

3. Ergebnisse

3.1. Genetisches Kartieren im Zebrafisch

3.1.1. Identifikation polymorpher Zebrafischstämme

Unabhängig davon, welche Marker und welche Strategien letztendlich für die Kartierung des Zebrafischgenoms zum Einsatz kommen sollten, war es die erste Aufgabe, diejenigen Zebrafischstämme zu identifizieren, die am verschiedensten sind. Diese sollten dann die Grundlage für eine Referenzkreuzung bilden, auf der dann möglichst viele genetische Marker kartieren werden können. Die schnellste Möglichkeit, eine begrenzte Anzahl von Tieren auf anonyme, genetische Polymorphismen zu testen, ist es, den Prozentsatz an polymorphen Banden in einer RAPD-PCR zu bestimmen. Es standen dazu DNAs von jeweils einem AB-, Tue-, und Wik- Fisch als 'Template' zur Verfügung.

Es wurden dazu die Primer ausgewählt, die unter den von (Johnson et al., 1994) veröffentlichten Bedingungen die meisten Banden produzierten, und die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. So konnten mit einer einzelnen PCR-Reaktion bereits 10-14 Loci getestet werden. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 dargestellt. Der Vergleich der einzelnen Stämme untereinander zeigt, daß zwischen den einzelnen untersuchten Fischen ein relativ hoher Grad an Polymorphismen detektiert werden konnte. Dabei lagen die Unterschiede zwischen dem AB- und Tue-, sowie dem AB- und Wik- Fisch etwa gleich hoch bei 56% bzw. 58%, während zwischen dem Wik- und dem Tue-Fisch nur 37% der Banden polymorph waren.

Primer	AB/Tue			AB/Wik			Wik/Tue		
	AB-spezif.	Tue-spezif.	gemeins. Banden	AB-spezif.	Wik-spezif.	gemeins. Banden	Tue-spezif.	Wik-spezif.	gemeins. Banden
1A	1	4	5	1	6	4	1	2	8
1B	3	3	3	3	3	4	1	3	5
6P	6	3	4	7	2	4	2	2	5
12H	5	3	5	4	1	4	3	0	5
18A	1	3	6	1	1	6	2	2	7
	ca. 58% polymorph			ca. 56% polymorph			ca. 37% polymorph		

Tab. 4.: RAPD-Vergleich drei verschiedener Zebrafischstämme

Die SJD- und die C32 Linien sind gynogenetischen Nachkommen, die aus der Darjeeling bzw. AB-Linie durch 'early-pressure' gewonnen wurde. Damit war das bereits vorhandene Kartierungs-Panel von haploiden Nachkommen von C32xSJD-Weibchen (Postlethwait et al., 1994), sowie das sogenannte 'heat shock'-Panel, das 66, durch Hitzeschock diploidisierte, Nachkommen von mehreren C32xSJD-Weibchen umfaßt (Johnson et al., 1996), eine gute Option, um darauf weitere Marker zu kartieren. Von beiden Kreuzungen wurden in Kollaboration mit S. Johnson kleine DNA-Aliquots erhalten. Da der Tue-'Stamm' die Grundlage für den bisher weltweit größten Vertebraten-Mutagenese-Screen bildete und die mutanten Fische gegen den Wik-'Stamm' ausgekreuzt werden sollten, wurden trotz der geringeren Polymorphismus-Rate Rückkreuzungen von (Wik x Tue)-Tieren sowohl gegen Tue- als auch gegen Wik-Fische angesetzt. Von diesen Panels wurden jeweils 46 Tiere untersucht. Außerdem wurden Aliqots von 40 Individuen, auf die allerdings bisher noch keine CA-

Mikrosatelliten-Marker kartiert worden sind, aus der ABxInd-Geschwisterkreuzung (Knapik et al., 1996) erhalten. In Zusammenarbeit mit M. Mullins wurde darüberhinaus ein weiteres, haploides Panel von Nachkommen eines ABxWik-Weibchen generiert. Von diesen Kreuzungen war das C32xSJD-'heatshock-Panel' das einzige, für das Rohdaten aus Karierungsexperimenten eines anderen Labors zur Verfügung standen, und damit war es innerhalb dieser Arbeit von besonderer Bedeutung für die Integration weiterer Marker in die bestehende Karte.

3.1.2. Testen der verschiedenen repetitiven Elemente auf ihre Tauglichkeit für IRS-PCR

Das Genom des Zebrafisch enthält eine Anzahl repetitiver Elemente. Für die Kartierung durch IRS-PCR können jedoch nur solche ausgenutzt werden, die in genügend großer Anzahl und ausschließlich verstreut im Genom vorkommen. Einen Überblick über die bereits bekannten Elemente gibt Tabelle 1 (Seite 20). Verschiedene, für einzelne Elemente spezifische Primer wurden getestet, ob sie in einer PCR-Reaktion die Amplifikation eines komplexen Produkts ermöglichen würden. Das Ergebnis ist in Abbildung 20 dargestellt. Mit den Primern MMA und Dana1, die an die zweite konstante Domäne des 'mermaid'-Elementes (Seite 21) binden, ließ sich, ebenso wie mit dem Primer MMB, der ebenfalls an die zweite konstante Domäne, jedoch in entgegengesetzter Richtung bindet, ein komplexes PCR-Produkt aus Zebrafisch-DNA amplifizieren. Dabei wurde allerdings in der Reaktion mit dem MMB-Primer, sowie in der Kombination von MMA- und MMB-Primer, neben einem kontinuierlichen Schmier auch eine deutlich sichtbare Bande amplifiziert. Die für die anderen repetitiven Elemente spezifischen Primer konnten aufgrund der geringen Kopienzahl erwartungsgemäß keine oder nur sehr wenige Banden amplifizieren. Für die IRS-PCR-Kartierungsversuche im Zebrafisch wurde daher das 'mermaid'-Element ausgenutzt und dabei hauptsächlich der MMA-Primer verwendet.

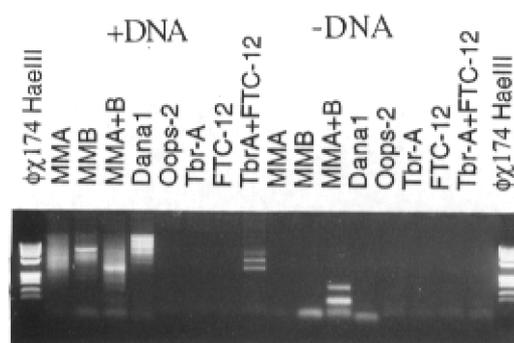


Abb. 20: IRS-PCR mit Primern, die spezifisch für verschiedene repetitive Elemente des Zebrafisch sind.

3.1.3. Verteilung der 'mermaid' Elemente im Zebrafisch-Genom

Ein weiteres Kriterium für die Verwendbarkeit von IRS-Elementen in Kartierungsprojekten ist ihre Verteilung im Genom. Um sicher zu stellen, daß die 'mermaid'-Elemente nicht ausschließlich in enger Nachbarschaft zu hochrepetitiver DNA, wie sie z.B. in Centromer und Telomer gefunden wird, auftreten, wurden Filter einer 'gegriddeten' Cosmid-Bank parallel, mit gesamt-DNA und mit komplexem IRS-PCR-Produkt hybridisiert. Durch Hybridisierung mit gesamt-DNA werden unter den gewählten Hybridisierungsbedingungen Klone, die hochrepetitive DNA enthalten, detektiert. Aus der Tatsache, daß nur wenige Klone mit beiden Proben positiv sind, kann man schließen, daß die 'mermaid'-Elemente relativ gleichmäßig im Genom verteilt sind. Außerdem erlaubt der Prozentsatz an positiven Klonen mit dem IRS-PCR-Produkt eine ungefähre Abschätzung darüber, wieviele 'mermaid'-Elemente genügend dicht zueinander liegen, um eine Amplifikation der zwischen ihnen liegenden DNA zu erlauben. Auf dem Filter geben knapp 4 % der Kolonien ein positives Hybridisierungssignal. Da 42500 Cosmide das Zebrafisch-Genom einmal repräsentieren, sollten sich somit mindestens 1700 verschiedene 'inter-mermaid'-PCR-Produkte amplifizieren lassen.

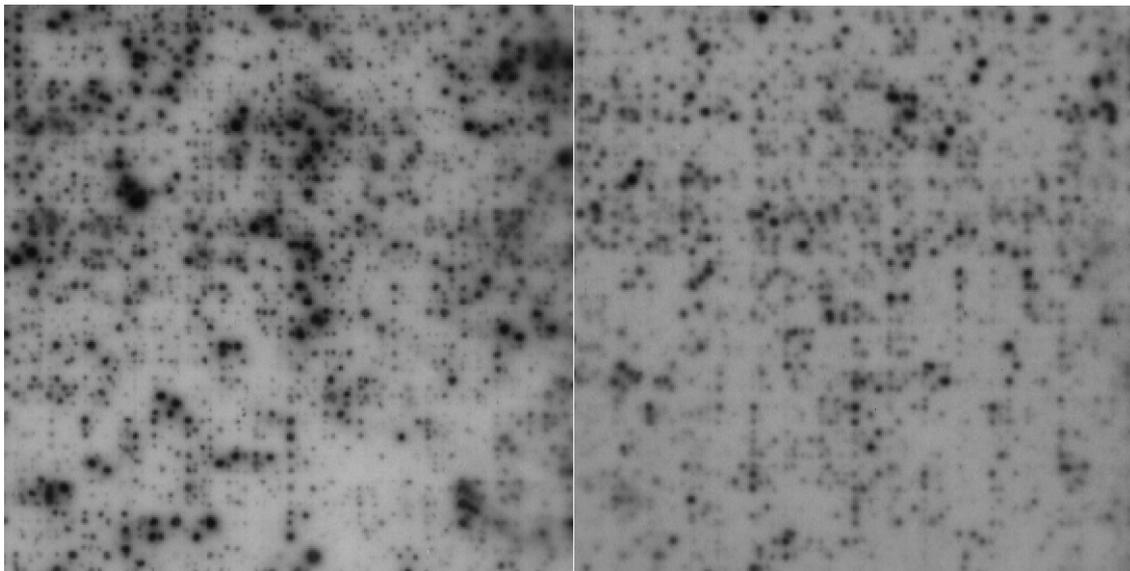


Abb. 21: Sich entsprechende Ausschnitte von Autoradiogrammen eines Cosmid-Filters. Links hybridisiert mit gesamt-Zebrafisch-DNA, rechts mit 'inter-mermaid'-PCR-Produkt.

3.1.4. Abschätzung der Häufigkeit der 'mermaid'-Elemente im Genom

Über die Häufigkeit der 'mermaid'- bzw. Dana-Elemente im Zebrafisch-Genom wurden äußerst widersprüchliche Angaben veröffentlicht (Tab. 1). Shimoda et al. (1996) bestimmten die Anzahl im Zebrafisch-Genom auf etwa 12.000 Kopien, während Izsvak et al. (1996) die Anzahl der mit den 'mermaid'-Elementen identischen Dana-Elementen auf 400.000 bestimmten. Diese Diskrepanz läßt sich nur teilweise mit unterschiedlichen Hybridisierungsproben erklären. Innerhalb dieser Arbeit war es jedoch von ausschlaggebender Bedeutung, wieviele Bindungsstellen für den MMA-Primer im Zebrafisch-Genom existieren. Um deren

Häufigkeit abzuschätzen, wurden Verdünnungsreihen genomischer DNA vom Zebrafisch neben Verdünnungsreihen von sequenzierten cDNAs, die ein 'mermaid'-Element enthielten, auf Nylonfilter aufgebracht und mit radioaktiv markiertem MMA-Primer hybridisiert. Gleichzeitig wurde auf diese Weise auch die Anzahl der 'mermaid'-Elemente in den Genomen von Medaka- und Fugufisch bestimmt.

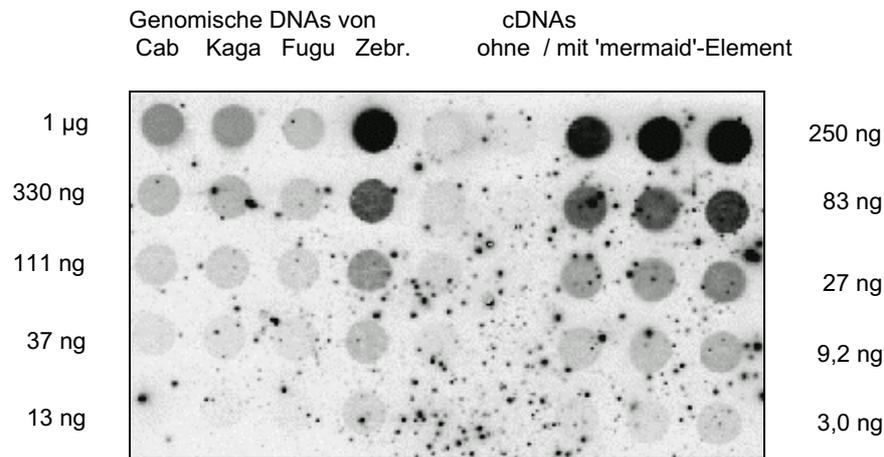


Abb. 22: Verdünnungsreihen von genomischer DNA aus Medaka (Cab- und Kaga-Stamm), Fugu und Zebrafisch neben Verdünnungsreihen von cDNAs bekannter Länge, die ein 'mermaid'-Element enthalten, hybridisiert mit radioaktiv markiertem MMA-Primer.

Im Zebrafisch entspricht das Hybridisierungssignal, das von 1000 ng genomischer DNA enthalten wird, in etwa dem von 250 ng cDNA. Die Genomgröße des Zebrafisches ist $1,7 \times 10^9$ bp und die Länge des cDNA Klons ist 8 kb (Insert + Vektor). Durch Sequenzierung ist bekannt, daß in dem cDNA Klon ein 'mermaid'-Element enthalten ist. Damit ergibt sich für das Zebrafisch-Genom nach:

$$x = \frac{250 \text{ ng}}{1000 \text{ ng}} \cdot \frac{1,7 \cdot 10^9 \text{ bp}}{8000 \text{ bp}} \approx 53.000$$

eine Anzahl von etwa 53.000 'mermaid'-Elementen bzw. Bindungsstellen für den MMA-Primer.

Beim Medakafisch entspricht das Hybridisierungssignal, welches von 1000 ng genomischer DNA enthalten wird, in etwa dem von 27 ng cDNA. Da das Medaka-Genom eine Größe von etwa 10^9 bp hat, ergibt sich für das Medaka-Genom analog eine Anzahl von etwa 3375 'mermaid'-Elementen. Das Fugu-Genom enthält ebenfalls 'mermaid'-Elemente, allerdings eine um den Faktor 6 geringere Anzahl als das Medaka-Genom.

3.1.5. Konstruktion der 'inter-mermaid'-Marker-Banken

Für die Konstruktion der 'inter-mermaid'-Marker-Banken wurden die PCR-Reaktionen mit einem Primer durchgeführt, der an seinem 5' Ende durch eine (CUA)₄-Wiederholung verlängert war. Nach Uracil-Gycolase-Behandlung der PCR-Produkte wird dadurch effizientes, ungerichtetes Klonieren in den pAMP10-

Vektor ermöglicht. Das komplexe PCR-Produkt umfaßte einen kontinuierlichen Schmier von etwa 2 kb bis 200 bp, der mit dem MMA-PCR-Produkt (Abb. 20) vergleichbar war. Von allen zur Verfügung stehenden Zebrafisch-'Stämmen' (Wik, Tue, Ind, AB, SJD) wurde getrennt eine Marker-Bank angelegt und ca. 6000 primäre Klone ausplatiert, von denen jeweils 3072 in Mikrotiter-Platten gepickt wurden. Darüber hinaus wurde getestet, ob es möglich wäre, polymorphe Marker in einer subtraktiven Marker-Bank anzureichern. Dazu wurde ein Tester-Amplikon von Tue-DNA mit dem MMA-CUA-Primer hergestellt. Das 'Driver'-Amplikon, das bei der anschließenden Hybridisierung im Überschuß eingesetzt wurde, wurde von Wik-DNA mit einem biotinylierten Primer erstellt. Diese Bank wird im nachfolgenden als 'arielle' (ari) bezeichnet.

3.1.6. Charakterisierung der 'inter-mermaid'-Marker-Banken

Insertgröße

Im Laufe dieser Arbeit wurden die Inserts der gesamten Marker-Banken durch PCR amplifiziert und mehr als 3000 PCR-Produkte auf Agarose-Gelen analysiert. Dabei lag die Mehrzahl der Inserts innerhalb des Φ X174 *Hae*III-Größenstandards, wobei die durchschnittliche Insertgröße bei etwa 500 bp lag. Dies entspricht den Erwartungen, wenn ein komplexes PCR-Produkt mit einer Größe von 200 bp - 2 kb kloniert wird.

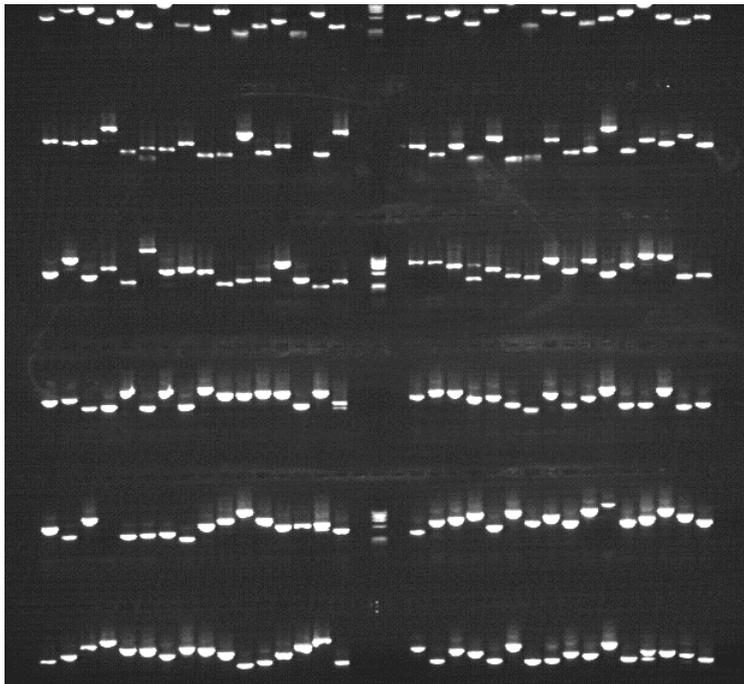


Abb. 23: PCR-Amplifikation von Inserts aus 'inter-mermaid'-Klonen.

Rückhybridisierung

Durch Hybridisierung einer Anzahl zufällig ausgewählter, individueller Klone auf die Markerbank läßt sich deren Komplexität nach folgender Formel abschätzen:

$$\frac{n}{m} \cdot \sum_{i=1}^m m_i^{-1}$$

Dabei ist n die Anzahl der Klone in der Bank, m die Anzahl der durchgeführten Hybridisierungsexperimente und m_i die Anzahl an positiven Klonen, die im Hybridisierungsexperiment i identifiziert wurden. Nach acht Hybridisierungen wurde auf diese Weise die Komplexität auf knapp 3000 Klone geschätzt; nach 22 Hybridisierungen auf knapp 1800 und nach über 40 Hybridisierungen auf etwa 1600. Damit kann man davon ausgehen, daß in allen Markerbanken zusammen ca. 1600 verschiedene Klone enthalten sind.

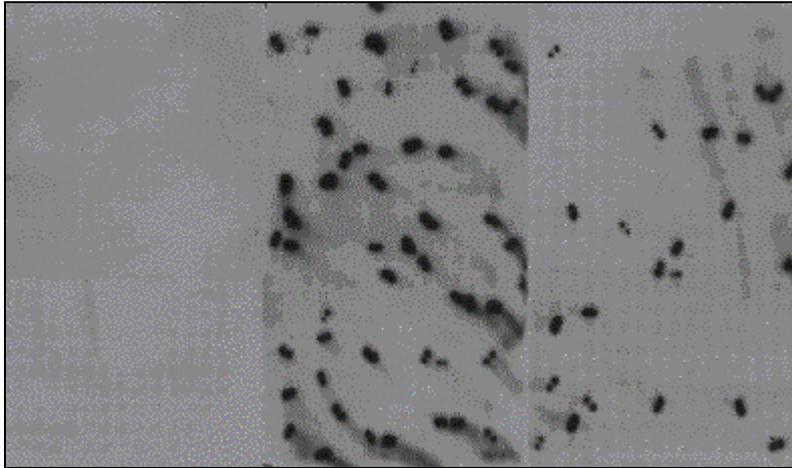


Abb. 24: Rückhybridisierung eines 'inter-mermaid'-Klons auf Koloniefilter der 'inter-mermaid'-Bank.

'Oligo-fingerprinting'

Ähnliche Informationen, wie sie durch eine Serie von Rückhybridisierungen gewonnen werden können, kann man auch durch 'Oligo-fingerprinting' der gesamten Marker-Banken erhalten. Dabei werden die Inserts aller Klone individuell durch PCR amplifiziert, um sie von der DNA der Wirtsbakterien und dem Vektor zu trennen. Die PCR-Produkte werden auf Nylonmembranen 'gespottet' und dann nacheinander mit einer Serie ^{33}P -endmarkierter Oligonukleotide hybridisiert. Es handelt sich dabei um 10mere, die ein Zentrum von 8 definierten Basen haben und an beiden Enden um jeweils eine degenerierte Basen verlängert sind, die zur Stabilisierung des Hybridisierungsproduktes dient. Nach einer Serie von 100 Hybridisierungen wurden die digitalisierten Autoradiogramme ausgewertet und die Klone in 'Cluster' mit gleichem bzw. sehr ähnlichem Hybridisierungsmuster geordnet. Dabei ließen sich 5682 von insgesamt 15360 Klonen nicht in 'Clustern' zusammenfassen und bilden sogenannte 'Singletons'. Fünfhundertvierundfünfzig 'Cluster' umfassen lediglich 2 Klone, und 170 bestehen aus 3 Klonen. Das größte 'Cluster' umfaßt 305 Klone. Insgesamt konnten 1312 'Cluster' mit einer Größe von 2-310 Klonen gebildet werden. Das Ergebnis des 'Clustering' ist zusammenfassend in Abbildung 25 dargestellt. Die Summierung der Anzahl der 'Cluster' und der Anzahl der 'Singletons' legt den Schluß nahe, daß mehr als 6800 verschiedene Klone in den Markerbanken enthalten sind. Dabei muß man allerdings beachten, daß das Clustering mit der begrenzten Anzahl an Datensätzen noch nicht vollständig ist, und

man davon ausgehen kann, daß sich eine große Anzahl der 'Singletons' bei weiterer Analyse durch 'Oligo-fingerprinting' einem der 'Cluster' zuordnen ließen, sowie einige der noch getrennten 'Cluster' zu einem zusammengefaßt werden könnten.

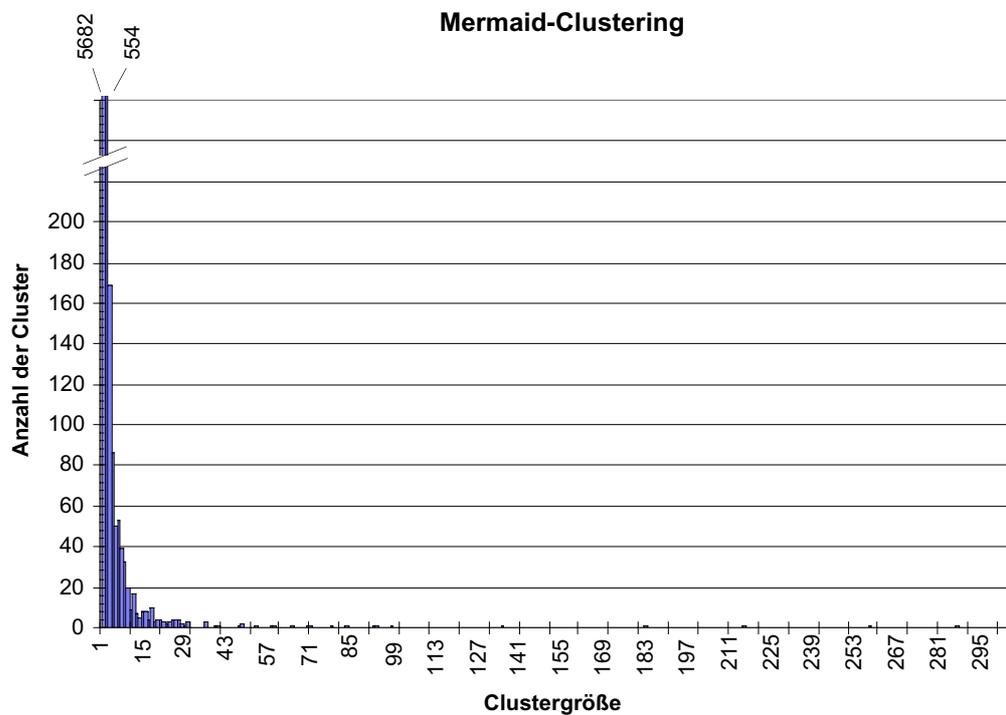


Abb. 25: Ergebnis der 'Oligo-fingerprinting'-Analyse der MMA-Marker-Banken.

3.1.7. Identifikation polymorpher Klone in den Marker-Banken

Zunächst wurden etwa 1000 zufällig ausgewählte Klone auf kleine Southern Blots, die 'inter-mermaid'-PCR-Produkte verschiedener Zebrafisch-Stämme enthielten, hybridisiert. Dabei waren vor allem solche Klone von Interesse, die ein starkes Hybridisierungssignal in einigen der Stämme zeigten, in den anderen aber keins oder ein wesentlich schwächeres, und damit einen +/- -Polymorphismus aufwiesen. Abbildung 26 zeigt ein Beispiel für eine Hybridisierung, die in allen vier analysierten 'Stämmen' (AB, Tue, Wik, SJD) ein starkes Signal ergibt, aber auch Beispiele für Proben, die nur auf einem, auf zweien oder auf dreien der 'Stämme' ein Signal ergeben. Schon bei diesen Voruntersuchungen fiel auf, daß die Stärke des Hybridisierungssignals mit einem Klon zwischen den einzelnen 'Stämmen' extrem variiert. Der Vergleich von direkt klonierten 'inter-mermaid'-Produkten und der subtraktiven 'arielle'-Bank ließ keine deutliche Anreicherung von polymorphen Klonen erkennen. Von hundert Hybridisierungen waren mit Proben, die aus der direkt klonierten Markerbank kamen, 22,5 polymorph, während von der subtraktiv klonierten nur unwesentlich mehr, nämlich 25% der Klone einen +/- -Polymorphismus aufwiesen.

Von 800 zufällig ausgewählten Klonen, die der aus DNA des AB-'Stammes' konstruierten Markerbank entstammten, wiesen 180 Klone eine Polymorphismus auf. Fünfundachtzig (10,6%) waren zwischen den Stämmen AB und Tue polymorph. Zwischen Wik und Tue zeigten 67 (8,4%) und zwischen AB und SJD 139

(17,4%) einen +/- -Polymorphismus. Allerdings waren später 2/3 der zuvor als polymorph identifizierten Marker auf keiner der untersuchten Referenzkreuzungen informativ.

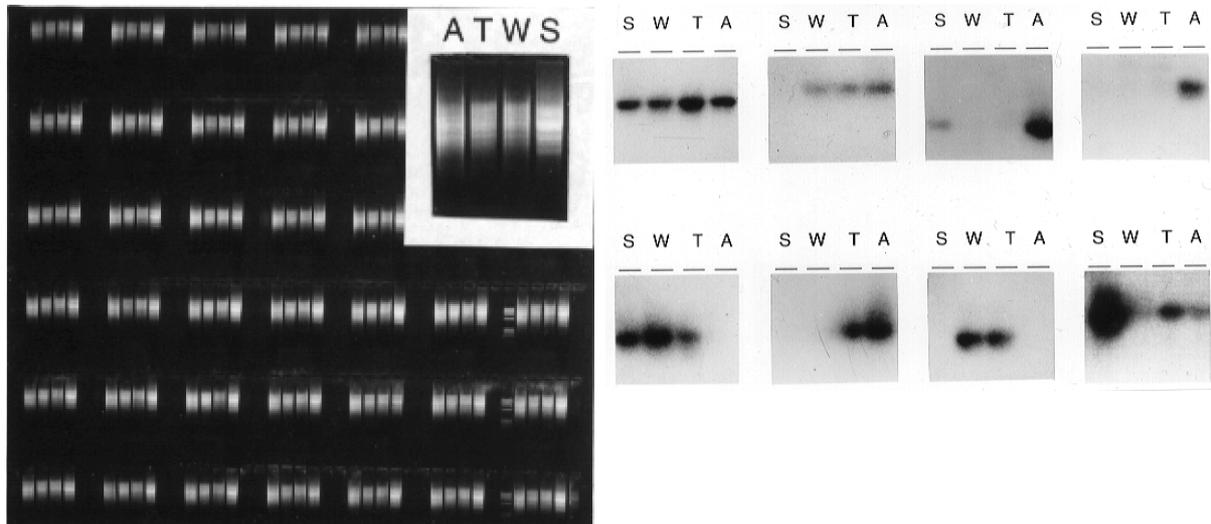


Abb. 26: Links: Agarose-Gel mit interMM-PCR von vier verschiedenen Zebrafisch-Stämmen (A=AB, T=Tue, W=Wik, S=SJD). Rechts: Hybridisierung von Southernblots des linken Gels mit Inserts verschiedener 'inter-mermaid'-Klonen.

3.1.8. Hybridisierung der polymorphen Klone auf Kartierungsfiler

Kartierungsfiler wurden erstellt, indem IRS-PCR-Produkte von den einzelnen Tieren der verschiedenen Referenz-Kreuzungen auf Nylon-Membranen 'aufgespottet' wurden. Auf einer Filtergröße, die einer Mikrotiterplatte entspricht, können dabei 384 verschiedene PCR-Produkte aufgebracht werden. Diese werden

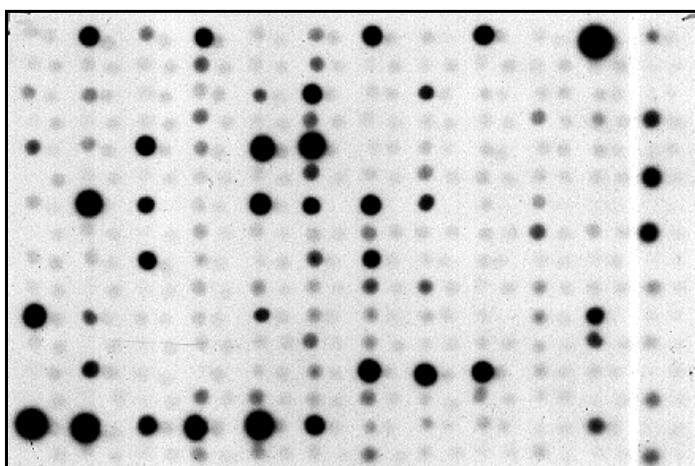


Abb. 27: Beispiel einer Hybridisierung eines Markers auf einen Kartierungsfilter. Etwa die Hälfte der Individuen der haploiden C32 x SJD Kreuzung sind positiv. Die anderen Kreuzungen sind nicht auswertbar.

mit Hilfe einer 96-Nadel Dispensiervorrichtung jeweils 4 mal, versetzt zueinander aufpipettiert. In den ersten Quadranten (Position A1, A3 ... C1, C3... usw.) des 384er Feldes wurden die PCR-Produkte der Tue x Wik-Kreuzung gespottet; in den zweiten (A2, A4, ...) die Produkte des C32 x SJD-Heatshock-Panels, in den dritten (B1, B3, ...) die der AB x Ind -Geschwisterkreuzung und in den vierten Quadranten die des haploiden C32 x SJD-Panels. Ein Verteilungsschlüssel für die Belegung der einzelnen Positionen befindet sich im Anhang dieser Arbeit (Seite 107).

Die in den Testhybridisierungen als polymorph identifizierten, sowie einige, durch 'Clustering' als potentiell polymorph eingestuft Klone, wurden auf diese Kartierungsfilter hybridisiert. Insgesamt waren die Hybridisierungssignale von etwa 80 der so hybridisierten Marker auf dem Panel, das aus haploiden Nachkommen eines SJDxC32-Weibchens besteht, auswertbar. Auf den anderen Kreuzungen waren es deutlich weniger. Die Segregationsmuster der einzelnen Marker wurden zweimal manuell in die Windows-Version von MapmanagerXPb09 (Manly, 1993), eingegeben und miteinander verglichen. Positionen, die sich nicht eindeutig als positiv oder negativ zuordnen ließen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Insgesamt wurden von 1277 der 8352 Positionen als nicht auswertbar eingestuft; 3616 wurden als positiv und 3459 als negativ eingeordnet.

In Abbildung 28 ist die mit Mapmanager durchgeführte Kopplungsanalyse, die alle 96 Nachkommen einbezieht, dargestellt. Insgesamt blieben bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,0001$ acht Marker ungekoppelt. Die Länge dieser so gewonnen genetischen Karte mit 12 Kopplungsgruppen beträgt rund 1400 cMorgan. Bei der Analyse der Segregationsmuster fiel allerdings auf, daß vierundreißig der sechsundneunzig analysierten Nachkommen fast immer entweder positiv oder negativ bei allen analysierten Markern waren. Dadurch wurden Loci künstlich gekoppelt. In einer zweiten Kopplungsanalyse wurden diese 34 Nachkommen daher von der Analyse ausgeschlossen. Selbst mit der erhöhten Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,001$ blieben dann dreiunddreißig Marker ungekoppelt. Die Größe der sich so ergebenden genetischen Karte beträgt mindestens 2188,7 cM, wobei 538,7 cM auf 11 Kopplungsgruppen entfallen und 1650 cM für die ungekoppelten Marker addiert werden. Das Ergebnis der so bereinigten Kopplungsanalyse ist in Abb. 29 dargestellt.

Eine Tabelle mit Sequenzinformationen, sowie der Zuordnung zu einem Cluster bzw. zu einer Kopplungsgruppe einiger Marker befindet sich im Anhang dieser Arbeit (ab Seite 108).

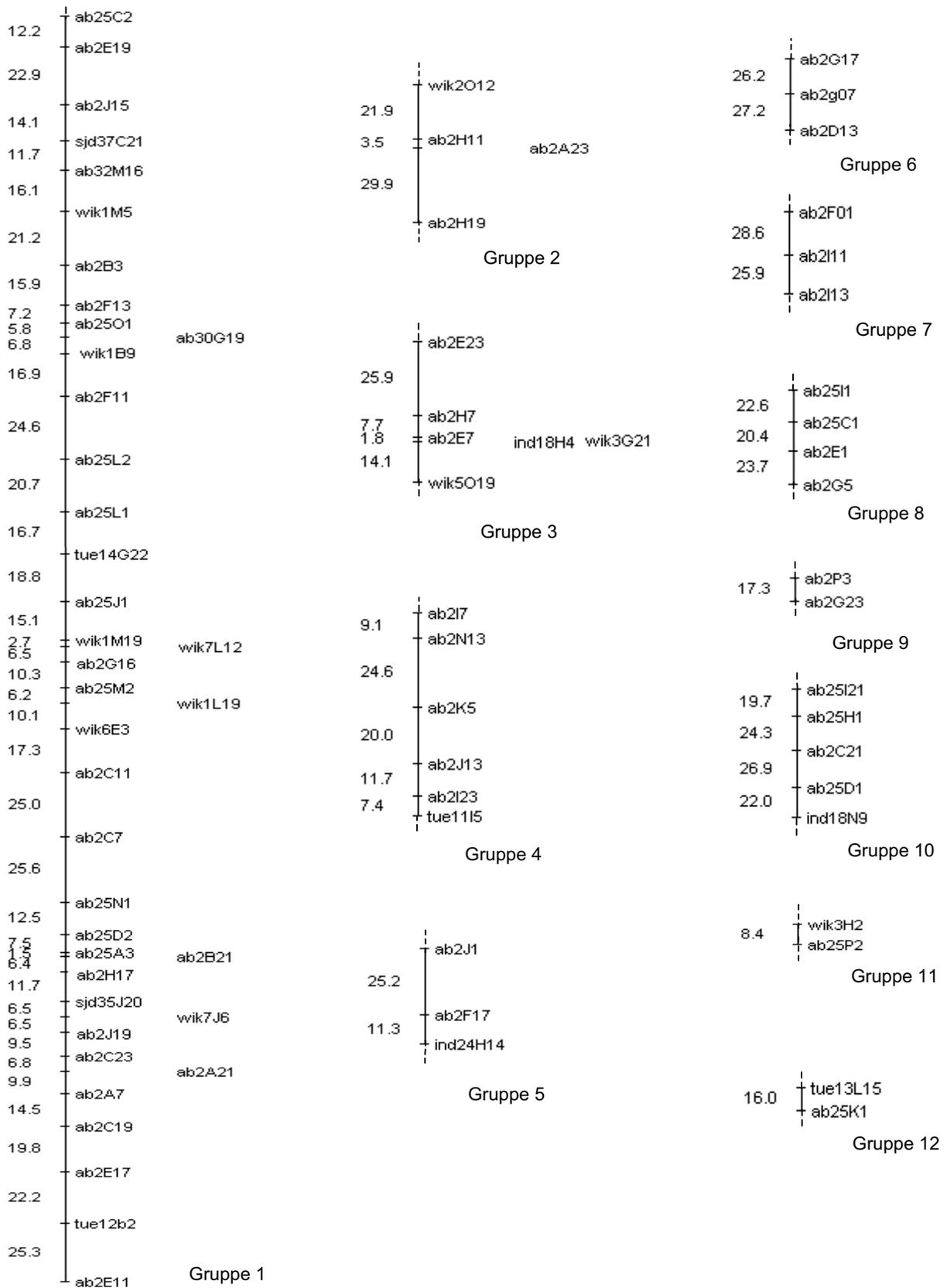


Abb. 28: Ergebnisse der Kopplungsanalyse auf 96 haploiden Nachkommen von (C32 x SJD)-Weibchen.

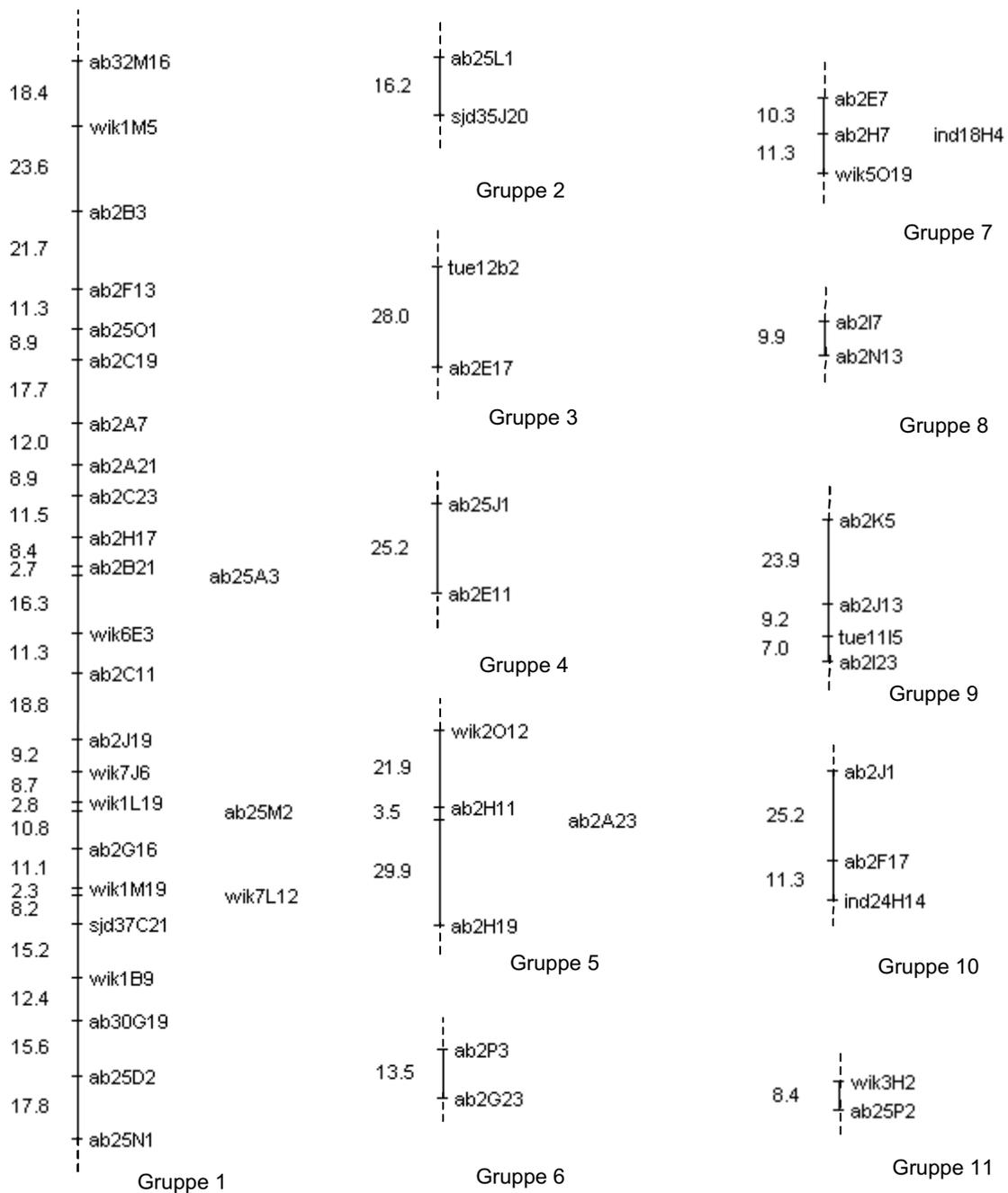


Abb. 29: Ergebnisse der Kopplungsanalyse mit 62 haploiden Nachkommen von (C32 x SJD)-Weibchen.

3.1.9. Integration von genetischer, cytogenetischer und physikalischer Karte

Gleichzeitig mit der Hybridisierung auf die Nachkommen der Kreuzungen wurden die IRS-Marker auch auf Filter, die 'inter-mermaid'-Produkt dreidimensionaler PAC-Pools, somatischer Zellhybride und Irradiationshybride enthielten, hybridisiert. Die PAC-Pools wurden aus den ersten 48 Platten der Bank erstellt,

die etwa eine einfache Repräsentation des Zebrafisch Genoms darstellen. Die Platten mit jeweils den geraden und den ungeraden Nummern wurden nebeneinander gestellt, und dann Pools von jeweils 2 Platten, bzw. den Zeilen und den Spalten generiert. Die Filter wurden analog zu den Filtern für das genetische Kartieren hergestellt, mit der Ausnahme, daß aufgrund der geringeren Komplexität nur jeweils 0,5 µl der PCR-Produkte aufgetragen wurden. Nur wenige der Marker waren sowohl auf den genetischen als auch den physikalischen Kartierungsfiltren informativ. In der Regel waren nur solche Marker auf den Filtern mit PAC-Pools und Zelllinien informativ, die ein starkes Hybridisierungssignal in allen getesteten Zebrafisch-'Stämmen' ergaben, und sich somit nicht genetisch kartieren ließen. Abb. 30 zeigt ein Beispiel eines Markers, der sowohl auf den PAC-Pools, den somatischen Zellhybriden und den Irradiationshybriden Signale ergab.

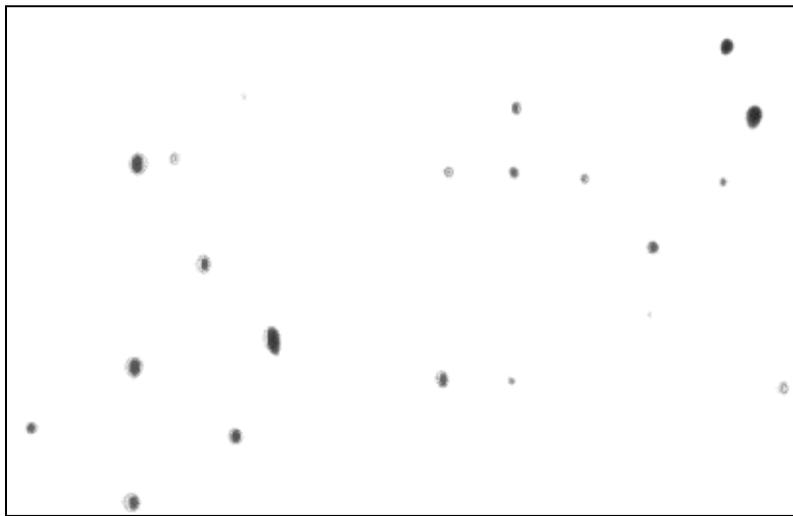


Abb. 30: Hybridisierung auf eines IRS-Markers auf einen Filter mit IRS-PCR-Produkten mit PAC-Pools, somatischen Zellhybriden und Irradiationshybriden.

3.1.10. Testen der Repräsentativen Differenz Analyse (RDA) als alternative Strategie

Zu Beginn dieser Arbeit wurde eine Methode getestet, die ohne Sequenzinformation über das Zebrafischgenom anwendbar ist: DNAs zwei verschiedener 'Stämme' werden mit *Bgl*II geschnitten, nicht phosphorylierte Adapter ligiert und mittels PCR amplifiziert. Dabei entstehen Amplikons mit Fragmenten, von rund 200-1200 bp. Das Tester-Amplikon wird mit neuen Adaptern versehen und dann mit dem 'Driver'-Amplikon im Verhältnis von 1:100 gemischt, geschmolzen und bei einer Konzentration von 10 µg/µl für 20 Stunden hybridisiert. Nach der Hybridisierung werden die Enden aufgefüllt, und die Restriktionsfragmente, die spezifisch für die Tester-Fraktion sind, durch PCR amplifiziert. Um den Erfolg des Experimentes überprüfen zu können, wurde zu Beginn des Experimentes der Tue-Tester mit Lambda-DNA kontaminiert. Dabei wurden 50 pg λ-DNA mit 2 µg genomischer DNA gemischt. Das entspricht etwa einer Kontamination mit einem 'single copy'-Fragment. Nach drei subtraktiven Runden war das resultierende Differenz-Produkt wenig komplex und bestand nur noch aus wenigen Banden; die Hybridisierung des Southern-Blots mit Lambda-DNA zeigte, daß das 670 bp λ-Fragment, das nach Restriktion mit *Bgl*II entsteht, bereits nach einer Runde deutlich angereichert werden konnte und nach der 3. Runde die dominierende Bande war. Das Subtraktionsprodukt der dritten Runde

wurde kloniert, und > 90% der untersuchten Klone enthielten das λ -Fragment. Da die restlichen analysierten Klone keinen +/- -Polymorphismus auf Amplikons der beiden Stämme aufwiesen, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

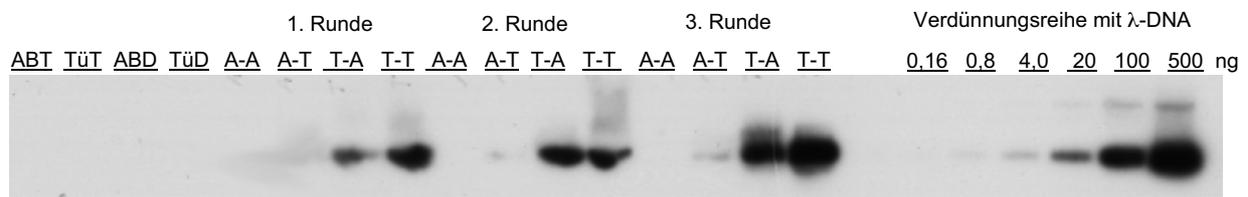


Abb. 31: Southern-Blot von RDA mit *Bgl*II-Amplikons, der mit dem 670 bp *Bgl*II-Fragment von λ hybridisiert wurde. ABT: AB-Tester; TüT: Tü-Tester, ABD: AB-Driver, TüD: Tü-Driver, A-T: AB-Tester mit Tü-Driver; A-A: AB-Tester mit AB-Driver; T-A: Tü-Tester mit AB-Driver; T-T: Tü-Tester mit Tü-Driver. Der Tü-Tester wurde mit λ -DNA kontaminiert.

3.2. Genetisches Kartieren im Medakafisch

3.2.1. IRS-PCR-Strategie

Vorüberlegungen

Zunächst wurde getestet, ob die gleiche Strategie, die beim Zebrafisch verwendet wurde, nämlich 'intermermaid'-PCR, auch bei Medakafisch funktionieren würde. Im Medakafisch wurde die Anzahl der 'mermaid'-Elemente mit 3375 bestimmt (Abb. 22, Seite 55), was bei gleichmäßiger Verteilung in dem etwa 10^9 bp großen Genom bedeutet, daß 11-12 'mermaid'-Elemente jeweils genügend dicht und in der richtigen Orientierung zueinander liegen, um eine Amplifikation der dazwischen liegenden DNA durch PCR zu erlauben.

In Abbildung 32 sind bei Verwendung lediglich des MMA-Primers bei der PCR mit Medaka-DNA von zwei verschiedenen Stämmen auch nur etwa 8-10 Banden sichtbar. Es wurde daher in 'Genebank' nach weiteren, eingestreuten 'repeat'-Elementen gesucht, und verschiedene Primerkombinationen, die eine Amplifikation von wenigstens mehreren hundert IRS-PCR-Produkten ermöglichen sollten, wurden ausprobiert. Die Elemente OLR1 (Naruse et al., 1992) und OLR2 (Uchiyama et al, 1996) sind in jeweils knapp 5000 Kopien im Medaka-Genom enthalten (Tabelle 2, Seite 18), was in einer Kombination von drei verschiedenen Primern die Amplifikation von etwa 170 verschiedenen IRS-PCR-Produkten ermöglichen sollte. In Abbildung 32 ist dies in der Entstehung eines kontinuierlichen Schmiere bei der gleichzeitigen Verwendung der Primer MMA, OLrep1 und OLrep2 sichtbar. Im Vergleich der PCR-Produkte von jeweils zwei Individuen des Cab-Stammes, der aus der südlichen Population entstammt, und des Kaga-Stammes, der aus der nördlichen Population isoliert wurde, wird außerdem bereits der große Unterschied zwischen den beiden Stämmen deutlich, sowie eine relativ große Homogenität innerhalb der beiden Stämme, die sich in sehr ähnlichen Bandenmustern zeigt.