüpfelten Gabelwels, *Ictalurus punctuatus* (Patiño et al., 1996) an.

Es gibt auch Arten, bei denen eine niedrige Temperatur zur Entwicklung von mehr Weibchen, die Erhöhung der Temperatur aber zu keiner Abweichung vom theoretischen 1:1-Verhältnis führt, wie zum Beispiel bei *Odontesthes argentinis* (Strüssmann and Cota, 1996). Bei manchen Arten wurde aber auch nachgewiesen, dass die Temperatur keinerlei Einfluss auf das Geschlechterverhältnis hat. Als Beispiel sei hier auf *Odontesthes hatcheri* (Strüssmann and Cota, 1996) hingewiesen.

Wie auch schon Aida (1936) in freier Wildbahn beobachtete, entwickelten sich auch in dem von uns verwendeten Laborstamm bei wärmeren Temperaturen mehr Männchen. Ähnlich wie Goto-Kazeto und Mitarbeiter beim Goldfisch (Goto-Kazeto et al., 2006), konnte ich im

Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass eine niedrige Temperatur während der Embryonalentwicklung beim Medaka keinen Einfluss auf das Geschlechterverhältnis hat, die Erhöhung der Temperatur jedoch das Verhältnis in Richtung der Männchen verschiebt. Dies beruht nicht auf einer erhöhten Sterblichkeitsrate der Weibchen, sondern darauf, dass sich XX-Embryonen zu Männchen entwickeln. Dabei gilt, je höher die Temperatur, desto mehr XX-Tiere werden auch zu Männchen. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Ergebnissen anderer Gruppen für Medaka, die ihre Arbeiten während der Entstehung dieser Arbeit veröffentlicht haben (Hattori et al., 2007; Hayashi et al., 2010; Selim et al., 2009). Dennoch konnte ich bei dem hauptsächlich von mir untersuchten Stamm (*carbio*), keinen Anteil von 100% Männchen erreichen, wie es Hattori et al. (2007) für den HdrR-Stamm bei 34°C Inkubationstemperatur während der Embryonalentwicklung beschrieben haben. Der *carbio*-Stamm hatte bei derselben Temperatur nur ca. 50% geschlechtsumgewandelte XX-Männchen. Jedoch zeigte der HdrR-Stamm in unseren Händen schon bei 25°C über 60% XX-Männchen, so dass eine Temperaturerhöhung während der Embryonalentwicklung durchaus zur Entstehung von ausschließlich Männchen führen kann. Diese 60% liegen aber schon deutlich über den Daten von Hattori et al. (2007).

Hayashi et al. (2010) postulieren, dass diese Geschlechtsumwandlung bei Medaka auf einer erhöhten Cortisolexpression beruht, denn eine Hälterung der Embryonen unter Zugabe von Cortisol, wie auch die Temperaturerhöhung führten zu einem erhöhten Prozentsatz von XX-Männchen. Zugleich hatte die Temperaturerhöhung bei zeitgleicher Exposition zu Metyrapone, einem Repressor der Cortisolexpression keine vermehrte Anzahl von XX-Männchen zur Folge (Hayashi et al., 2010). In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass *dmrt1a* durch die erhöhte Temperatur, verglichen mit den 25°C Kontrollen, früher exprimiert wird. Diese Expression könnte durch das mutmaßliche Heatshock-Element, das der Promotorregion von *dmrt1a* vorgelagert liegt, gesteuert werden. In wieweit *dmrt1a* für die Geschlechtsdifferenzierung der XX-Männchen verantwortlich ist, konnte durch die Versuche in dieser Arbeit noch nicht abschließend geklärt werden. Allerdings wurde in der Arbeit von Hayashi und Mitarbeitern nicht untersucht, ob die Expression von Cortisol oder dessen Repression einen Einfluss auf die Expression von *dmrt1a* hat. Ob die erhöhte Temperatur die Expression von *dmrt1a* über das Heatshock-Element oder über das Cortisol oder aber über beide Wege beeinflusst, ist noch nicht geklärt. Dies könnte getestet werden, indem die Expression von *dmrt1a:GFP* bei zeitgleicher Exposition zu Metyrapone und hohen

Temperaturen untersucht wird. Zudem muss noch getestet werden, ob *dmrt1a* die Aufgaben von *dmrt1bY* in den XX-Männchen übernehmen und somit die Geschlechtsumkehr herbeiführen kann. Dazu könnte man *dmrt1a* Knockout Fische (Masuyama et al., 2012) höheren Temperaturen während der Embryonalentwicklung aussetzen und anschließend untersuchen, ob Geschlechtsumkehr in manchen XX-Fischen auftritt.

## 2. Der genetische Hintergrund beeinflusst das Verhältnis der XX-Männchen

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass der Prozentsatz der geschlechtsumgewandelten XX-Männchen stark vom genetischen Hintergrund abhängt. In manchen Stämmen von *Oryzias latipes* waren unter normalen Hälterungsbedingungen (25°C) kaum XX-Männchen zu finden (Kaga und drR, ca. 2%). In anderen Stämmen konnte man einige wenige (Carbio 10%), ja sogar bis zu über 60% (HdrR) XX-Männchen zu finden (Tabelle 3). Dieses Phänomen wurde auch schon von Nanda und Mitarbeitern beschrieben (Nanda et al., 2003), als sie verschiedene Stämme auf die Existenz von *dmrt1bY* in diesen Stämmen untersuchten. Sie konnten zeigen, dass der Prozentsatz der XX-Männchen unter den gleichen Standardbedingungen (25°C) bei ihnen zwischen 0% (Kaga) und 15% (Carbio) lag. Bei dem HNI Stamm waren gut 7% der XX-Tiere männlich. Vergleicht man die Angaben zu den verschiedenen Stämmen mit denen in der entsprechenden Literatur, zeigt sich auch dort ein deutlicher Unterschied zwischen den Stämmen. Die Arbeitsgruppe um Selim untersuchte zum Beispiel die zwei *Oryzias*-Stämme HdrR und HNI bezüglich des Einflusses der Temperatur auf den Prozentsatz der geschlechtsumgewandelten XX-Männchen. Während die konstante Temperatur von 27°C bei HdrR zu keinen XX-Männchen führte, hatte der HNI-Stamm 9% XX-Männchen. Wurden die Embryonen aber bis zum Schlüpfen bei 32°C inkubiert, waren es 18,6% bzw. 55,2% (Selim et al., 2009). In einer Veröffentlichung von Sato et al. (2005) wurde auch der HNI-Stamm mit dem HdrR-Stamm verglichen. Sie fanden bei 32°C Inkubationstemperatur 24% geschlechtsumgewandelte XX-Männchen beim HdrR-Stamm bzw. 50% beim HNI-Stamm. Wurden die Embryonen bei 27°C bis zum Schlüpfen inkubiert, waren es nur 0% bzw. 11% (Sato et al., 2005).

Verglichen mit diesen Untersuchungen liegen die von mir gefundenen Werte bei 25°C für den HdrR-Stamm (61%) und den HNI-Stamm (47%) doch deutlich höher, als bei den anderen

Studien. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es in den verschiedenen Populationen autosomale Modifier gibt (Nanda et al., 2003), die in den unterschiedlichen Labors unterschiedlich selektioniert wurden und somit unterschiedlichen Einfluss auf die Geschlechtsdifferenzierung der XX-Fische haben.

Durch meine Daten kann die Hypothese, dass die nördlichen Stämme (HNI, Kaga) sensitiver gegenüber dem Effekten einer höheren Temperatur sind nicht gestützt werden, da der nördliche HNI- Stamm, zumindest bei 25°C, weniger XX-Männchen aufweist, als der südliche HdrR-Stamm. Diese Ergebnisse stehen aber im Gegensatz zu den Ergebnissen von Sato (2005) und Selim (2009). Dabei muss angemerkt werden, dass die von mir ermittelten Werte für die Temperatur von 25°C im Vergleich sehr hoch sind. Nanda (2003) fand auch in dem nördlichen HNI-Stamm weniger XX-Männchen, als im südlichen Carbio Stamm.

Sowohl konnte Nanda, als auch ich in meinen Experimenten zeigen, dass der nördliche Kaga-Stamm in unseren Händen keine oder nur wenige XX-Männchen hatten und auch der südliche drR- Stamm wies kaum XX-Männchen auf.

Zusammengefasst lässt sich durch meine Ergebnisse also nicht belegen, dass die nördlichen Stämme sensitiver gegenüber dem maskulinisierendem Effekt höherer Temperaturen sind, da bei nördlichen und südlichen Stämmen sowohl niedrige, als auch hohe prozentuale Anteile an geschlechtsumgewandelten XX-Männchen auftraten. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Selektion in unserem Aquarium stattgefunden hat, wodurch diese Unterschiede in dem Auftreten der XX-Männchen zustande kommen. Es wäre also möglich, dass bei den Würzburger Stämmen das Merkmal der Temperatursensitivität verloren gegangen ist. Zudem wurde noch nicht getestet, inwieweit sich eine Temperaturerhöhung auf die Geschlechterverteilung auswirkt.

Laut Ospina-Alvarez & Piferrer (2008) ist die temperaturabhängige Geschlechtsbestimmung bei den meisten Fischen, so auch beim Medaka, ein Laborphänomen, da die Temperaturen, die experimentell verwendet werden, im natürlichen Habitat nicht erreicht werden (Ospina-Alvarez and Piferrer, 2008). Die Daten dieser Untersuchung legen aber nahe, dass auch bei normalen Hälterungsbedingungen von 25°C das Geschlecht eines gewissen Anteils an Fischen durch den temperaturgesteuerten Geschlechtsbestimmungsmechanismus bestimmt wird. Dazu ist zu bemerken, dass die durchschnittlichen Tagestemperaturen im Sommer im Süden Japans über 30°C liegen und so zum Beispiel in den flachen Reisfeldern die

Wassertemperaturen durchaus 30°C erreichen können (Iten 2008; persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Akihiro Shima). Ob ein solcher Anstieg aber eine vermehrte Anzahl an Männchen begünstigt, kann durch die Experimente in dieser Arbeit nicht geklärt werden, da die Tiere im Labor während der ganzen Embryonalentwicklung einer gleichbleibenden Temperatur ausgesetzt waren. Außerdem ist nicht bekannt, ob die Weibchen ihre Eier im Gewässer in verschiedenen Regionen abstreifen, die durch Übershattung, Fließgeschwindigkeit, und andere Faktoren unterschiedliche Temperaturzonen aufweisen und sie somit aktiv die Geschlechterverteilung ihrer Nachkommenschaft beeinflussen.

Bei Medaka kann mittels PCR leicht das genetische Geschlecht bestimmt und somit auch bei Wildpopulationen untersucht werden, ob das Phänomen der Geschlechtsumkehr in der Natur vorkommt. Shinomiya und Mitarbeiter (2004) untersuchten bei 2274 wild gefangenen Medakas das Vorhandensein von *dmrt1bY* und verglichen dies mit dem phänotypischen Geschlecht. Bei der Mehrzahl der Fische stimmte das genetische Geschlecht mit dem phänotypischen Geschlecht überein. Nur 11 der 1185 XX-Fische waren Männchen und 12 der 1089 XY-Fische waren Weibchen. Unter anderem wurde durch Nachkommenschaftstests nachgewiesen, dass alle XY-Weibchen Mutationen trugen, die im Zusammenhang mit dem Hauptgen für die Geschlechtsbestimmung stehen (Otake et al., 2006; Shinomiya et al., 2004). Alle geschlechtsumgewandelten XY-Weibchen hatten entweder Mutationen im offenen Leseraster von *dmrt1bY* oder Mutationen, die zur reduzierten Expression von *dmrt1bY* führten (Otake et al., 2006). Für die XX-Männchen aus den Wildfängen vermuten Shinomiya und Kollegen das Vorhandensein von einem starken autosomalen Locus und weiteren autosomalen oder X-chromosomalen Modifiern, die dafür verantwortlich sind, dass sich die XX-Tiere zu Männchen entwickelten. Dieser starke Modifier *sda1* (sex-determining autosomal factor1 = geschlechtsbestimmender autosomaler Faktor 1) ist demnach der Faktor, der in Abwesenheit von *dmrt1bY* die männliche Geschlechtsbestimmungskaskade in Gang setzt (Shinomiya et al., 2010). Er befindet sich auf der Linkage Group 8. Aber auch andere Modifier beeinflussen die Geschlechtsausprägung und könnten somit unterschiedlich in verschiedenen Stämmen und Populationen verteilt sein (Nanda et al., 2003; Shinomiya et al., 2010). Aus den Daten der Veröffentlichung kann nicht geschlossen werden, dass die Rate der XX-Männchen der Wildfänge nicht von der Temperatur beeinflusst wird, da es keine Angaben gibt, wann die Fische gesammelt wurden oder wie die klimatischen Verhältnisse in der Zeit der Embryonalentwicklung der gesammelten Fische waren. Zum Teil finden sich in der Liste von

Shinomiya (2004) auch Fundorte mit Mehrfachnennung. Dabei konnten einmal keine XX-Männchen gefunden werden, das zweite Mal wurde zumindest je eines gefangen (Vergleiche Shinomiya, 2004 Tabelle 1 (Niigata und Mito)). Wenn der zweite Zeitpunkt jeweils nach einem heißen Sommer war, könnte durchaus die wärmere Temperatur dazu geführt haben, dass in der Population XX-Männchen waren, während zum ersten Zeitpunkt bedingt durch die kälteren Temperaturen keine XX-Männchen auftraten.

### 3. Die Expression von *dmrt1a* unter dem Einfluss höherer Temperaturen

Durch eine Erhöhung der Temperatur während der Embryonalentwicklung beim Medaka konnte die Expression von *dmrt1a* nicht erst nach circa 20 Tagen nach dem Schlüpfen nachgewiesen werden (Hornung et al., 2007), sondern schon zum Zeitpunkt des Schlüpfens. Die Expression des *dmrt1a:GFP* Reporterkonstrukts in den Nierenvorläuferzellen und das Verblässen der Expression ab circa 7 Tagen nachdem die geschlüpften Embryonen von 34°C auf 25°C gestellt wurden weist darauf hin, dass die Expression durch ein Heatshock-Element gesteuert wird. In der Sequenz der Promotorregion lassen sich mehrere solcher putativen Motive finden, die als funktionale Heatshock-Elemente identifiziert wurden (Akerfelt et al., 2010; Amin et al., 1988; Sorger, 1991). Die Funktion der einzelnen Elemente müsste aber noch durch entsprechende Luciferase-Konstrukte oder beta-Galactosidase-Konstrukte überprüft werden, deren Aktivität bei 25°C bzw. 34°C gemessen werden müsste. Das vielversprechendste scheint das Element an der Stelle -7601 (GTTCTAGAAGGTTCT) vor dem Transkriptionsstart zu sein, da hier drei Elemente (nGAAn bzw. nTTCn) hintereinander zu finden sind. Bei den anderen drei Stellen (-2016, -569 und -475) stehen nur zwei alternierende Elemente hintereinander (Sequenz im Anhang).

Die erhöhte Temperatur und die dadurch frühere Expression von *dmrt1a* (während der Gonadenentwicklung) beim Medaka könnte ähnlich wie bei dem neuweltlichen Ährenfisch *Odontesthes bonariensis* die Ausbildung des männlichen Phänotyps bestimmen. Bei *Odontesthes bonariensis* konnte gezeigt werden, dass durch die vermehrte Expression von *dmrt1* während der Geschlechtsentwicklung der Gonaden, die Entwicklung der Männchen bestimmt wird (Fernandino et al., 2008).

Bei Schildkröten wird *DMRT1* vermehrt bei Temperaturen exprimiert, die die Entwicklung von Männchen begünstigen, während bei Temperaturen, die die Entwicklung von Weibchen fördern, *DMRT1* kaum exprimiert wird (Kettlewell et al., 2000). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass nur in den späteren Männchen *DMRT1* erhöht ist, während die Weibchen keine erhöhten *DMRT1*-Expressionswerte haben (Murdock and Wibbels, 2003). Auch bei Vögeln ist *DMRT1* entscheidend für die Entwicklung der Männchen. Ein Knockdown während der Embryonalentwicklung führt zur Feminisierung der eigentlich männlichen embryonalen Gonade (ZZ) und zur Reduktion der Expression männlicher Markergene (Chue and Smith, 2011; Smith et al., 2009). Beim Medaka konnte bislang nur gezeigt werden, dass ein Knockdown von *dmrt1a* bei der Aufrechterhaltung des männlichen Geschlechts eine entscheidende Rolle spielt (Masuyama et al., 2012). Jedoch weisen die frühe Expression in den 34°C inkubierten Medakaembryonen, sowie die Rolle von *dmrt1* bei der männlichen Geschlechtsentwicklung von Fischen, Mäusen, Schildkröten und Vögeln darauf hin, dass *dmrt1a* bei den Geschlechtsumgewandelten XX-Männchen die Rolle von *dmrt1bY* übernehmen konnte.

Bei der Maus verändert sich die Expression von *DMRT1* während der Embryonalentwicklung. In der undifferenzierten Gonade (10,5-11,5 dpc) wird *DMRT1* in den somatischen Zellen, aber auch in den primordialen Keimzellen beider Geschlechter exprimiert. Im Stadium 12,5 dpc wird *DMRT1* in den männlichen somatischen Zellen (Sertolizellen), und schwächer in den Keimzellen exprimiert. In der weiblichen Gonade ist die Expression schwächer, jedoch in den Keimzellen stärker, als in den somatischen Zellen. Ab Stadium 13,5 dpc wird *DMRT1* in den weiblichen somatischen Zellen überhaupt nicht mehr exprimiert, jedoch in den männlichen. In den Keimzellen beider Geschlechter ist die Expression erhöht, ist aber ab Stadium 15,5 nicht mehr zu sehen (De Grandi et al., 2000; Lei et al., 2007). Vergleicht man diese Expression mit der Expression von *dmrt1* beim Medaka kann man auch hier sehen, dass *dmrt1a* normalerweise erst 20 bis 30 Tage nach dem Schlüpfen in den Sertolizellen exprimiert wird, *dmrt1bY* jedoch schon in der sich entwickelnden Gonade (Hornung et al., 2007; Kobayashi et al., 2004; Nanda et al., 2002; Winkler et al., 2004). Bei den Versuchen mit 34°C war die Expression des *dmrt1a:GFP* Konstrukts jedoch schon in den Sertolizellen vor dem Schlüpfen sichtbar. Somit wird *dmrt1* bei den 34°C Embryonen zu dem Zeitpunkt in der undifferenzierten Gonade exprimiert, wenn sie sich zum Hoden oder Ovar entwickelt.

#### 4. Einfluss von *sdf1a/b* auf die Wanderung der Urgeschlechtszellen

Studien bei verschiedenen Vertebraten, wie dem Zebrafisch, dem Huhn und der Maus zeigten, dass die Wanderung der Urgeschlechtszellen von dem Chemokinrezeptor CXCR4 und seinem Liganden SDF1a abhängt (Ara et al., 2003; Doitsidou et al., 2002; Knaut et al., 2003; Molyneaux and Wylie, 2004; Molyneaux et al., 2003; Stebler et al., 2004).

Für Medaka ist bekannt, dass sich die Wanderung der Urgeschlechtszellen in unterschiedliche Phasen aufteilt (Kurokawa et al., 2006; Shinomiya et al., 2000; Tanaka et al., 2001). Beim Zebrafisch sind schon in den Stadien der ersten Zellteilungen durch Whole-mount In-situ-Hybridisierung und Transmissionselektronenmikroskopie Anreicherungen von *vasa* (als Keimzellmarker) und das Keimplasma nachweisbar, während beim Medaka die Separation der primordialen Keimzellen beim Medaka in den frühen Gastrula-Stadien beobachtet werden kann (Herpin et al., 2007a; Shinomiya et al., 2000; Weidinger et al., 1999; Yoon et al., 1997). Die Keimzellen wandern dann in der ersten Phase von ihrer verteilten Position zu der Marginalzone. In Zusammenarbeit mit Dr. Herpin konnte ich zeigen, dass diese erste Phase stark von *sdf1a* abhängig ist (vergleiche Abbildung 4 und 18). In der zweiten Phase, während der Neurulation und den frühen Phasen der Somitogenese, wandern die Urgeschlechtszellen entlang der Körperachse. Diese Phase ist relativ unabhängig von *sdf1a* und *sdf1b*. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Untersuchungen von Kurokawa et al. (2006), die den Einfluss von *sdf1b* auf die Wanderung der PGCs untersuchten. In dieser Phase wandern die Urgeschlechtszellen wahrscheinlich passiv mit den anderen Zellen, obwohl ein aktiver Mechanismus nicht ausgeschlossen werden kann. In der dritten Phase, um das 22-Somiten Stadium herum, gruppieren sich die Urgeschlechtszellen dann entlang des vorderen Bereichs des Seitenplattenmesoderms, in dem *sdf1b* exprimiert wird. Wie auch Kurokawa (2006) konnten wir zeigen, dass diese Phase stark von *sdf1b* abhängig ist.

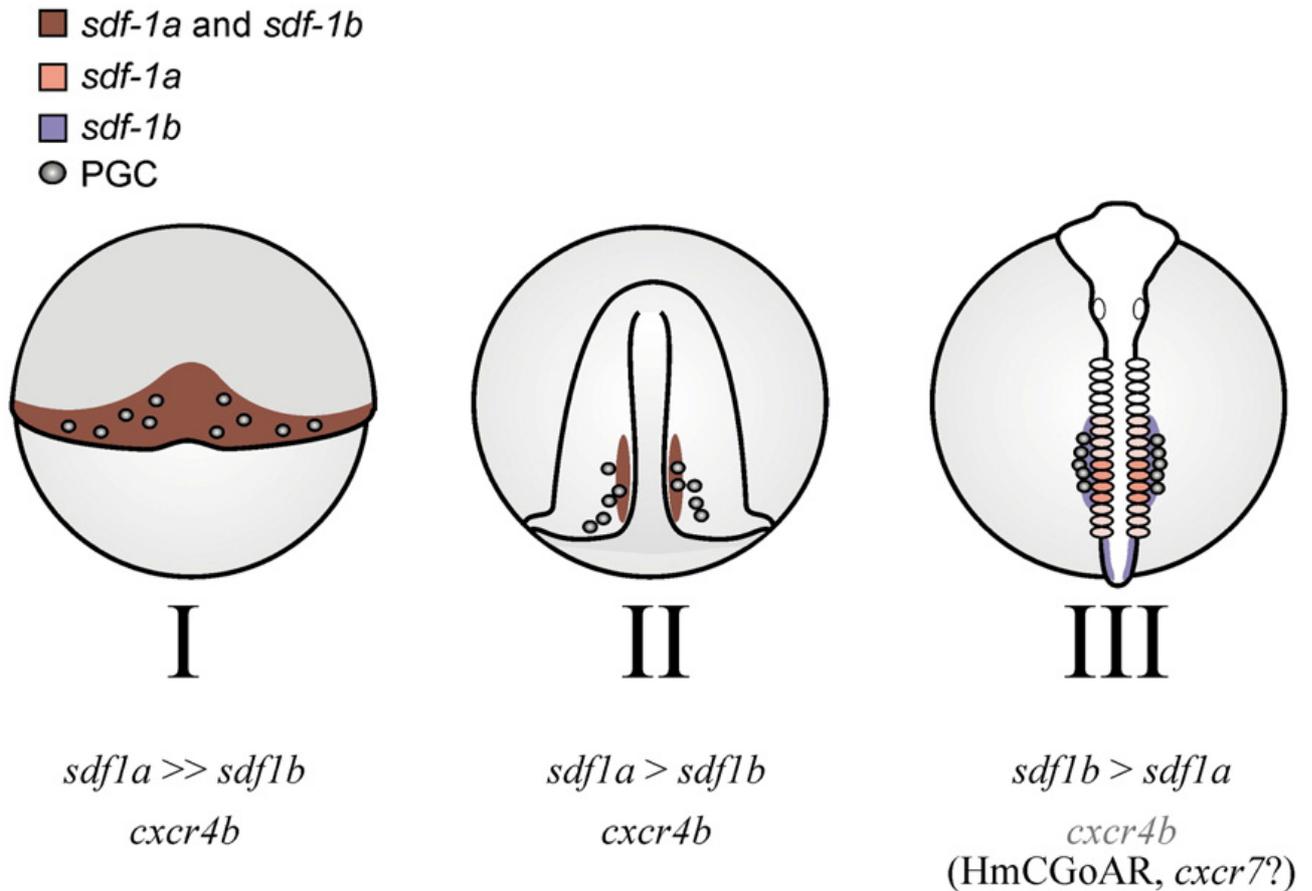


Abbildung 18 (aus Herpin et al., 2008): Schematische Darstellung der Wanderung der PGCs in Abhängigkeit von der Expression von *sdf1a* und *sdf1b*

## 5. Ablation der Urgeschlechtszellen führt zur Entwicklung von Männchen

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass durch die Injektion von Morpholinos gegen *deadend* die Anzahl der Urgeschlechtszellen vermindert bzw. sie komplett abgetötet werden können. Die Ablation aller primordialen Keimzellen führt beim Medaka hauptsächlich zur Entwicklung von Männchen, die keine normale Gonade, sondern eine Schlauchgonade entwickeln. Dies konnte auch von Kurokawa und Mitarbeitern gezeigt werden, die Morpholinos gegen den Rezeptor *cxcr4* injizierten und dadurch die Urgeschlechtszellen abtöteten (Kurokawa et al., 2007). *Cxcr4* hat beim Medaka eine große Bedeutung bei der Wanderung der Urgeschlechtszellen (Herpin et al., 2008; Kurokawa et al., 2006). Für *deadend* konnte beim Zebrafisch und beim Krallenfrosch gezeigt werden, dass es eine Komponente des Keimplasmas ist und dort für die Wanderung und das Überleben der primordialen Keimzellen von essentieller Bedeutung ist (Horvay et al., 2006; Weidinger et al., 2003). Beim Medaka

konnte mittlerweile auch gezeigt werden, dass *deadend* mRNA im Embryo maternal eingelagert wird und später zygotisch in den primordialen Keimzellen exprimiert wird (Liu et al., 2009). Durch die Injektion von Morpholinos gegen *deadend* konnte ich zeigen, dass es ein wichtiger Faktor für die Bildung der PGCs ist, da nach Ausschalten von *deadend* während der Embryonalentwicklung keine PGCs beobachtet werden konnten. Dieses Phänomen konnte auch für Zebrafische gezeigt werden (Slanchev et al., 2005). Die Individuen ohne PGCs entwickelten sich beim Zebrafisch alle zu phänotypischen Männchen (Slanchev et al., 2005), während sich beim Goldfisch (*Carassius auratus*) und beim Ostasiatischen Schlammpeitzger (*Misgurnus anguillicaudatus*) und zum Teil auch in meinen Versuchen beim Medaka Individuen ohne Urgeschlechtszellen in beide Geschlechter entwickeln können (Fujimoto et al., 2010; Goto et al., 2012). Eine Ursache für diese Diskrepanz könnte die unterschiedliche Geschlechtsentwicklung der Zebrafische sein, die unabhängig vom späteren Geschlecht zunächst ein juveniles Ovar entwickeln. Dieses reift bei den Weibchen weiter zum adulten Ovar, wohingegen es bei den Männchen zu einem Hoden umgebaut wird (Maack and Segner, 2003; Takahashi, 1977). Die fehlenden Keimzellen bewirken das Fehlen der Oozyten in dem juvenilen Ovar, wodurch sich der juvenile Fisch zu einem Männchen entwickelt. Eine weitere Möglichkeit für diese Diskrepanz könnten zwei unterschiedliche Geschlechtsbestimmungsmechanismen bei Zebrafisch und Medaka auf der einen Seite und Goldfisch und Schlammpeitzger auf der anderen Seite sein. Während im ersteren Fall eine keimzellabhängige Geschlechtsdifferenzierung stattfindet, wird die Differenzierung im zweiten Fall durch die somatischen Zellen bestimmt (Fujimoto et al., 2010; Goto et al., 2012; Siegfried and Nüsslein-Volhard, 2008).

Beim Medaka gibt es Berichte, nach denen sich Individuen ohne PGCs ausschließlich zu Männchen entwickeln (Kurokawa et al., 2007). Meine Studien weisen jedoch darauf hin, dass sich eventuell doch Weibchen ohne PGCs entwickeln können, da ich trotz der Injektionen von *deadend*-Morpholinos auch ein paar wenige Weibchen erhielt. Deutlich mehr keimzellose Individuen entwickelten sich zwar zu Männchen die genetisch entweder männlich (XY) oder weiblich (XX) sein konnten, dennoch traten Weibchen auf. Die Weibchen waren aber unfähig Eier zu produzieren. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten der Weibchen könnte eine fehlerhafte Injektion sein, wodurch einige wenige PGCs übrig geblieben sein könnten und so die weibliche Geschlechtsausbildung bewirkt haben. Dass die Weibchen nicht fertil waren,

könnte einer zu geringen Keimzellzahl geschuldet sein, unter der Annahme, dass zur Ausbildung einer fertilen Gonade eine Mindestanzahl der Keimzellen nötig ist.

## 6. Erhöhung der Urgeschlechtszellen-Anzahl

In dieser Arbeit sollte weiterhin untersucht werden, ob sich das Geschlecht bei Medaka durch die Erhöhung der Urgeschlechtszellen beeinflussen lässt. Es ist bekannt, dass bei Medaka der erste sichtbare Unterschied zwischen späteren Männchen und Weibchen die Proliferation der Urgeschlechtszellen im Embryonalstadium 38 in den Weibchen ist. Bei den Männchen dagegen sind die Urgeschlechtszellen mitotisch inaktiv und deswegen bleibt die Anzahl nach der Einnistung in der späteren Gonadenregion nahezu konstant. Dort proliferieren sie erst 20 bis 30 Tage nach dem Schlüpfen (Herpin et al., 2007b; Kobayashi et al., 2004; Satoh and Egami, 1972; Suzuki et al., 2005). Durch die Injektion von *bucky ball RNA* sollte die Anzahl der Urgeschlechtszellen gesteigert werden. Es wurde gezeigt, dass *bucky ball RNA*, die beim Zebrafisch maternal abgelegt wird, dafür verantwortlich ist, dass das Keimplasma im Embryo organisiert wird. Durch die Injektion von zusätzlicher *bucky ball RNA* konnte die Bildung von einer ca. 50% größeren Anzahl an Urgeschlechtszellen initiiert werden (Bontems et al., 2009). Durch die Injektionen von *bucky ball RNA* in das Ein-Zell-Stadium der Medakaembryonen konnte die Anzahl der Urgeschlechtszellen in Abhängigkeit von der Konzentration mehr als verdoppelt werden. Jedoch nahm die Erhöhung der PGCs im Laufe der Entwicklung wieder ab, bis auf das Level der Kontrollembryonen. Bontems und Kollegen untersuchten die Erhöhung der Anzahl der Urgeschlechtszellen nur bis zum 13 Somiten bzw. 18 Somiten-Stadium. Das heißt, dass auch beim Zebrafisch nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Anzahl der Urgeschlechtszellen nach der anfänglichen Erhöhung wieder auf das Level der Kontrollembryonen sinkt. Dieser Trend kann aus den Ergebnissen von Bontems und Kollegen nicht eindeutig belegt, jedoch plausibel vermutet werden, da die Urgeschlechtszellen im oblong-Stadium (in der Blastula) um über 50% erhöht waren, während sie im späteren 13 Somiten-Stadium nur noch um 44% erhöht waren.

Es ist also anzunehmen, dass bei den von mir injizierten Embryonen zum Zeitpunkt des Schlüpfens nicht signifikant mehr Urgeschlechtszellen in den geschlüpften Fischen vorhanden

waren, als in den nicht injizierten Fischen. Aus diesem Ergebnis lässt sich ein Mechanismus ableiten, der die maximale Anzahl der Urgeschlechtszellen auf ein bestimmtes Level begrenzt. Welcher Mechanismus die Reduktion der Urgeschlechtszellen nach der *bucky ball* Injektion bewirkt, kann bislang nur gemutmaßt werden. Einerseits könnte es an der Interaktion zwischen den somatischen Zellen der Gonade und den Urgeschlechtszellen liegen. Weil nur die Urgeschlechtszellen erhöht wurden, aber nicht die somatischen Zellen, die zur Unterstützung notwendig sind, starben die überzähligen Urgeschlechtszellen ab. Zum anderen könnte auch eine Regulationsschleife zwischen den Urgeschlechtszellen und den somatischen Zellen stattfinden, wodurch die Anzahl der PGCs von den somatischen Zellen oder deren Anzahl geregelt wird. Bei *Drosophila* wurde gezeigt, dass ein solcher Mechanismus die Proliferation und damit die Anzahl der Urgeschlechtszellen bestimmt. Sind zu wenige PGCs vorhanden, teilen sie sich schneller bis sie das Level der Wildtyp-Fliegen erreicht haben. Danach proliferieren sie langsamer (Gilboa and Lehmann, 2006). Allerdings wurde noch kein Mechanismus gefunden, bei dem mehr Keimzellen mehr Soma produzieren können. Demnach ist es wahrscheinlich, dass nicht genügend somatische Zellen vorhanden sind, um die erhöhte Anzahl der primordialen Keimzellen zu unterstützen.

## 7. Einfluss von hohen Temperaturen auf die Anzahl der Urgeschlechtszellen

Die Urgeschlechtszellen beim Medaka teilen sich einmal bis dreimal Mal auf ihrem Weg vom Ort ihrer Entstehung bis zum Ort der zukünftigen Gonadenanlage (Hamaguchi, 1982; Satoh and Egami, 1972). In meinen Versuchen, bei denen ich Embryonen vom Ein-Zell-Stadium bis zum Schlüpfen bei erhöhten Temperaturen gehalten habe, konnte ich feststellen, dass sich die Anzahl der Urgeschlechtszellen bei warmen Temperaturen nicht erhöhte bzw. sich sogar erniedrigte. Verglichen mit den Kontrollen war die PGC-Anzahl der 34°C Embryonen im Entwicklungsstadium 27 deutlich geringer, obwohl sie im Stadium 17 noch leicht darüber lag. Im Laufe dieser Arbeit wurden weitere Ergebnisse zu der PGC-Anzahl veröffentlicht. In einer Veröffentlichung wurde der Einfluss von hoher Temperatur auf die Anzahl der Urgeschlechtszellen nach dem Schlüpfen geprüft (Selim et al., 2009). Im HdrR-Stamm zeigten die frisch geschlüpften Embryonen, die kontinuierlich höherer Temperatur (32°C) ausgesetzt waren, eine geringfügig reduzierte Anzahl an Urgeschlechtszellen im Vergleich zu den Kontrollen (27°C). Dies war unabhängig von dem genetischen Geschlecht der Fall. Dieser

Effekt war beim HNI-Stamm deutlicher ausgeprägt, was an der höheren Gesamtzahl der Urgeschlechtszellen in der Kontrollgruppe liegen kann. Denselben Effekt fanden die Forscher auch 5 und 10 Tage nach dem Schlüpfen. Dabei waren jedoch eher die XX-Tiere betroffen, während die Anzahl bei den XY-Tieren ähnlich war (Selim et al., 2009). Die Erhöhung der Temperatur während der Embryonalentwicklung hat also zur Folge, dass weniger Urgeschlechtszellen überleben, oder die vorhandenen langsamer proliferieren.

In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass Embryonen, die im Stadium 28 einem Hitzeschock von 41°C für 60 Minuten ausgesetzt waren, zum Zeitpunkt des Schlüpfens deutlich weniger PGCs hatten (Shimada and Egami, 1984). Zusammengefasst ist es also wahrscheinlich, dass die Embryonen der Gruppe, die einer erhöhten Temperatur ausgesetzt waren, auch in den Embryonalstadien eine geringere Anzahl Urgeschlechtszellen hatten. Diese Reduktion der Urgeschlechtszellen könnte zum einen auf einem thermischen Effekt beruhen, der die Urgeschlechtszellen absterben lässt. Zum anderen könnte auch die von mir gefundene frühere Expression von *dmrt1a*, ähnlich zu *dmrt1bY* (Herpin et al., 2007b), in den Embryonen die Proliferation der Urgeschlechtszellen verhindern.

## 8. Der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Geschlechtsbestimmung

In meinen Versuchen konnte ich keinen Zusammenhang zwischen dem gelösten Sauerstoff und der Geschlechtsbestimmung feststellen, da die Embryonalentwicklung verzögert ablief und die meisten Embryonen schwere Defekte in der Entwicklung hatten und kaum schlüpften. Von den wenigen geschlüpften Tieren aus beiden Sauerstoffkonzentrationen erreichten nur 31 das Stadium der Geschlechtsreife, die sich alle gemäß ihres genetischen Geschlechts zu XX-Weibchen entwickelten. Diese Ergebnisse stimmen mit Versuchen zum Einfluss von Hypoxie bei der Entwicklung von Zebrafischen und Karpfen überein. Es konnte gezeigt werden, dass reduzierter Sauerstoff die Embryonalentwicklung der Zebrafische verlangsamt und zeitgleich über 75% der Embryonen teilweise sehr schwere Missbildungen hatten (Shang and Wu, 2004). Bei Karpfen (*Cyprinus carpio*) beeinflusste die Reduktion des Sauerstoffgehalts die Überlebensrate der Embryonen drastisch. Während unter normalen Sauerstoffbedingungen (7mg/l O<sub>2</sub>) aus 98,8% der befruchteten Eiern Embryonen schlüpften, war die Schlupfrate bei Hypoxie (1mg/l O<sub>2</sub>) nur bei 17,2% (Wu et al., 2003). Bei der Meeresbrasse (*Acanthopagrus butcheri*) entwickelten sich die befruchteten Eier in Abhängigkeit von der

Sauerstoffkonzentration unterschiedlich schnell. Auch die Überlebensrate war abhängig von der Sauerstoffkonzentration. Bei ungefähr 2,1mg/l O<sub>2</sub> war schon 24 Stunden nach der Fertilisation die Überlebensrate stark reduziert. Die Entwicklung war massiv gestört und es schlüpfte kein Embryo. Bei weniger ausgeprägter Hypoxie (ungefähr 3,1mg/l O<sub>2</sub>) gab es auch deutliche Missbildungen und die Zeit bis zum Schlüpfen wurde verlängert, aber es schlüpften immerhin knapp 50% der Embryonen. Bei noch höheren Sauerstoffkonzentrationen waren kaum noch Missbildungen zu beobachten und die Schlupfrate war weit über 70% (Hassell et al., 2008). Bei den von mir durchgeführten Experimenten erreichte ich eine Schlupfrate von nur knapp über 0,7% für die Embryonen, die 1,9mg/l O<sub>2</sub> ausgesetzt waren, bzw. knapp 1,7% für die Gruppe mit 3,86mg/l O<sub>2</sub>. Die Schlupfrate bei Normoxie lag bei über 94%.

Vergleicht man die Ergebnisse mit der Literatur mit den Ergebnissen, ist anzunehmen, dass die Sauerstoffkonzentration von 3,86mg/l O<sub>2</sub> deutlich unter dem Wert liegt, bei dem sich Medakas ohne Probleme entwickeln und schlüpfen können.

Ob der reduzierte Sauerstoff die alleinige Ursache dafür ist, dass die Medakas schwere Entwicklungsprobleme hatten und nicht schlüpften, kann nicht eindeutig gezeigt werden. Das Gas, das zur Sauerstoffreduktion eingesetzt wurde enthielt fälschlicherweise 5% CO<sub>2</sub>, welches sich auch im Wasser löst und damit Einfluss auf die Embryonen und deren Entwicklung nehmen kann. Die Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration bei einer marinen Schwimmgurde (*Gobiusculus flavescens*) während der Embryonalentwicklung führte zu einem doppelt so hohen Verlust an Eiern bis zum Schlüpfen. Dies war hauptsächlich auf einen Stillstand der Entwicklung in verschiedenen Embryonalstadien zurückzuführen, der meist mit Fehlbildungen verbunden war. Die Anzahl der Fehlbildungen war auch doppelt so hoch bei der Gruppe mit erhöhtem CO<sub>2</sub>-Gehalt (Forsgren et al., 2013). Baumann und Kollegen stellten fest, dass die Erhöhung des CO<sub>2</sub>-Gehalts auch bei Embryonen des Atlantischen Ährenfisches (*Menidia beryllina*) zu Missbildungen und höherer Sterblichkeit führt (Baumann et al., 2011). Im Gegensatz dazu gibt es Berichte vom Orangenen Clownfisch (*Amphiprion percula*) und dem Atlantischen Hering (*Clupea harengus L.*), bei denen die Erhöhung des CO<sub>2</sub>-Gehalts weder die Schlupfrate beeinflusst, noch zu Missbildungen führt (Franke and Clemmesen, 2011; Munday et al., 2009).

In einer aktuell erschienenen Veröffentlichung konnten Cheung und Mitarbeiter (2014) zeigen, dass Hypoxie beim Medaka die Expression des *vasa*-Gens vermindern und die Expression von *dmrt1bY* verstärken kann. *Vasa* ist dabei für die Proliferation der primordialen Keimzellen und damit eventuell für die Differenzierung der Gonade zum Ovar verantwortlich, während *dmrt1bY* die Entwicklung der Gonade zum Hoden fördert. Dadurch entwickeln sich genotypische Weibchen (XX) zu phänotypischen Männchen. Da ich noch keine Angaben zu dem Versuchsdesign besitze, kann ich diese nicht mit den von mir durchgeführten Experimenten vergleichen. Es ist allerdings anzunehmen, dass die Sauerstoffkonzentration in einem Level gelegen hat, bei dem es keine größeren Missbildungen der Embryonen gegeben hat (Cheung et al., 2014).

## 9. Der Einfluss von *fanc-L* auf die Entwicklung von Medaka

Der Knockdown von *fanc-L* bei Medaka zeigte keinen Einfluss auf die Geschlechtsbestimmung und Entwicklung. Auch die Anzahl der Urgeschlechtszellen blieb bei einem Knockdown gegenüber den Kontrollen gleich. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Zebrafischen. Eine homozygote Mutation im *fanc-L* des Zebrafisches führt zur ausschließlichen Entwicklung von Männchen, während heterozygote Fische sich sowohl zu Männchen, als auch Weibchen entwickelten. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass die homozygoten Weibchen starben. Aufgrund der Verhältnisse in der entsprechenden Kreuzung wurde darauf geschlossen, dass homozygote *fanc-L* Mutanten eine Weibchen-zu-Männchen Geschlechtsumwandlung erfahren (Rodríguez-Marí et al., 2010).

Beim Menschen führt eine Mutation im *fanc-L* Gen zu Fanconi-Anämie, einer Krankheit, die mit teilweise multiplen angeborenen Fehlbildungen, Rückbildung des Knochenmarks und einem erhöhten Risiko an Leukämien oder Tumoren zu erkranken verbunden ist. Die Fehlbildungen können neben vielem anderen das Skelett, die Haut, aber auch die männlichen Genitalien betreffen (Auerbach, 2009; Dokal, 2000; Tischkowitz and Hodgson, 2003). Möglicherweise ist *fanc-L* auch für die Proliferation der Urgeschlechtszellen bei Mausembryonen mitverantwortlich, da Mäuse ohne *fanc-L* eine erheblich geringere Anzahl an Urgeschlechtszellen haben, was zur Infertilität der adulten Tiere führt (Zhao et al., 2005). Dies ist aber bei den *fanc-L* Zebrafischmutanten nicht zu beobachten. Im Vergleich mit den

Kontrollen haben die Mutanten 19 Tage nach dem Schlüpfen ähnlich viele Keimzellen, jedoch sterben bei den Mutanten massiv viel mehr Keimzellen bei der Umwandlung der juvenilen Gonade zum Hoden (25 Tage nach der Befruchtung) ab (Rodríguez-Marí et al., 2010). Die Apoptose der Keimzellen ist beim Zebrafisch ein wichtiger Bestandteil bei der Umwandlung der juvenilen Gonade zum adulten Ovar bzw. Hoden und wird hauptsächlich durch *tp53* (*p53*) gesteuert. Die Mutation von *fanc-L* führt zur massiven Apoptose der Urgeschlechtszellen in der geschlechtsbestimmenden Phase und damit zur Entwicklung von ausschließlich Männchen. Eine zusätzliche Mutation im *tp53*-Gen verhindert die massive Apoptose und es entwickeln sich dann auch Weibchen (Rodríguez-Marí et al., 2010). Bei den Medakas ist die Apoptose der primordialen Keimzellen nicht zu beobachten, was daran liegt, dass beim Medaka natürlicherweise keine Umwandlung eines jugendlichen Ovars in das jeweilige ausdifferenzierte Geschlecht erfolgt und so ein Absterben nicht notwendig ist.

#### **10. Die Geschlechtsausbildung von *Oryzias latipes* wird teilweise durch die Anzahl der PGCs bestimmt**

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Anzahl der primordialen Keimzellen beim Medaka nicht den alleinigen Ausschlag gibt, ob sich ein Embryo zu einem Männchen oder zu einem Weibchen entwickelt. Zwar konnte ich zeigen, dass sich die Mehrzahl der XX- und XY-Tiere ohne PGCs zu Männchen entwickeln, jedoch gab es auch wenige Weibchen. Zudem führte auch die Reduktion der primordialen Keimzellen zur Entwicklung von Männchen und Weibchen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Goto und Mitarbeitern (2012) bzw. Fujimoto und Mitarbeitern (2010), die für den Goldfisch bzw. den Schlammpeitzger in Abwesenheit der primordialen Keimzellen beide Geschlechtsausbildungen beobachten konnten.

Da die Mehrzahl der XX-Tiere jedoch männlich war, konnte gezeigt werden, dass eine geringe PGC-Zahl beim Medaka die Geschlechtsbestimmung zu Gunsten der Männchen verschiebt und auch das eigentliche genetische Geschlecht überschreiben kann.

Auch eine anfängliche Erhöhung der primordialen Keimzellen führte zur Ausbildung beider Geschlechter. Zudem finden sich bei der *hotei*-Mutante von *Oryzias latipes* beide Geschlechter (Morinaga et al., 2007). Bei dieser Mutante proliferieren die Keimzellen in beiden Geschlechtern massiv zum Zeitpunkt des Schlüpfens. Bei den adulten Mutanten finden sich

auch XY-Tiere die phänotypisch weiblich sind. Das heißt, dass die massive Vermehrung der PGCs trotz des Vorhandenseins eines intakten *dmrt1bY* die Geschlechtsausbildung entgegen dem eigentlichen, genetischen Geschlecht bestimmen kann.

Zusammenfassend weist dies darauf hin, dass die Geschlechtsbestimmung von *Oryzias latipes* zwar nicht ausschließlich von der Anzahl der primordialen Keimzellen gesteuert wird, sie jedoch einen großen Einfluss darauf nimmt und sogar das eigentliche genetische Geschlecht davon überschrieben werden kann.

## E) Zusammenfassung

Die primordialen Keimzellen (PGCs) sind die einzigen Zellen des Embryos, die die genetische Information von einer Generation an die nächste weiter geben können. Es wurde gezeigt, dass in allen bislang untersuchten Knochenfischen die Anzahl der Urgeschlechtszellen während der Embryonalentwicklung der erste sichtbare Unterschied zwischen Männchen und Weibchen ist. Daraus ergibt sich die Frage, ob die Anzahl der primordialen Keimzellen das Geschlecht bestimmt, oder ob die somatischen Zellen je nach sexueller Identität die Urgeschlechtszellen zur Proliferation anregen. Um zu untersuchen, wie die Anzahl der Urgeschlechtszellen mit der Geschlechtsdetermination zusammenhängt, habe ich in dieser Arbeit die Anzahl der Urgeschlechtszellen manipuliert und deren Schicksal im Verlauf der Embryonalentwicklung verfolgt.

Weiterhin untersuchte ich, in wieweit die Temperatur einen Einfluss auf die Geschlechtsbestimmung hat und ob sie Auswirkungen auf die Anzahl und die Wanderung der Urgeschlechtszellen hat.

In dieser Arbeit wurde der Medakafisch, ein etabliertes Tiermodell der Entwicklungsbiologie verwendet. Bei diesem können die Urgeschlechtszellen leicht markiert werden und ihr Schicksal *in vivo* während der Embryonal- und Larvalentwicklung beobachtet werden. Das Geschlecht wird bei dieser Spezies genetisch durch einen Y/X Mechanismus bestimmt. Dabei ist das Hauptgeschlechtsbestimmungsgen die Y-spezifische Kopie des *dmrt1* Gens.

Durch meine Experimente, in denen ich die Fische während der Embryonalentwicklung bei verschiedenen Temperaturen hielt, konnte ich zeigen, dass beim Medaka der genetische Geschlechtsbestimmungsmechanismus durch erhöhte Temperatur überschrieben werden kann. Die Temperaturerhöhung in der Embryonalentwicklung führt zu einer Weibchen-zu-Männchen Geschlechtsumkehr. Dabei wird die Anzahl der primordialen Keimzellen im Vergleich zu den Kontrollen reduziert. Zudem wird durch die höhere Temperatur das autosomale *dmrt1a* viel früher angeschaltet, was auf einen alternativen Signalweg deutet, der die männliche Geschlechtsentwicklung in XX geschlechtsumgewandelten Tieren steuert.

Auch bei Medaka ist der erste sichtbare Unterschied zwischen Männchen und Weibchen die unterschiedliche Anzahl der primordialen Keimzellen. Eine Möglichkeit wäre, dass es bei den beiden Geschlechtern Unterschiede in der Wanderung der Keimzellen gibt und so eventuell zu Beginn der Entwicklung der Geschlechtsorgane verschieden viele Keimzellen in der zukünftigen Gonade vorhanden sind. Die Untersuchungen hierzu zeigten, dass die Wanderung der primordialen Keimzellen sich bei den Geschlechtern nicht unterscheidet und keine zwei Typen der Wanderung auftreten. Es konnte gezeigt werden, dass die Wanderung der Keimzellen bei beiden Geschlechtern in 3 Phasen verläuft. Dabei ist die erste Phase stark von *sdf1a* abhängig, die zweite Phase wahrscheinlich passiv und in der dritten Phase wandern die Urgeschlechtszellen wieder aktiv, aber unter dem Einfluss von *sdf1b*.

Des Weiteren habe ich die primordialen Keimzellen mittels *dnd*-Morpholino Injektionen ablatiert. Dies führte zur Entwicklung infertiler Männchen mit einer schlauchähnlichen Gonadenstruktur. Die Erhöhung der PGCs in den frühen Embryonalstadien mittels *bucky ball* RNA auf der anderen Seite führte jedoch zu keiner vermehrten Entwicklung von Weibchen. Interessanterweise scheint es einen Mechanismus zu geben, der die Anzahl der Urgeschlechtszellen beschränkt. Selbst nach der anfänglichen Erhöhung der Urgeschlechtszellen auf mehr als das doppelte, verminderte sich die Anzahl in späteren Embryonalstadien auf das Level der Kontrollen.

Zusammenfassend kann man also feststellen, dass es für die Geschlechtsentwicklung von *Oryzias latipes* durchaus von Bedeutung ist, wie viele primordialen Keimzellen der sich entwickelnden Embryo besitzt. Dennoch gibt die Anzahl der PGCs nicht den alleinigen Ausschlag, ob sich ein Individuum zum Männchen (wenige Keimzellen) oder Weibchen (viele Keimzellen) entwickelt.

## F) Summary

The primordial germ cells (PGCs) are the only cells of the embryo, which transmit the genetic information to the next generation. In all teleost fish investigated so far a difference in PGC number is the first visible difference between male and female at the sex determining (SD) stage. But so far it is not clear, if the number of PGCs makes the gender decision or if the sexual identity of the soma triggers PGC proliferation. To investigate how PGC number is related to SD, manipulated the numbers of PGCs were manipulated, and their fate followed through embryonic development.

Moreover the role of different temperatures on sex determination and its influence on the number and behaviour of primordial germ cells was examined.

For this work a well established model of developmental biology, the small aquarium model fish medaka was used, because PGCs can be marked and followed in vivo through embryonic and larval development. Medaka has a male heterogametic SD mechanism where a Y-specific duplicate of *dmrt1* acts as the master SD gene.

In medaka the genetic SD mechanism can be abrogated by high temperature. I observed that increased temperature during embryonic development leads to a female-to-male sex reversal. While high temperature reduced the PGC number compared with untreated embryos at the same developmental stages, it induced - even in the absence of the male SD gene - a preterm expression of the autosomal *dmrt1* paralog, pointing to activation of a redundant male inducing pathway.

Also in medaka the different numbers of PGCs is the first visible difference between male and female. One possible explanation could be some sex specific difference in the movement of the PGCs. This could lead to a different number of PGCs at the beginning of gonadal development. Therefore the migration of the PGCs was monitored. Results show no difference during migration and surely not two different sex specific types of migration. It could be shown, that the migration process in both sexes can be divided into three distinct phases. The first phase is dependent on *sdf1a*, whereas the second phase probably is passive. In the third phase the primordial germ cells migrate actively again, but this time under the influence of *sdf1b*.

Furthermore I could show, that it is possible to ablate all PGCs by DND morpholino injection. While total absence of PGCs led to infertile male development with string like gonads, increasing the number of PGCs by *bucky ball* mRNA injection showed no influence on sexual development. Interestingly I observed that even when I increased the number early in embryonic development by more than two-fold, PGC number after some time went down to the untreated embryo level. This points to a non-cell autonomous mechanism, which limits PGC number according to the somatic SD process.

Taken together we can conclude, that the number of primordial germ cells plays an important role in the process of sexual determination and differentiation, even if it is not the only mechanism, which decides if the individuum will develop as male (few PGCs) or female (many PGCs).

## G) Material

### 1. Fischzucht und verwendete Stämme

Für meine Versuche habe ich verschiedene Stämme des japanischen Reiskärpflings *Oryzias latipes* (Medaka) verwendet. Die Verbreitung von *Oryzias latipes* ist natürlicherweise im Ostasiatischen Raum, vor allem in Japan, Korea, China und Taiwan. Er ist ein kleiner, Eierlegender Frischwasserfisch und avancierte aufgrund vieler Vorzüge zu einem wichtigen Modelorganismus in weiten Bereichen der Biologie, wie zum Beispiel Ökotoxologie, Krebsentstehung, Embryonalentwicklung und Geschlechtsbestimmung (zusammengefasst in: (Wittbrodt et al., 2002)). Er hat eine kurze Generationszeit von 2-3 Monaten, eine extrakorporale Befruchtung und Embryonalentwicklung. Das Genom ist auf der ensembl-Datenbank (<http://ensembl.org>) verfügbar (Kasahara et al., 2007). Mittlerweile wurden viele verschiedene transgene Linien erzeugt, die Reporterproteine für verschiedene Organe und Zelltypen exprimieren; so auch die transgenen Linien, die in meiner Arbeit verwendet wurden.

Die verwendeten *Oryzias* Stämme stammten aus Koloniezuchten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Scharl, Physiologische Chemie I, Biozentrum der Universität Würzburg.

Transgene Linien:

Stammbezeichnung	Kreuzungsnummer	Herkunft	Genetische Besonderheiten	In Würzburg seit
<i>Oryzias latipes carbio</i>	WLC - 2674	Carolina Biological Supplies, USA	Wildtyp-Linie mit einer Mutation im	1991
<i>Oryzias latipes drR</i>	WLC - 5039	Prof. Wakamatsu, Nagoya Institute, Japan	Wildtyp	2008
<i>Oryzias latipes HdrR</i>	WLC - 3860	Prof. Naruse, Okazaki, Japan	Wildtyp (Inzucht-Linie)	03/2009
<i>Oryzias latipes Kaga</i>	WLC - 5214		Wildtyp (Inzucht-Linie)	2002
<i>Oryzias latipes HNI</i>	WLC - 4211	Prof. Wittbrodt, KIT, Deutschland	Wildtyp (Inzucht-Linie)	04/2008
<i>Oryzias curvinotus</i>	WLC - 4199	Prof. Naruse, Okazaki, Japan	Wildtyp	06/2009
<i>Oryzias latipes - Dmrt1a:GFP</i>	WLC - 5523		<i>Dmrt1a:GFP</i>	2009
<i>Oryzias latipes - Vasa: GFP</i>	WLC - 4494	Prof. Naruse, Okazaki, Japan	<i>Vasa: GFP</i>	2011

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Stämme

Früher wurden die *Oryzias*-Stämme in nördliche und südliche Populationen unterteilt. Mittlerweile gehören *carbio*, *drR* und *HdrR* immer noch zu der Art *Oryzias latipes*, während *HNI* und *Kaga* zu einer anderen Art, *Oryzias sakaizumii* gehören (Asai et al., 2011; Sakaizumi, 1984).

*Oryzias curvinotus* ist eine Schwester-Art zu *Oryzias latipes*. Das geschlechtsbestimmende Gen bei dieser Art ist auch *dmrt1bY* (Matsuda et al., 2003). Das geschlechtsbestimmende

Chromosom ist vom gleichen Ursprung, wie bei *Oryzias latipes*, da sie um den geschlechtsbestimmenden Locus die selben genetischen Marker besitzen (Kondo et al., 2001, 2004).

Die transgenen Linien *Dmrt1a*:GFP (Linie exprimiert GFP unter dem Promotor von *Dmrt1a*) und *Vasa*: GFP (Linie exprimiert GFP unter dem Promotor von *Vasa*) mit den entsprechenden Konstrukten dienten vornehmlich als Marker (Kobayashi et al., 2004; Shinomiya et al., 2000; Tanaka et al., 2001; Winkler et al., 2004). Durch die *Vasa*: GFP-Linie konnten vor allem die primordialen Keimzellen während der Embryonalentwicklung beobachtet und deren Verhalten dokumentiert werden. Durch die *Dmrt1a*:GFP-Linie konnte die Expression von *dmrt1a* in Abhängigkeit von verschiedenen Versuchsbedingungen im sich entwickelnden und geschlüpften Embryo beobachtet werden.

Im Labor werden sie in einem definierten Licht-Dunkelphasenzyklus (14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit) gehalten. Die adulten Weibchen können täglich bis zu 30 Eier legen, die sie als Ei-Paket an der Geschlechtsöffnung tragen und im Laufe des Tages abstreifen. Die Eier besitzen ein durchsichtiges Chorion und fadenförmige Filamente, durch die sie aneinander haften. Man kann durch vorsichtiges zwischen die Finger nehmen, die Ei-Pakete abstreifen und in Danieau's Lösung überführen. Die Einteilung in die Entwicklungsstadien der Embryos erfolgte nach Iwamatsu (Iwamatsu, 2004).

## 2. Medien

Danieau's Medium:	17,4mM	NaCl
	0,21mM	KCl
	0,12mM	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	0,18mM	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
	1,5mM	HEPES

### 3. Morpholinos

Morpholinos sind synthetische, chemisch modifizierte RNA-Analoga, die mittels einer Mikrokapillare in das Zytoplasma des befruchteten Eis injiziert werden (Porazinski et al., 2010), wo sie Hybrid-Doppelstränge mit komplementären m-RNA Einzelsträngen bilden. Ist das Morpholino so gewählt, dass es das Startcodon der Translation überdeckt, kann dadurch der Beginn der Translation verhindert werden, weil der Translationskomplex den doppelsträngigen Bereich nicht verdrängen kann. Werden die Morpholinos entsprechend gewählt, können einzelne Exons durch „gezwungenes-alternatives“ Spleißen entfernt werden.

Der Effekt der Blockade der Proteinbiosynthese nimmt aber im Laufe der Entwicklung ab, da Morpholinos mit der Zeit abgebaut werden und mit jeder Zellteilung die effektive Konzentration injizierter Morpholinos verdünnt wird. Durch die Morpholino-Injektion wird so ein Gen nur temporär inhibiert, aber nicht komplett ausgeschaltet.

Für die Versuche wurden hauptsächlich Antisense Morpholinos der Firma Gene-Tools (USA) verwendet. Für *sdf1a* und *sdf1b* wurden zusätzlich Morpholinos verwendet, die das korrekte Spleißen der jeweiligen RNA verhinderten.

Gen gegen das das Morpholino gerichtet ist	Sequenz des Morpholinos von 5' nach 3'	Art des Morpholinos
<i>deadend (dnd)</i>	CTTGCTCTGATTGTCCATCTTCTTG	Antisense
<i>fanc-L</i>	TCCATGAACGTAGACATGCGAGCGT	Antisense
<i>sdf1a</i>	TGAGCGCAAAGAGCTTCACATCCAT	Antisense
<i>sdf1b</i>	TCAGTGCGAGCAGCTTGGCGTCCAT	Antisense
<i>sdf1a</i>	GAGCATTTTAAAGACTTACCGTGTG	Spleiß-Morpholino
<i>sdf1a</i>	TTGCTGCAAAGGAAAGATGAATAGC	Spleiß-Morpholino
<i>sdf1b</i>	GGTGTCCCTGGACTCACCTTTGGAG	Spleiß-Morpholino
<i>sdf1b</i>	TTTGGCTGCAAGACACAAACCGCAG	Spleiß-Morpholino

Tabelle 14: Sequenzen der benutzten Morpholinos

#### 4. Oligonukleotide

Mittels PCR wurde die Anwesenheit bestimmter Gene nachgewiesen:

Die DMT- bzw. PG- Oligonukleotide wurden zur genetischen Unterscheidung des Geschlechts der Medakas benutzt. Dabei wurden die Mact- (*Aktin*) bzw. EF-Primer (*Elongationsfaktor*) als Positiv-Kontrolle verwendet. Mit dem PG- Primerpaar und dem DMRT1a&bY-Primerpaar konnten sowohl das autosomale, als auch das gonosomale *dmrt*-Gen nachgewiesen werden, wodurch auch hiermit die Unterscheidung in Männchen (zwei Banden) und Weibchen (eine Bande) beim Medaka möglich war.

Name	Sequenz von 5' nach 3'	T <sub>M</sub> [°C]	Länge
<b>Mact 1</b>	TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA	60	20
<b>Mact 2</b>	GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG	82	26
<b>EF1a001F</b>	GAC GTC TAC AAA ATC GGC GGT A	66	22
<b>EF1a002R</b>	ATG TCA CGC ACA GCA AAA CG	60	20
<b>DMTYa</b>	GGC CGG GTC CCC GGG TG	64	17
<b>DMTYd</b>	TTT GGG TGA ACT CAC ATG G	56	19
<b>DMTYe</b>	ACA GGT AAA CCA GAA AAA CTA	56	21
<b>DMT1l</b>	AAC TAA TTC ATC CCC ATT CC	56	20
<b>PG 17.5</b>	CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG	74	24
<b>PG 17.6</b>	GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA	58	24
<b>Ola-DMRT1and1bY_F03</b>	AGT GCT CCC GCT GCC GGA AC	71	20
<b>Ola-DMRT1and1bY_R02</b>	CCT CCT CTT GAG CCT GCT GCC	59	21

Tabelle 15: Übersicht über die benutzten Primer

#### 5. Technische Geräte

- Kryomikrotom:  
Jung Frigocut 2800N; Leica
- Tischzentrifugen:  
Biofuge pico; Heraeus  
Centrifuge 5415 R; Eppendorf
- Thermocycler:

Thermocycler T3; Biometra

Thermocycler T3000; Biometra

– Gradienten Cycler:

TProfessional Thermocycler; Biometra

– Mikroinjektion:

Micromanipulator Leitz

Microinjektor; Typ 5242; Eppendorf

Needle Puller; Typ 720; Bachofer

– DNA/RNA-Quantifizierung:

NanoDrop 1000; Thermo Scientific

– Optische Instrumente:

Binokular Stemi SV11; Zeiss

Variable Vergrößerung 8 - 50 fach

Binokular Stemi SV6; Zeiss

Variable Vergrößerung 6 - 66 fach

Binokular SMZ1000; Nikon

Variable Vergrößerung 8 – 80 fach; Kamera: Leica DFC 450 und Software

Binokular M 205 FA; Zeiss

Variable Vergrößerung 8-320 fach; Kamera: Leica DFC 420 C und Software

Konfokales Mikroskop: TCS SP5 (Leica) mit Software; Kamera: C1 (Nikon) und Software

## 6. Software und online-Werkzeuge

A) Microsoft Word for mac 2011: <http://office.microsoft.com/de-de/word/>

- B) Microsoft Excel 10: <http://office.microsoft.com/de-de/excel/>
- C) Mendeley (1.0.1): <http://www.mendeley.com/>
- D) ImageJ (1.44): <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>
- E) Volocity (5.4.2): <http://cellularimaging.perkinelmer.com>
- F) CoralDrawX5: <http://www.corel.com>
- G) Leica Application Suite (LAS):  
[http://cifweb.unil.ch/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=48&Itemid=57](http://cifweb.unil.ch/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=48&Itemid=57)
- H) R (3.0.3): <http://cran.r-project.org/mirrors.html>
- I) Ensembl genome browser: <http://www.ensembl.org/index.html>
- J) Primer3Plus: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

## H) Methoden

### 1. DNA-Extraktion mit Chelex

Um DNA aus Fischflossen zu gewinnen, wurden die Fische auf Eis betäubt und ihnen die Rückenflosse abgeschnitten. Das Flossenstück wurde dann in ein mit 100µl Lysis-Puffer gefülltes 1,5ml Eppendorf Gefäß gegeben und mit einem Pistill zerkleinert. Das Homogenisat im Eppendorf Gefäß wurde für 15min gekocht und anschließend die gleiche Menge an Chelex 100 Lösung hinzugegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass die Lösung frisch aufgewirbelt ist, um zu gewährleisten, dass genügend Chelex-Kügelchen in das Gefäß gelangen. Das Ganze wurde danach 15min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln inkubiert und anschließend erneut für 15min gekocht.

#### Lösungen:

- Lysis-Puffer:

100mM	NaCl
0,5%	Sarcosyl

- Chelex 100 Natriumsalz:

20%	Chelex 100
-----	------------

in H<sub>2</sub>O quellen lassen

### 2. DNA-Extraktion durch Proteinase K

Alternativ zur Chelex-Methode wurde DNA durch Proteinase K –Verdau gewonnen. Dabei wurde nach der Betäubung die Rückenflosse abgeschnitten und in die mit 100µl Extraktionspuffer in einem 1,5ml Eppendorf Gefäß gelegt. Dieses wurde mit geschlossenem Deckel geschüttelt (gevortext) und dann für 2-3 Stunden bei 55°C inkubiert, wobei das Gefäß regelmäßig geschüttelt wurde. Wenn sich das Flossenstück vollständig aufgelöst hat, wurde die Lösung bei maximaler Geschwindigkeit für mindestens 20min bei Raumtemperatur zentrifugiert (16100 x g), um ungelöste Überbleibsel los zu werden.

Lösungen:

- DNA-Extraktionspuffer:

10mM Tris; pH 8,2

10mM EDTA

200mM NaCl

0,5% SDS

kompletieren mit 200µl/ml Proteinase K

### 3. Anfertigung von Paraffinschnitten

Zur Anfertigung der Paraffinschnitte wurden geschlechtsreife Fische dekaptiert und die Schwanzflosse entfernt. Die Fixierung erfolgte für ein bis zwei Tage in Bouin'scher Lösung. Alternativ wurden die Fische über das Wochenende beziehungsweise über Nacht in Formalinlösung fixiert. Die Präparate wurden kurz in PBS gewaschen und dann über eine Alkoholreihe entwässert:

Zeit	Reagenz
10min	25% EtOH / PBS
10min	50% EtOH / PBS
10min	75% EtOH / DEPC H <sub>2</sub> O
10min	100% EtOH
10min	100% EtOH

Die Präparate wurden anschließend zwei mal für je 30min in Xylen geschwenkt und danach in ein Gemisch 50/50 Xylen:Paraffin für 30min bei 60°C gelegt. Das Gemisch wurde zweimal durch reines Paraffin ersetzt und jeweils für 90min bei 60°C gehalten. Anschließend wurde erneut das Paraffin ersetzt, die Präparate in dem Metallschälchen orientiert und durch Stellen auf eine kalte Platte ausgehärtet. Die fertigen Paraffinpräparat-Blöcke konnten bis zum Schneiden bei 4°C aufbewahrt werden.

Zum Anfertigen der Schnitte wurden die Blöcke aus den Metallschälchen genommen, in die passende Form getrimmt und in den Objekthalter des Schlittenmikrotoms eingespannt. Zu

Beginn wurde so lange geschnitten, bis eine durchgängige Schnittfläche vorhanden war und dann die Schnittdicke auf 5-10µm eingestellt. Die Schnitte wurden vorsichtig mit zwei Pinseln von der Klinge gelöst und in ein auf 50°C erwärmtes Wasserbad überführt. Von dort wurden die gestreckten Schnitte auf Objektträgern gesammelt und über Nacht bei 37°C getrocknet. Die Anfertigung der Paraffinschnitte wurde dankenswerterweise teilweise von Robin Wacker übernommen und zur Verfügung gestellt.

### Lösungen:

- Formalinlösung:

40g	Paraformaldehyd
450ml	dest. H <sub>2</sub> O
erhitzen auf 60°C,	
aufklären mit	1n NaOH
	1n HCl ---> pH7,4
ad 500ml dest. H <sub>2</sub> O	
500ml	Phosphatpuffer

- Phosphat-Puffer:

4g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
6,5g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1l	H <sub>2</sub> O

- Bouin'sche Lösung:

15ml	Gesättigte wässrige Pikrinsäure (0,9% Pikrinsäure)
5ml	Formalin (9,5% Formaldehyd)
1ml	Eisessig (4,8% Essigsäure)

- DEPC H<sub>2</sub>O:

1/1000 Vol.	Diethylpyrocarbonat
999/1000 Vol.	Milipor-H <sub>2</sub> O
---> Autoklavieren	

#### 4. Anfertigung von Gefrierschnitten

Der Fisch wurde durch eine Überanaesthisierung auf Eis getötet. Danach wurden die entsprechenden Gewebe frei präpariert, indem man den Kopf entfernte und anschließend am Rücken und Bauch entlang aufschnitt, um die über den Organen befindliche Haut zu entfernen. Für die Untersuchungen wurden die Ovarien bzw. Testis entnommen.

Das entnommene Organ wurde in ein aus Alufolie geformtes Behältnis gegeben, in dem Tissue-Tek vorgelegt wurde. Das Organ wurde orientiert und mit Tissue-Tek überschichtet. Das Gefäß wurde in Methyl-Butan (Isopentan) eingefroren, welches durch flüssigen Stickstoff gekühlt wurde. Die eingebetteten Organe konnten bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden.

Zum Schneiden der Organe wurde das Kryomikroton (Jung Frigocut 2800N; Leica) auf  $-20^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt und alle nötigen Werkzeuge und Hilfsmittel auf die selbe Temperatur gebracht. Das Präparat wurde mit Tissue-Tek auf dem Präparatträger festgefroren und dieser anschließend eingespannt. Mit der Klinge wurde dann so lange geschnitten, bis eine glatte durchgängige Schnittfläche vorhanden war. Danach wurden die Schnitte angefertigt, die eine Schnittdicke von  $10\mu\text{m}$  hatten. Mit einem Pinsel wurden sie vom Messerblock/Schnittstrecker gelöst und auf einen kalten Objektträger transferiert. Dort wurden sie durch Erwärmung mit dem Finger angeschmolzen. War der Objektträger mit genügend Schnitten bestückt, wurde er bei Raumtemperatur ca. 1h getrocknet und anschließend in einer Färbebox mit Blaugel bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur weiteren Verarbeitung mussten die Schnitte für mindestens 30min aufgetaut werden

#### 5. DNA Färbung mit Hoechst bzw. CellMask Deepred

Die DNA der Zellen der Schnitte wurde durch Hoechst angefärbt, indem ein Tropfen der 1:2000 -fach verdünnten Lösung auf den Objektträger aufgetropft wurde. Der Schnitt wurde für 2h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 2-mal in PBS für 5min gewaschen. Daran schloss sich ein Waschgang bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht an. Die Schnitte wurden anschließend mit einem Tropfen Pertex bedeckt und mit einem Deckgläschen eingedeckelt.

Die Färbung mit CellMask DeepRed erfolgte analog dem obigen Protokoll, allerdings mit einer Verdünnung von 1:1000. Für Färbungen mit beiden Floreszenzen erfolgte zuerst die CellMask DeepRed-Färbung. Nach Entfernung der Lösung wurde einmal mit PBS für 5min gewaschen und anschließend mit der Hoechst-Lösung inkubiert.

#### Lösungen:

- 10x PBS:

58,44g	1M NaCl
1,45g	19,5mM KCl
10,5g	59mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
1,5g	11mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

## 6. Herstellung DIG/FLU markierten RNA-Antisense-Proben

Zur Herstellung von Digoxigenin/Fluorescein markierten RNA-Antisense-Proben wurde das Plasmid linearisiert:

10µg	Plasmid DNA
1µl	Enzym
2µl	10x – Puffer (enzymspezifisch)
auf 20µl mit H <sub>2</sub> O auffüllen	

Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Anschließend wurde die DNA mit Phenol-Chloroform extrahiert. Dazu wurde der Ansatz mit H<sub>2</sub>O auf 100µl aufgefüllt, und analog der Extraktion bei der Herstellung gekappter RNA zur Mikroinjektion extrahiert, gefällt, gewaschen und in 20µl RNase freiem H<sub>2</sub>O gelöst. Die In vitro Transkription erfolgte durch Mischen von

2µl	lineariertem Template
2µl	DIG/FLU labeling Mix
0,5µl	RNase Inhibitor

2µl	10x Transkriptionspuffer
und mit H <sub>2</sub> O auf 20µl aufgefüllt	
1µl	T3, T7 oder SP6-RNA Polymerase

Die Inkubation erfolgte für 2h bei 37°C. Nach Zugabe von 1µl RQ DNase und weiteren 30min Inkubation bei 37°C erfolgte die Aufreinigung mit dem RNeasy Kit (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers.

## 7. In Situ Hybridisierung in Gewebe und Embryonen

Die fixierten Gewebe oder Embryonen wurden in einer absteigenden Methanolreihe rehydriert (je 5min 75% Methanol/PBST, 50% Methanol/PBST, 25% Methanol/PBST) und in PBST gewaschen. Dem Proteinase K-Verdau (2,5µl [10mg/ml] in 10ml PBST) schloss sich zweimaliges Waschen in Glycin/PBST und die Fixierung in 4% Paraformaldehyd/PBST mit anschließendem erneutem Waschen in PBST an. Für die Hybridisierung wurden 500µl des Vor-Hybridisierungspuffers (Hybmix) auf die Probe gegeben und 1-8h bei 65°C inkubiert. Diese wurde dann durch die erhitzte (500µl, 80°C) Hybridisierungslösung mit RNA-Antisense-Probe (15µl in 500µl Hybmix) ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C. Am nächsten Tag schloss sich eine Reihe von Waschschritten in SSCT (alle Waschschrritte wurden bei 65°C je 30min durchgeführt: zweimal mit 2x SSCT/50% deionisiertes Formamid; einmal mit 2x SSCT und zweimal in 0,2x SSCT) und eine Blockierung mit Schaf-Serum (5% Schaf-Serum in PBST 1-8 Stunden) an, bevor der Antikörper (anti-DIG-Antikörperlösung) zur Probe hinzugefügt und über Nacht bei 4°C inkubiert wurde.

Am nächsten Tag wurden die Proben mehrmals in PBST (6x 20min), anschließend in Färbepuffer (3 x 15min) gewaschen und mit der Färbelösung bei Raumtemperatur mehrere Stunden inkubiert. Daran schloss sich die Färberaktion an. Diese wurde durch drei mal 2 minütiges Waschen in PBST abgestoppt und in 4%iger PFA/PBST-Lösung für 30min fixiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Lösungen:

- 10X PBST (1l):

58,44g	1M NaCl
1,45g	19,5mM KCl
10,5g	59mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
1,5g	11mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
5ml	0,1% Tween20 (20%)

- Hybmix (50ml):

25ml (100%)	50% Formamid
12,5ml (20x)	5x SSC
250µl (20%)	0,1% Tween 20
150µl (50mg/ml)	150µg/ml Heparin
250mg	5mg/ml Torula RNA

- 20x SSC (1l):

175,3g	NaCl
88,2g	Tris-Na-Citrat-Dihydrat

- Färbe-Puffer (50ml):

1ml	NaCl 5M
2,5ml	MgCl <sub>2</sub> 1M
5ml	Tris-Cl pH 9,5 1M
0,25ml	20% Tween 20

- Färbelösung (10ml):

1 Tablette	NBT/ BCIP
200µl	NaCl 5M
10µl	20% Tween 20

## 8. Herstellung von „gecapter“ RNA zur Mikroinjektion

Um RNA für die Mikroinjektion herzustellen wurde zuerst das Plasmid linearisiert. Dazu wurden 10µg Plasmid DNA mit 30 bis 50 U Enzym, 20µl enzyspezifischen 10x Puffer gemischt und mit H<sub>2</sub>O auf 200µl Volumen aufgefüllt. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C über Nacht. Anschließend wurde der Verdau auf einem Agarosegel kontrolliert.

Die Phenol-Chloroform Extraktion erfolgte durch Zugabe von je 100µl Roti-TE-Phenol und Chloroform, kurzem Schütteln und anschließender Zentrifugation (5min; RT; 16100 x g). Der Überstand kam in ein neues Reaktionsgefäß und wurde mit weiteren 100µl Chloroform versetzt, geschüttelt und zentrifugiert (5min; RT; 16100 x g). Die obere Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Darin erfolgte die DNA-Präzipitation durch Zugabe von 1/10 des Volumens 3M NaOAc, sowie des 2 fachen Volumens an 100%igem EtOH. Dieses Gemisch wurde für mindestens 30min bei -80°C gelagert und anschließend für 30min (maximale Geschwindigkeit; 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100µl 75%igem EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (15min; 4°C; 16100 x g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Danach wurde es in 20µl RNase-freiem Wasser gelöst, und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

Die linearisierte Plasmid-DNA wurde in mittels des Sp6-Enzyms (Ambion-Kit) in RNA transkribiert.

2µl	10x Reaktionspuffer
10µl	2x NTP-Mix
2-3µl	Template DNA
3-4µl	H <sub>2</sub> O
2µl	Sp6-Enzym

Die Inkubation erfolgte für 2h bei 37°C. Anschließend wurde 1µl DNase zugefügt und weitere 15min inkubiert. Daran schloss sich die Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform an.

80µl	RNase-freies H <sub>2</sub> O
100µl	Aqua-Roti-Phenol
50µl	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

Das Gemisch wurde geschüttelt und für 5min zentrifugiert (RT; 16100 x g). Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt, erneut zentrifugiert (5min; RT; 16100 x g) und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Aufreinigung erfolgte anschließend über ein RNA Clean-up Kit (Macherey-Nagel) nach den Anweisungen des Herstellers.

Teilweise wurde die RNA dankenswerterweise auch von Amaury Herpin hergestellt und zur Verfügung gestellt.

### 9. Polymerase Kettenreaktion

Mittels PCR wurden genspezifische Templates amplifiziert. Die meisten Primer waren dabei im Labor schon etabliert. Ein typischer Ansatz war:

- 1µl dNTP Mix (2,5mM je Nukleotid)
- 1µl Vorwärtsprimer (10pmol/µl)
- 1µl Rückwärtsprimer (10pmol/µl)
- 0,2µl Template
- 41,5µl H<sub>2</sub>O
- 5µl 10x Reaktionspuffer
- 0,3µl Polymerase

Das Standardprotokoll der PCR war folgendermaßen:

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	Pause (Vorheizen)
2	95°C	5
3	95°C	30''
4	55°C	30''
5	72°C	1' pro 1kb DNA    34 Wiederholungen ab Schritt 3
6	72°C	5'
7	10°C	Pause

## 10. Auftrennung von DNA Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren haben aufgrund ihrer Phosphatgruppen eine negative Nettoladung. Diese Eigenschaft macht sich die Gelelektrophorese zu Nutze, um DNA- oder RNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufzutrennen. Agarosegele sind ein erstarrtes Gemisch aus einem gewissen Prozentsatz Agarose und Laufpuffer, das aufgekocht wurde, dann anschließend in einen Gelschlitten gegossen und mit so genannten Gelkämmen versehen wurden. Die Gelkämme entschieden über die Anzahl und Breite der Taschen, in die die DNA pipettiert werden konnte. DNA und RNA werden, wenn Spannung an das Gel, das im Laufpuffer liegt, angelegt ist, in Richtung der Anode gezogen. Dabei legen größere Fragmente eine kürzere Distanz zurück als kleinere. Je nach erwarteter Länge des PCR-Produkts kann man die Konzentration der Agarose Gele anpassen. Als Standard wurde ein 1%iges Agarose-Gel verwendet, das seinen optimalen Auftrennungsbereich zwischen 0,5 und 7kb Länge des PCR-Fragments hat.

Um eine Gelelektrophorese durchführen zu können, wurde eine entsprechende Menge Agarose mit 1x SB-Puffer gemischt und aufgekocht, bis die Flüssigkeit klar war. Nach kurzem Abkühlen (auf ca. 60°C) wurde sie in ein mit Kämmen versehenen Gelschlitten gegossen und nach Aushärten des Gels wurden die Kämmen entfernt. In die dadurch entstandenen Kammern wurden 10µl der entsprechenden Proben, gemischt mit je ca. 3µl Ladepuffer, aufgetragen. In eine leere Tasche wurde zum Größenvergleich 10µl eines 1kb-Größenstandards gegeben. Nach dem Beladen wurde Gleichspannung an die Gelkammer angelegt, wodurch die Fragmente dann aufgetrennt wurden. Laufzeit und Höhe der angelegten Spannung war abhängig von der verwendeten Gelkammer, Gelgröße und Fragmentgröße. Anschließend wurde das Gel für ca. 20min in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt. Dabei interkalierte das Ethidiumbromid in die DNA und die so angefärbte DNA konnte anschließend unter UV-Licht betrachtet werden. Mit Hilfe einer Kamera und eines UV-Transilluminators wurden von den Gelen Bilder angefertigt.

## 11. Mikroinjektion von Morpholinos und RNA in Embryonen

Durch Mikroinjektion von DNA-, RNA- Konstrukten oder Morpholinos in Fischembryonen können im sich entwickelnden Embryo Eigenschaften von Genen *in-vivo* untersucht werden. Werden geeignete DNA-Konstrukte in sehr frühe Stadien (Ein- bis Vier-Zell-Stadium) injiziert, können dadurch stabil transgene Linien geschaffen werden. Die Morpholino-Injektion dient dem „Silencing“, dem vorübergehenden Ausschalten von bestimmten Genen. Dadurch kann der Einfluss des Gens auf die Embryonalentwicklung untersucht werden.

Für die Mikroinjektion wurden ausschließlich Embryonen des Ein-Zell-Stadiums verwendet. Dafür wurden die Eier ca. 10min nach der Befruchtung vom Bauch der Weibchen abgestreift. Durch sanftes Rollen oder mit Pinzetten wurden die Eier von den Filamenten befreit und vereinzelt. Sie wurden in eine Injektionsschale gegeben. Diese bestand aus einer mit 1,5%iger Agarose in Danieau's Medium ausgegossenen Bakterienchale, in die mit Hilfe einer Negativvorlage beim Aushärten Rillen gemacht wurden. In diese Rillen wurden die Eier überführt und in einer Reihe ausgerichtet.

Die zur Injektion nötigen Nadeln wurden mit Hilfe eines „Vertical pipete pullers“ aus Glaskapillaren hergestellt. Die Kapillaren (Außendurchmesser 1mm, Innendurchmesser 0,5mm) wurden hierzu in das Gerät eingespannt und durch Anlegen einer Spannung an das Heizelement geschmolzen und gleichzeitig auseinander gezogen. Durch Variation der Spannung zwischen 15,2 und 16,4 Volt, konnten die Nadeln in der Form passend geändert werden. Die Nadeln wurden mit ca. 3 bis 5µl Morpholino- bzw. RNA-Lösung entsprechender Konzentration gefüllt. Um die Injektionsmenge besser abschätzen zu können, konnte der Probenlösung bei Bedarf etwas Phenolrot-Lösung zugegeben werden. Die Nadel wurde anschließend in den Nadelhalter des Mikromanipulators eingespannt und die geschlossene Spitze mit dem stumpfen Ende einer Pinzette geöffnet. Durch kurzes Anlegen von Druck konnte die Öffnungsweite der Nadel kontrolliert und der richtige Injektionsdruck eingestellt werden. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde die Nadel auf die einzelnen Eier ausgerichtet. Diese wurden so ausgerichtet, dass sich die Zelle(n) gegenüber der Nadel befanden, so dass durch das Chorion und den Dotter in die Zelle, bzw. Zellen gestochen wurde. Die Injektion erfolgte dann in das Zytoplasma der Zelle, wobei das Injektionsvolumen durch Änderung des Injektionsdruckes oder der Injektionsdauer verändert werden konnte. Dieses betrug in etwa

$\frac{1}{4}$  des Zellvolumens. Nach Beendigung des Injektionsvorgangs wurde die Nadel vorsichtig aus dem Embryo entfernt und das Prozedere beim nächsten Embryo wiederholt. Nach Abschluss der Injektionen wurden die Embryonen in eine neue Schale, die mit frischer Danieau's Lösung gefüllt war, transferiert. Die Schale wurde je nach gewünschter Temperatur im Brutschrank aufbewahrt und die Embryonen nach dem Schlüpfen in die Aufzucht bei Standardbedingungen gegeben.

## I) Literaturverzeichnis

- Aida, T. (1936). SEX REVERSAL I N APLOCHEILUS LATIPES AND A NEW. 136–153.
- Akerfelt, M., Morimoto, R.I., and Sistonen, L. (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 545–555.
- Amin, J., Ananthan, J., and Voellmy, R. (1988). Key features of heat shock regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3761–3769.
- Aoki, Y., Nakamura, S., Ishikawa, Y., and Tanaka, M. (2009). Expression and syntenic analyses of four nanos genes in medaka. *Zoolog. Sci.* 26, 112–118.
- Ara, T., Nakamura, Y., Egawa, T., Sugiyama, T., Abe, K., Kishimoto, T., Matsui, Y., and Nagasawa, T. (2003). Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5319–5323.
- Asai, T., Senou, H., and Hosoya, K. (2011). *Oryzias sakaizumii*, a new ricefish from northern Japan (Teleostei : Adrianichthyidae). *Ichtyol. Explor. Freshwaters* 22, 289–299.
- Auerbach, A.D. (2009). Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat. Res.* 668, 4–10.
- Baroiller, J.-F., Guiguen, Y., and Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 910.
- Baroiller, J.F., D’Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S., and Hoerstgen-Schwark, G. (2009). Tilapia sex determination: Where temperature and genetics meet. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 153, 30–38.
- Baumann, H., Talmage, S.C., and Gobler, C.J. (2011). Reduced early life growth and survival in a fish in direct response to increased carbon dioxide. *Nat. Clim. Chang.* 2, 38–41.
- Beye, M. (2004). The dice of fate: the *csd* gene and how its allelic composition regulates sexual development in the honey bee, *Apis mellifera*. *Bioessays* 26, 1131–1139.
- Blázquez, M., Zanuy, S., Carillo, M., Acuicultura, I. De, De, D.T., and De, C.S. (1998). Effects of Rearing Temperature on Sex Differentiation in the European Sea Bass ( *Dicentrarchus labrax* L.). *J. Exp. Zool.* 207–216.
- Bontems, F., Stein, A., Marlow, F., Lyautey, J., Gupta, T., Mullins, M.C., and Dosch, R. (2009). Bucky ball organizes germ plasm assembly in zebrafish. *Curr. Biol.* 19, 414–422.
- Brennan, J., Karl, J., Martineau, J., Nordqvist, K., Schmahl, J., Tilmann, C., Ung, K., and Capel, B. (1998). Sry and the testis: molecular pathways of organogenesis. *J. Exp. Zool.* 281, 494–500.

- Bull, J.J. (1980). Sex determination in Reptiles. *Q. Rev. Biol.* 55, 3–21.
- Burtis, K.C., and Baker, B.S. (1989). *Drosophila* doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell* 56, 997–1010.
- Cheung, C.H.Y., Chiu, J.M.Y., and Wu, R.S.S. (2014). Hypoxia turns genotypic female medaka fish into phenotypic males. *Ecotoxicology*.
- Chue, J., and Smith, C.A. (2011). Sex determination and sexual differentiation in the avian model. *FEBS J.* 278, 1027–1034.
- Conover, D.O. (2004). Temperature-Dependent Sex Determination in Fishes. In *Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates*.
- Conover, D.O., and Kynard, B.E. (1981). Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. *Science* 213, 577–579.
- Deeming, D.C. (2004). Prevalence of TSD in crocodylians. In *Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates*, pp. 33 – 41.
- Desprez, D., and Mélard, C. (1998). Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 79–84.
- Devlin, R., and Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191–364.
- Doitsidou, M., Reichman-Fried, M., Stebler, J., Köprunner, M., Dörries, J., Meyer, D., Esguerra, C. V., Leung, T., and Raz, E. (2002). Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 111, 647–659.
- Dokal, I. (2000). The genetics of Fanconi's anaemia. *Baillieres. Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 13, 407–425.
- Ephrussi, A., and Lehmann, R. (1992). Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* 358.
- Ewert, M.A., Jackson, D.R., and Nelson, C.E. (1994). Patterns of temperature-dependent sex determination in turtles. *J. Exp. Zool.* 270, 3–15.
- Ewert, M.A., Etchberger, C.R., and Nelson, C.E. (2004). Turtle Sex-Determination Modes and TSD Patterns, and Some TSD Pattern Correlates. In *Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates*, pp. 21 – 32.
- Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Shinoda, T., Kimura, H., Strobl-Mazzulla, P.H., Strüssmann, C. a, and Somoza, G.M. (2008). Dimorphic expression of *dmrt1* and *cyp19a1* (ovarian aromatase) during early gonadal development in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Sex Dev.* 2, 316–324.
- Forsgren, E., Dupont, S., Jutfelt, F., and Amundsen, T. (2013). Elevated CO<sub>2</sub> affects embryonic development and larval phototaxis in a temperate marine fish. *Ecol. Evol.* 3, 3637–3646.

- Franke, a., and Clemmesen, C. (2011). Effect of ocean acidification on early life stages of Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Biogeosciences* 8, 3697–3707.
- Fujimoto, T., Nishimura, T., Goto-Kazeto, R., Kawakami, Y., Yamaha, E., and Arai, K. (2010). Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 17211–17216.
- Gamble, T. (2010). A review of sex determining mechanisms in geckos (Gekkota: Squamata). *Sex Dev.* 4, 88–103.
- Gilboa, L., and Lehmann, R. (2006). Soma-germline interactions coordinate homeostasis and growth in the *Drosophila* gonad. *Nature* 443, 97–100.
- Goto, R., Saito, T., Takeda, T., Fujimoto, T., Takagi, M., Arai, K., and Yamaha, E. (2012). Germ cells are not the primary factor for sexual fate determination in goldfish. *Dev. Biol.* 370, 98–109.
- Goto-Kazeto, R., Abe, Y., Masai, K., Yamaha, E., Adachi, S., and Yamauchi, K. (2006). Temperature-dependent sex differentiation in goldfish: Establishing the temperature-sensitive period and effect of constant and fluctuating water temperatures. *Aquaculture* 254, 617–624.
- De Grandi, A., Calvari, V., Bertini, V., Bulfone, A., Peverali, G., Camerino, G., Borsani, G., and Guioli, S. (2000). The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. *Mech. Dev.* 90, 323–326.
- Gubbay, J., Koopman, P., Collignon, J., Burgoyne, P., and Lovell-Badge, R. (1990). Normal structure and expression of *Zfy* genes in XY female mice mutant in *Tdy*. *Development* 109, 647–653.
- Guraya, S. (1994). Gonadal development and production of gametes in fish. ... -INDIAN Natl. Sci. Acad. PART B B 60, 15 – 32.
- Hamaguchi, S. (1982). A light- and electron-microscopic study on the migration of primordial germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*. *Cell Tissue Res.* 139–151.
- Hashimoto, Y., Maegawa, S., Nagai, T., Yamaha, E., Suzuki, H., Yasuda, K., and Inoue, K. (2004). Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. *Dev. Biol.* 268, 152–161.
- Hassell, K.L., Coutin, P.C., and Nugegoda, D. (2008). Hypoxia impairs embryo development and survival in black bream (*Acanthopagrus butcheri*). *Mar. Pollut. Bull.* 57, 302–306.
- Hasselmann, M., Gempe, T., Schiøtt, M., Nunes-Silva, C.G., Otte, M., and Beye, M. (2008). Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature* 454, 519–522.
- Hattori, R.S., Gould, R.J., Fujioka, T., Saito, T., Kurita, J., Strüssmann, C. a, Yokota, M., and Watanabe, S. (2007). Temperature-dependent sex determination in HdrR medaka *Oryzias*

- latipes: gender sensitivity, thermal threshold, critical period, and DMRT1 expression profile. *Sex Dev.* *1*, 138–146.
- Hayashi, Y., Kobira, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, E., Yazawa, T., Hirai, T., Kamei, Y., and Kitano, T. (2010). High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. *Mol. Reprod. Dev.* *77*, 679–686.
- Herpin, A., Rohr, S., Riedel, D., Kluever, N., Raz, E., and Schartl, M. (2007a). Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Dev. Biol.* *7*, 3.
- Herpin, A., Schindler, D., Kraiss, A., Hornung, U., Winkler, C., and Schartl, M. (2007b). Inhibition of primordial germ cell proliferation by the medaka male determining gene *Dmrt 1 bY*. *BMC Dev. Biol.* *7*, 99.
- Herpin, A., Fischer, P., Liedtke, D., Kluever, N., Neuner, C., Raz, E., and Schartl, M. (2008). Sequential SDF1a and b-induced mobility guides Medaka PGC migration. *Dev. Biol.* *320*, 319–327.
- Herpin, A., Braasch, I., Kraeussling, M., Schmidt, C., Thoma, E.C., Nakamura, S., Tanaka, M., and Schartl, M. (2010). Transcriptional rewiring of the sex determining *dmrt1* gene duplicate by transposable elements. *PLoS Genet.* *6*, e1000844.
- Hobbs, J.-P.A., Munday, P.L., and Jones, G.P. (2004). Social induction of maturation and sex determination in a coral reef fish. *Proc. Biol. Sci.* *271*, 2109–2114.
- Hornung, U., Herpin, A., and Schartl, M. (2007). Expression of the male determining gene *dmrt1bY* and its autosomal orthologue *dmrt1a* in medaka. *Sex Dev.* *1*, 197–206.
- Horvay, K., Claussen, M., Katzer, M., Landgrebe, J., and Pieler, T. (2006). *Xenopus* Dead end mRNA is a localized maternal determinant that serves a conserved function in germ cell development. *Dev. Biol.* *291*, 1–11.
- Iten, K. (2008). Klimadiagramme weltweit.
- Iwamatsu, T. (2004). Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mech. Dev.* *121*, 605–618.
- Karayucel, I., Ak, O., and Karayucel, S. (2006). Effect of temperature on sex ratio in guppy *Poecilia reticulata* (Peters 1860). *Aquac. Res.* *37*, 139–150.
- Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Nagayasu, Y., Doi, K., Kasai, Y., et al. (2007). The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* *447*, 714–719.
- Kettlewell, J.R., Raymond, C.S., and Zarkower, D. (2000). Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis* *26*, 174–178.

- Knaut, H., Pelegri, F., Bohmann, K., Schwarz, H., and Nüsslein-Volhard, C. (2000). Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *J. Cell Biol.* *149*, 875–888.
- Knaut, H., Werz, C., Geisler, R., and Nüsslein-Volhard, C. (2003). A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature* *421*, 279–282.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., and Nagahama, Y. (2000). Differential expression of vasa homologue gene in the germ cells during oogenesis and spermatogenesis in a teleost fish, tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Mech. Dev.* *99*, 139–142.
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., and Nagahama, Y. (2002). Two isoforms of vasa homologs in a teleost fish: Their differential expression during germ cell differentiation. *Mech. Dev.* *111*, 167–171.
- Kobayashi, T., Matsuda, M., Kajiura-Kobayashi, H., Suzuki, A., Saito, N., Nakamoto, M., Shibata, N., and Nagahama, Y. (2004). Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Dyn.* *231*, 518–526.
- Kondo, M., Nagao, E., Mitani, H., and Shima, A. (2001). Differences in recombination frequencies during female and male meioses of the sex chromosomes of the medaka, *Oryzias latipes*. *Genet. Res.* *78*, 23–30.
- Kondo, M., Nanda, I., Hornung, U., Schmid, M., and Schartl, M. (2004). Evolutionary origin of the medaka Y chromosome. *Curr. Biol.* *14*, 1664–1669.
- Kondo, M., Hornung, U., Nanda, I., Imai, S., Sasaki, T., Shimizu, A., Asakawa, S., Hori, H., Schmid, M., Shimizu, N., et al. (2006). Genomic organization of the sex-determining and adjacent regions of the sex chromosomes of medaka. *Genome Res.* *16*, 815–826.
- Koopman, P. (1999). Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cell. Mol. Life Sci.* *55*, 839–856.
- Koopman, P., Münsterberg, A., Capel, B., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* *348*, 450–452.
- Koumoundouros, G., Pavlidis, M., Anezaki, L., Kokkari, C., Steriotti, A., Divanach, P., and Kentouri, M. (2002). Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase. *J. Exp. Zool.* *292*, 573–579.
- Krøvel, A.V., and Olsen, L.C. (2004). Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish vasa during gonadal development. *Dev. Biol.* *271*, 190–197.
- Kurokawa, H., Aoki, Y., Nakamura, S., Ebe, Y., Kobayashi, D., and Tanaka, M. (2006). Time-lapse analysis reveals different modes of primordial germ cell migration in the medaka *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* *48*, 209–221.

- Kurokawa, H., Saito, D., Nakamura, S., Katoh-Fukui, Y., Ohta, K., Baba, T., Morohashi, K., and Tanaka, M. (2007). Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 16958–16963.
- Lagomarsino, I. V., and Conover, D.O. (1993). Variation in environmental and genotypic sex-determining mechanisms across a latitudinal gradient in the fish, *Menidia menidia*. *Evol. Int. J. Org. Evol.* *47*, 487–494.
- Lance, V. a (2009). Is regulation of aromatase expression in reptiles the key to understanding temperature-dependent sex determination? *J. Exp. Zool. A. Ecol. Genet. Physiol.* *311*, 314–322.
- Lang, J.W., and Andrews, H. V. (1994). Temperature-dependent sex determination in crocodylians. *J. Exp. Zool.* *270*, 28–44.
- Lei, N., Hornbaker, K.I., Rice, D.A., Karpova, T., Agbor, V.A., and Heckert, L.L. (2007). Sex-specific differences in mouse DMRT1 expression are both cell type- and stage-dependent during gonad development. *Biol. Reprod.* *77*, 466–475.
- Liu, L., Hong, N., Xu, H., Li, M., Yan, Y., Purwanti, Y., Yi, M., Li, Z., Wang, L., and Hong, Y. (2009). Medaka dead end encodes a cytoplasmic protein and identifies embryonic and adult germ cells. *Gene Expr. Patterns* *9*, 541–548.
- Luckenbach, J.A., Godwin, J., Daniels, H. V., and Borski, R.J. (2003). Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* *216*, 315–327.
- Maack, G., and Segner, H. (2003). Morphological development of the gonads in zebrafish. *J. Fish Biol.* *62*, 895–906.
- Masuyama, H., Yamada, M., Kamei, Y., Fujiwara-Ishikawa, T., Todo, T., Nagahama, Y., and Matsuda, M. (2012). Dmrt1 mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by Dmy in the medaka. *Chromosome Res.* *20*, 163–176.
- Matsuda, M., Nagahama, Y., Shinomiya, A., Sato, T., Matsuda, C., Kobayashi, T., Morrey, C.E., Shibata, N., Asakawa, S., Shimizu, N., et al. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* *417*, 559–563.
- 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*, 159–161.
- Matsuda, M., Shinomiya, A., Kinoshita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Paul-Prasanth, B., Lau, E., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M., and Nagahama, Y. (2007). DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 3865–3870.
- Miura, C., Miura, T., Yamashita, M., Yamauchi, K., and Nagahama, Y. (1996). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in germ-somatic cell coculture from immature Japanese eel testis. *Dev. Growth Differ.* *38*, 257–262.

- Molyneaux, K., and Wylie, C. (2004). Primordial germ cell migration. *Int. J. Dev. Biol.* *48*, 537–544.
- Molyneaux, K.A., Zinszner, H., Kunwar, P.S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M.J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C., et al. (2003). The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* *130*, 4279–4286.
- Morinaga, C., Saito, D., Nakamura, S., Sasaki, T., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Tanaka, M., and Kondoh, H. (2007). The hotei mutation of medaka in the anti-Mullerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 9691–9696.
- Munday, P.L., Donelson, J.M., Dixon, D.L., and Endo, G.G.K. (2009). Effects of ocean acidification on the early life history of a tropical marine fish. *Proc. Biol. Sci.* *276*, 3275–3283.
- Murdock, C., and Wibbels, T. (2003). Expression of *Dmrt1* in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenet. Genome Res.* *101*, 302–308.
- Nagahama, Y., Kagawa, H., and Young, G. (1982). Cellular Sources of Sex Steroids in Teleost Gonads. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* *39*, 56–64.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X.-T., and Nagahama, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.* *281*, 362–372.
- Nakamura, S., Kobayashi, K., Nishimura, T., Higashijima, S., and Tanaka, M. (2010). Identification of germline stem cells in the ovary of the teleost medaka. *Science* *328*, 1561–1563.
- Nakamura, S., Kobayashi, K., Nishimura, T., and Tanaka, M. (2011). Ovarian germline stem cells in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Int. J. Biol. Sci.* *7*, 403–409.
- Nanda, I., Kondo, M., Hornung, U., Asakawa, S., Winkler, C., Shimizu, A., Shan, Z., Haaf, T., Shimizu, N., Shima, A., et al. (2002). A duplicated copy of *DMRT1* in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11778–11783.
- Nanda, I., Hornung, U., Kondo, M., Schmid, M., and Schartl, M. (2003). Common spontaneous sex-reversed XX males of the medaka *Oryzias latipes*. *Genetics* *163*, 245–251.
- Nelson, J.S. (1994). *Fishes of the world*.
- Ohmuro-Matsuyama, Y., Matsuda, M., Kobayashi, T., Ikeuchi, T., and Nagahama, Y. (2003). Expression of *DMY* and *DMRT1* in various tissues of the medaka (*Oryzias latipes*) [corrected]. *Zoolog. Sci.* *20*, 1395–1398.
- Ohno, S. (1967). *Sex chromosomes and sex-linked genes* (Springer Verlag; New York).
- Olsen, L.C., Aasland, R., and Fjose, A. (1997). A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mech. Dev.* *66*, 95–105.

- Ospina-Alvarez, N., and Piferrer, F. (2008). Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS One* 3, e2837.
- Otake, H., Shinomiya, A., Matsuda, M., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (2006). Wild-derived XY sex-reversal mutants in the Medaka, *Oryzias latipes*. *Genetics* 173, 2083–2090.
- Patiño, R., Davis, K., and Schoore, J. (1996). Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. *J. Exp. Zool.* 209 – 218.
- Paul-Prasanth, B., Matsuda, M., Lau, E.-L., Suzuki, A., Sakai, F., Kobayashi, T., and Nagahama, Y. (2006). Knock-down of DMY initiates female pathway in the genetic male medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 815–819.
- Penalva, L., and Sánchez, L. (2003). RNA binding protein sex-lethal (Sxl) and control of *Drosophila* sex determination and dosage compensation. *Microbiol. Mol. Biol. ...* 67, 343–359.
- Porazinski, S.R., Wang, H., and Furutani-Seiki, M. (2010). Microinjection of medaka embryos for use as a model genetic organism. *J. Vis. Exp.*
- Pudney, J., and Callard, G. V (1984). Identification of Leydig-like cells in the testis of the dogfish *Squalus acanthias*. *Anat. Rec.* 209, 323–330.
- Rodríguez-Marí, A., Cañestro, C., Bremiller, R. a, Nguyen-Johnson, A., Asakawa, K., Kawakami, K., and Postlethwait, J.H. (2010). Sex reversal in zebrafish fancl mutants is caused by Tp53-mediated germ cell apoptosis. *PLoS Genet.* 6, e1001034.
- Saito, T., Fujimoto, T., Maegawa, S., Inoue, K., Tanaka, M., Arai, K., and Yamaha, E. (2006). Visualization of primordial germ cells in vivo using GFP-nos1 3'UTR mRNA. *Int. J. Dev. Biol.* 50, 691–699.
- Sakaizumi, M. (1984). Rigid Isolation between the Northern Population and the Southern Population of the Medaka, *Oryzias latipes*(Genetics). *Zoolog. Sci.* 1, 795 – 800.
- Sato, T., Endo, T., Yamahira, K., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (2005). Induction of female-to-male sex reversal by high temperature treatment in Medaka, *Oryzias latipes*. *Zoolog. Sci.* 22, 985–988.
- Satoh, N., and Egami, N. (1972). Sex differentiation of germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*, during normal embryonic development. ... *Embryol. Exp. Morphol.* 28, 385–395.
- Selim, K.M., Shinomiya, A., Otake, H., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (2009). Effects of high temperature on sex differentiation and germ cell population in medaka, *Oryzias latipes*. *Aquaculture* 289, 340–349.
- Shang, E.H.H., and Wu, R.S.S. (2004). Aquatic hypoxia is a teratogen and affects fish embryonic development. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4763–4767.

- Shimada, Y., and Egami, N. (1984). The unique responses of the primordial germ cells in the fish *Oryzias latipes* to gamma-rays. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* *45*, 227–235.
- Shinomiya, A., Tanaka, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y., and Hamaguchi, S. (2000). The vasa-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* *42*, 317–326.
- Shinomiya, A., Hamaguchi, S., and Shibata, N. (2001). Sexual differentiation of germ cell deficient gonads in the medaka, *Oryzias latipes*. *J. Exp. Zool.* *290*, 402–410.
- Shinomiya, A., Otake, H., Togashi, K., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (2004). Field survey of sex-reversals in the medaka, *Oryzias latipes*: genotypic sexing of wild populations. *Zoolog. Sci.* *21*, 613–619.
- Shinomiya, A., Otake, H., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (2010). Inherited XX sex reversal originating from wild medaka populations. *Heredity (Edinb.)* *105*, 443–448.
- Siegfried, K.R., and Nüsslein-Volhard, C. (2008). Germ line control of female sex determination in zebrafish. *Dev. Biol.* *324*, 277–287.
- Slanchev, K., Stebler, J., de la Cueva-Méndez, G., and Raz, E. (2005). Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 4074–4079.
- Smith, C. a, Roeszler, K.N., Ohnesorg, T., Cummins, D.M., Farlie, P.G., Doran, T.J., and Sinclair, A.H. (2009). The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. *Nature* *461*, 267–271.
- Sorger, P.K. (1991). Heat Shock Factor and the Heat Shock Response. *Cell* *65*, 363–366.
- Stebler, J., Spieler, D., Slanchev, K., Molyneaux, K.A., Richter, U., Cojocar, V., Tarabykin, V., Wylie, C., Kessel, M., and Raz, E. (2004). Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine *SDF-1/CXCL12*. *Dev. Biol.* *272*, 351–361.
- Strüssmann, C., and Cota, J. (1996). Temperature effects on sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. *Environ. Biol.* ... 143–154.
- Suzuki, A., Nakamoto, M., Kato, Y., and Shibata, N. (2005). Effects of Estradiol-17 $\beta$  on Germ Cell Proliferation and *DMY* Expression during Early Sexual Differentiation of the Medaka *Oryzias latipes*. *Zoolog. Sci.* *22*, 791–796.
- Takahashi, H. (1977). Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* *28*, 57 – 65.
- Tanaka, M., Kinoshita, M., Kobayashi, D., and Nagahama, Y. (2001). Establishment of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lines with the expression of green fluorescent protein

fluorescence exclusively in germ cells: a useful model to monitor germ cells in a live vertebrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 2544–2549.

Tischkowitz, M.D., and Hodgson, S. V (2003). Fanconi anaemia. *J. Med. Genet.* *40*, 1–10.

Valenzuela, N. (2004). Evolution and maintenance of temperature-dependent sex determination. In *Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates*,.

Viets, B.E., Ewert, M.A., Talent, L.G., and Nelson, C.E. (1994). Sex-determining mechanisms in squamate reptiles. *J. Exp. Zool.* *270*, 45–56.

Volff, J.N., and Schartl, M. (2002). Sex determination and sex chromosome evolution in the medaka, *Oryzias latipes*, and the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Cytogenet. Genome Res.* *99*, 170–177.

Van Vuren, J.H.J., and Soley, J.T. (1990). Some ultrastructural observations of leydig and sertoli cells in the testis of *Tilapia rendalli* following induced testicular recrudescence. *J. Morphol.* *206*, 57–63.

Wehner, R., and Gehring, W.J. (2013). *Zoologie* (Georg Thieme Verlag).

Weidinger, G., Wolke, U., Köprunner, M., Klinger, M., and Raz, E. (1999). Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells. *Development* *126*, 5295–5307.

Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2003). dead end, a Novel Vertebrate Germ Plasm Component, Is Required for Zebrafish Primordial Germ Cell Migration and Survival. *Curr. Biol.* *13*, 1429–1434.

Winkler, C., Hornung, U., Kondo, M., Neuner, C., Duschl, J., Shima, A., and Schartl, M. (2004). Developmentally regulated and non-sex-specific expression of autosomal *dmrt* genes in embryos of the Medaka fish (*Oryzias latipes*). *Mech. Dev.* *121*, 997–1005.

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

Wu, R.S.S., Zhou, B.S., Randall, D.J., Woo, N.Y.S., and Lam, P.K.S. (2003). Aquatic Hypoxia Is an Endocrine Disruptor and Impairs Fish Reproduction. *Environ. Sci. Technol.* *37*, 1137–1141.

Yamamoto, E. (1999). Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 235–246.

Yoon, C., Kawakami, K., and Hopkins, N. (1997). Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* *124*, 3157–3165.

Yoshizaki, G., Sakatani, S., Tominaga, H., and Takeuchi, T. (2000a). Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol. Reprod. Dev.* *55*, 364–371.

Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Sakatani, S., and Takeuchi, T. (2000b). Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter. *Int. J. Dev. Biol.* *44*, 323–326.

Zarkower, D. (2001). Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat. Rev. Genet.* *2*, 175–185.

Zhao, Q.-G., Lu, B.-S., and Huang, P.-T. (2005). [Functions of FANCL in primordial germ cell formation and Fanconi anemia]. *Yi Chuan Xue Bao* *32*, 993–1000.





AGTGAGGCCCTAAAACCTGAAGAGGTTTGA AACCCAGACCAGGAACCAAATCTGCAAACCGGGCTC  
TGACCTTCAGCGTCTCACCTGGACCGACCCTGGGTTCTGGGCTGACCCTGGGTTCTGGACAGAACCT  
GGGTTCTGGACAGAACCCGGGTTCTGGGCCGCCGTTTACGTCCAACCTGCTGGATCAAACCGAGAGTG  
AACGAAATTACAATTATTTTATTGTGAAGCAGTAAAACATCAAATAGTAGACTTTTATGTTGTGCA  
TGGTGGTATAGTGGTTGCAACCCAGCCTCACAGCTGGAAGGACCTGGTTTGAATCCCAGCTGGGTT  
TGTGCATGCGTGAGTTTCTCCACAGTCCCAAACGTTCTTCAGAGGTTCACTGATGGCTCTCCAT  
TGTCTCCAGGTGTGCATGTGAGTGTGTGCCCTGCAACAGTCTGGACATCTGCTCAGGCCGGACCCT  
GCCTTCACCCAACACAGTAGCTGGGATAGGCTCCAGCAACCCTGTGACCCCGACGGGGTTCGTGGG  
GTCTGGGGATGGATGGATGGATGGATGGAGTTGATTTTTAGAAAAGTAGTAGAGGGCTCAAAGATCA  
CACCTGATCTCTGCTGTGGTACTTTAGTCTGGATACTCTGCCCTGCCTCTTCTGACAGATTTGGACC  
AGAACCTCCTCTAACAGGAGACTGTTGTGAGGCCCTCAGGGTTCTCAGGAGGTGATGGCTCTTAAC  
AGAAGCCCAGCTGTTCTCATGGCAGATTCAGTAGACGGTTTGCTTCTCCTTTCAGTCCCATCAGCTT  
CCTCTGACGCACAGGAGGAGTTTCTCAGCAGAGTTTCTCAGCAGCAGCAGCTGCTGCTGCTGAGCGT  
CTGTGCGACCTGCAGCCTCCTGCTGAAGCTCCACCCGCTCCGACAGCGCCTTCACCTGCTCCTTCTC  
CTCCAGCAGGGAGCGCTTCAGATGCTCAATGATGTAGTTCTTGTCTTCTCCAGTCGATCATATTTT  
AGCTGAAATCTGTAGGAGGATGTTAAAAAAAACATGTCTGAATATATACGTAACATTTAGGTTTCT  
TTACATTGATATGTTAAACTAAAAAAAAGGGAAAAGAATAACTCATTAAAAAGTCACAGTCTGTTT  
CATTGACTGTATCTAAGAACTGGACTGAGTGACGTCTCCAATGGTTTCTTCTGCCTTCAACCAAAT  
GAAGTCAATTCAGTTGAAATTGCTTTCAGATACAGACGTTGCCATGTTGGGGCCAGACCTCTTGAA  
TTAGCTATGAGTTAGTTGGAGTTGACGTTTCTATGGCAACCACTTTGGCCAATCAGGGGTGAGCTT  
ATTGGAAGCCCACACCCCTACCTCTTGAAGTGGGCTATACCAAATCTGTCAAACACTTTGAAGGTT  
GGAAGTGGGGGCCAACCATGACTGTATGTGAGA ACTGGACTGAGTGACTCCTCCCCCGGCGCTCC  
AAACAGGAAGTGGTTCCAAAACGCCAAAATCCCACAGACGTCTCATCTTCTATAGAGAACTACAG  
CTGTTCTCAGTCGTT CAGGAGAACCGTTCTGGATCTGATACCATCGTCCTGATAATTCTGTTTTTT  
CAGGATGTTTTCTCTGTAGTTCAAGTTAAAGTTATAAACTGACCAATCAGAGGCCTCAATATAAGT  
AGGGCAGCCTGGTGGCCCCCACACCAACGTTTAAAACAATTGACAGAGTTGGTTTAGCCTGCTT  
TCAAGTGGTAGGGGTGTGGCTTAACAAGCTCACTCCTAATTGGTGAGAATTGTTGCTATAGAAACA  
TTAACTCAGACAGACTCGGTCTGCTTAATTAAGCTTTTACCGATCAAACCTATCATGTATGTAAT  
CATTGTACATAACCAATAGGATGCTGTTGGGATAATAGACAGTAACGGTCCAGTATTTTATTTTT  
TGTCACCATATGAGCACATTATAATAGTTTGATTTGTATGATTTGTGTTTAGACTACGTTTATGT  
AAATGATGGTAAATAATAATAATAATGTATTAGGTGGACTACAAATATGGCGGCCAAGAGACTTC  
CTGCCGGTGACTTCCGGTCTCTCAGGCGTGTGGCTGATTCCAGCTAATGACGACACAAAAGGGGAGG  
AGCCTGAGCCCAGCGGGGATAAACAACTTCCGAGCGACTCGCTTCTCCGGTAGATGATGCTCAGC  
GGATGGCTGTCTGGCCTCATCGTTGGAGGATTTACCGAACTTTCTGCAACTTATCAGAAGGTATTC  
GCTTTGACCGGAAAGTCATACGAATTCTGAACCGGTAATAAGCCACAAATGTCTTTTTTATTTTTCT  
TACTTTGCTTTAGTTTTATTACCTTTCAAACACATAGTTGAAACATACCAGAAAAGGCAGCAGGAA  
CAGTTAAAATAGATTTACAAAGCAAAAAAAGAATAAGATATGCATTGGCTCTATAGGTTTTCTAT  
GACATTATCCAAGTCCTTATTATGTTATGTTGTTGGTTCATTTCTCCCATCTTTTTTGACAGGTTAT  
TAATATTTTACGTCTCGCTGGTCGCCTTTGTTTTGCAGCTAGAAATATGGGCAAACCTGGGAATCAG  
AGGCAGATGCATGAAGGATTTCTGGTCCTGTTCTCCTCATCTTCTCTATCTGATGGTTTAAACACCA  
TCAATTGTTAAAGTGATTCTGAAGGTTTTTATAATTTTTAGAAAGTTTGTTCATTTAATGTTATTAC  
ATGCTTACGTCTCCTCCGGCTGCAGTTTATCAAGCTGATTTCCGGGTTTGAACCCGTGACGCACATTT  
GAACACTTAAGATTTTCCAACGAGGAAACCAATGTCTTCAATGGTGAAGCGAACATGCGCAAATGG  
CATGCGCAGTGACACCTATTGCGGTAATAATCACAAAAAATAAAAGAGTAAAAAGTAAAGAAAGAA  
GGAGATCCCTGATTATTTAATTTTGGAAAGTCCTTTCATTTAATGTTGTGTTAATATTGGGGGCGTG  
GAAAACATTAGGACTTGGTTGTAAAGCGTGATTACTGTAGTATCTTTGTCAATTAAGTCTTAAATC  
TAAAAAATCTATGTCCTTTGACCTTCAAAGTTCTGTTCCCAACAAGAAATTAATGTCAATAGTCTT  
TATTGCTGACAGAAGTCCGCATTATAATCCCCTCTACCCATTAATAGATGAATCTGTAATCGGGACA  
TCATGCTTCTAAAAAATCAAATATAAGAAAAAAAAGGCTGAAGCTCCAATAGTGATGGAAAAAAA

TTCATCTCATCCACCAAAGAATGTTGCATTAGAATTCAGTGTAAGAATCGATGTTACAATGTTT  
 AAAACAGGCTAAACATGCATCGTCTAACGAATTATGCGAGAAAATGTCCGAAAATGAACACAAAAT  
 AATAATAATTA AAAAGATAGCTTTTAATAAGCAGACTGTAAGCTCTTTACAGCGAGTTCAACATGT  
 TTTTAGATTCACCTTTTTTAAACCTCATTTTGTGTCTCAGACATCGAACGCCTCACCTCTCCAAGGT  
 ATCGGTCAGAAATGTGATTTGAGGCAAAAATAAATCCTTTCTTTGTCCGCAGGCTTGGTTTGAACG  
 GCGGGAGTCACGTGACCCTCTTTCTTGGGTGTTTTATTGCTTTCTGTATGTATTTGCGCCGATTTTAT  
 TTGTCTTCTTTTTGGACATTTTAATTGATTA AAAAAAGTCACCGAAAGTTCTCAACGGACGACGAG  
 GACTAGGAGAACTTTGCGTTGCTAGGCAACGGCGCCTTCAGCGGCTCCTTGGAAGAGGAGTTTTTTT  
 TTTTCAAGAAA CAAGCGGACAGATAATCAACTTAATACATATATTTATTTTGAATTTTAAACGTTT  
 TTTAATAACATAATTGCCAATAAATAACTGAAGTTAAATCCATCACAAAAGGATATTTGGTTCTTT  
 TGAAATAGAGAAGCCCAACAAAACCTAAGGAGTTTTTGTGAGGTTGTAGAGCGCAGCAGGTGCATA  
 AACCTTTGGTCCACAGGAGCACTTTCGTCAAATCACGTAGCCTGTTTCATTTGATCCTGGTTACGCT  
 TTTAACCAGCAGCAGCAGCTTTAACGGACGGTCTTCATTTGAATTGACATGATAAAGAAAAAACAG  
 CAACGTGCATCCAAACTGTCCGCCTAAAGAGTAATCACTTTATTTGATTACTGTCTCGGTATAAGTT  
 ACATCTGGATTACTTCTCAGTTACTTTAAAACAACAGCAAAACAGTGACAGTTTCTGCAGAGCATT  
**TTTACCTTCAGACATCTGGATTTGAAGTTTTTTGTCTCATATTTTACTTTTTTTTTAATGTCT**  
**GTGAGGGGGGAGGAAGACTCCATCCCGCCACCAGATCCTGTACAAGTGACCCGCCTGACCCG**  
**ACCCCTCCGCGCCAAACCCGCTGAGCTCTCCGGTCTGACATGAGCAAGGAGAAGCAGGGCAG**  
**GCCGGTTCCGGAGGGCCCGGCTCCGGCTCCACAGCGGTCCCCCGGATGCCCAAGTGCTCCCGCT**  
**GCCGGAACCACGGCTTCGTGTCTCCGCTGAAAGGCCACAAGCGCTTCTGCCGCTGGAAGGACTG**  
**CCGCTGCGCCAAATGCAAGCTGATCGCGGAGCGCCAGAGAGTCATGGCGGCGCAGGTCAGCCGC**  
 CTTCCCGCCATTTCTCACCGAAACAAAAC

Rot: Codierende Region von *dmrt1a*

Hinterlegte Region: potentielle Heatshock-Elemente nach Sorger (1991)