

Molekulare und genetische Analyse komplexer Genome

Inaugural Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades im
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Carola Burgtorf
aus Mülheim/Ruhr

Berlin
1999

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Lehrach
2. Gutachter: Prof. Dr. Ferdinand Hucho

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2000

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	2
1. Einleitung	4
1.1. Modell Organismen	4
1.1.1. Der Zebrafisch	6
1.1.2. Der Medakafisch	9
1.1.3. Der Fugufisch	10
1.1.4. Lanzettfisch	11
1.2. Isolierung und Analyse von Genen	13
1.2.1. Mutagenese-Screen	13
1.2.2. Genetisches Kartieren	16
1.2.3. Physikalisches Kartieren	23
1.2.4. Sequenzanalyse	24
2. Material und Methoden	26
2.1. Materialien und Chemikalien	26
2.1.1. Chemikalien	26
2.1.2. Enzyme	26
2.1.3. Molekulargewichts-Standards	26
2.1.4. Oligonukleotide	26
2.1.5. Klonierungsvektoren	28
2.1.6. <i>E. coli</i> -Stämme, Zelllinien und Fische	29
2.2. Häufig verwendete Lösungen	30
2.3. Medien und Zellkultur	32
2.3.1. Bakterienmedien und Zellkultur	32
2.3.2. Zebrafisch Zellkultur	33
2.4. Experimentelle Methoden	33
2.4.1. Nukleinsäure-Extraktionsprotokolle	33
2.4.2. DNA Manipulationen	37
2.4.3. Subtraktive Klonierung	40
2.4.4. Klonierungsverfahren	43
2.4.5. Elektrophorese	45
2.4.6. Hybridisierungstechniken	46
2.4.7. PCR Techniken	49
2.4.8. Haploide Zebrafisch Embryos	50
2.5. Daten-Analyse	50
2.5.1. Sequenz-Analyse	50
2.5.2. Kopplungs-Analyse	51
3. Ergebnisse	52
3.1. Genetisches Kartieren im Zebrafisch	52
3.1.1. Identifikation polymorpher Zebrafischstämme	52
3.1.2. Testen der verschiedenen repetitiven Elemente auf ihre Tauglichkeit für IRS-PCR	53
3.1.3. Verteilung der 'mermaid' Elemente im Zebrafisch-Genom	54
3.1.4. Abschätzung der Häufigkeit der 'mermaid'-Elemente im Genom	54
3.1.5. Konstruktion der 'inter-mermaid'-Marker-Banken	55
3.1.6. Charakterisierung der 'inter-mermaid'-Marker-Banken	56
3.1.7. Identifikation polymorpher Klone in den Marker-Banken	58

3.1.8. Hybridisierung der polymorphen Klone auf Kartierungsfilter	59
3.1.9. Integration von genetischer, cytogenetischer und physikalischer Karte	62
3.1.10. Testen der Repräsentativen Differenz Analyse (RDA) als alternative Strategie	63
3.2. Genetisches Kartieren im Medakafisch	64
3.2.1. IRS-PCR-Strategie	64
3.2.2. Analyse mittels AFLP-Hybridisierung	69
3.3. Analyse eines Amphioxus Cosmids	71
3.3.1. Cosmidbank	71
3.3.2. Sequenzanalyse	71
3.3.3. Gen-Inhalt des Amphioxuscosmids MPMGc117B0533	72
3.3.4. Repetitive Elemente innerhalb des Amphioxuscosmids MPMGc117B0533	77
4. Diskussion	79
4.1. Wahl der Organismen	79
4.2. Genetische Kartierung im Zebrafisch	80
4.2.1. Wahl der 'Stämme' für das Kartierungs-Panel	80
4.2.2. IRS-PCR-Strategie	80
4.2.3. Identifikation polymorpher Klone in den Markerbanken	81
4.2.4. Kopplungsanalyse	82
4.2.5. Integration von genetischer und physikalischer Karte	83
4.2.6. Alternative Hybridisierungsstrategie - RDA	84
4.2.7. Abschließende Bewertung und Ausblick	85
4.3. Genetische Kartierung im Medaka	86
4.3.1. IRS-PCR im Medaka	86
4.3.2. Anwendung einer modifizierten AFLP-Strategie im Medaka	87
4.3.3. Abschließende Beurteilung und Ausblick	88
4.4. Analyse eines Amphioxus Cosmids	89
4.4.1. Bedeutung des Amphioxusgenoms für die Analyse des Vertebratengenoms	89
4.4.2. Basenzusammensetzung des Cosmids	90
4.4.3. Gengehalt des Amphioxuscosmids	91
4.4.4. Repetitive Elemente innerhalb des Amphioxuscosmids MPMGc117B0533	92
4.4.5. Kombination von EST-Projekt und genomischer Sequenzanalyse	92
5a Zusammenfassung	94
5b Summary	95
6. Danksagung	96
7. Literaturverzeichnis	97
8. Anhang	104
8.1 Sequenzvergleich von mermaid-Elementen aus dem Zebrafisch	104
8.2. Sequenzvergleich repetitiver Elemente des Medaka-Fisches	106
8.3. Verteilungsschlüssel für die Kartierungsfilter	107
8.4. Sequenzdaten einiger 'inter-mermaid'-Marker	108
8.5. Publikationsliste	125