

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.

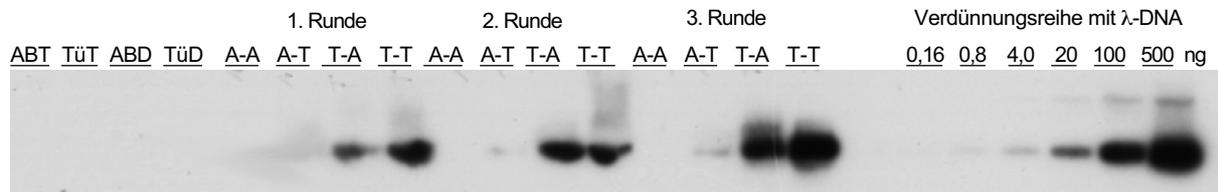


Abb. 31: Southern-Blot von RDA mit *BglII*-Amplikons, der mit dem 670 bp *BglII*-Fragment von λ hybridisiert wurde. ABT: AB-Tester; Tüt: Tü-Tester, ABD: AB-Driver, TüD: Tü-Driver, A-T: AB-Tester mit Tü-Driver; A-A: AB-Tester mit AB-Driver; T-A: Tü-Tester mit AB-Driver; T-T: Tü-Tester mit Tü-Driver. Der 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 'inter-mermaid'-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.

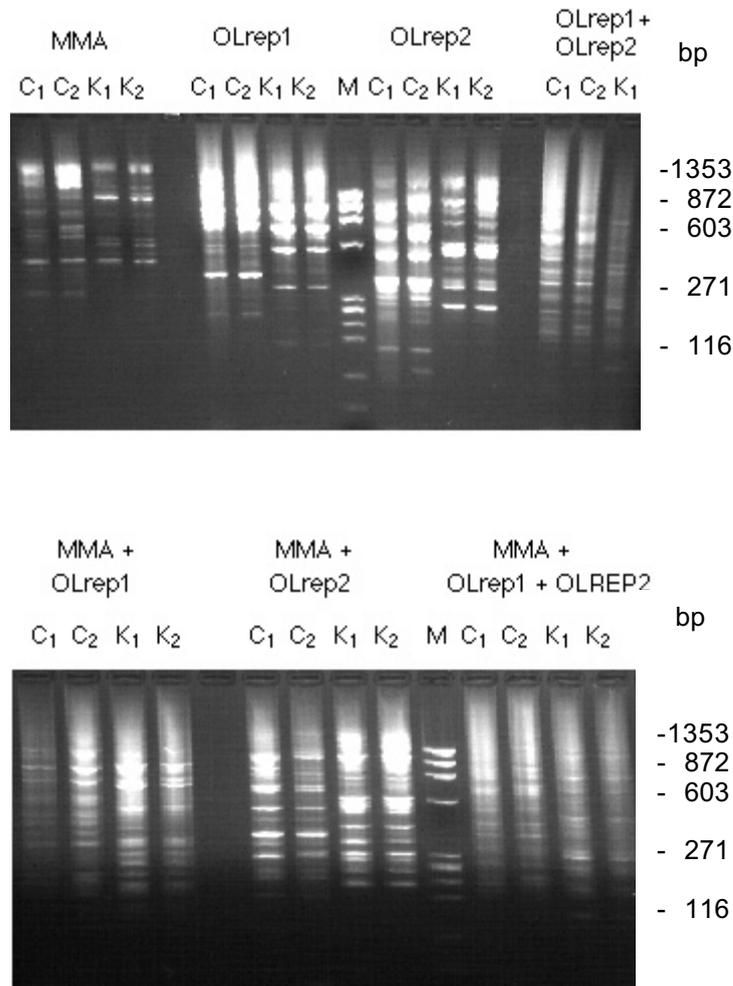


Abb. 32: IRS-PCR mit verschiedenen Primerkombinationen, die spezifisch für verschiedene repetitive Elemente des Medakagenoms sind. C₁ und C₂: Individuen aus dem Cab-Stamm; K₁ und K₂: Vertreter des Kaga-Stamms.

Konstruktion und Charakterisierung der Markerbanken und Referenzkreuzungen

Analog zum Zebrafisch wurden auch hier Markerbanken durch ungerichtete Klonierung der IRS-PCR-Produkte mittels des pAMP10-Systems konstruiert. Grundlage hierfür bildete allerdings DNA der Stämme AA2 und HNI, die ebenfalls aus der südlichen bzw. nördlichen Population entstammen. Von diesen beiden Stämmen war bereits ein Rückkreuzungspanel von etwa 250 Tieren generiert worden, von dem in Kollaboration mit Hiroshi Mitani und Aki Shima (Tokyo) kleine DNA-Aliquots und von 39 Tieren Kartierungsdaten zur Verfügung gestellt wurden. In der Rückkreuzung wurde ein AA2-Weibchen gegen ein herterozygotes (HNIxAA2)-Männchen zurück gekreuzt. Da somit nur HNI positive +/- -Polymorphismen durch Hybridisierung kartiert werden konnten, wurden rund 3000 Klone des HNI-IRS-PCR-Produktes und lediglich 1500 Klone, die aus dem AA2-Stamm generiert wurden, gepickt. Angesichts der erwarteten 170-200 verschiedenen IRS-PCR-Produkte pro Stamm ist dies immer noch mehr als ausreichend. Die Charakterisierung der Markerbanken durch Rückhybridisierung von 20 Klonen ergab dann auch zwischen 3 und 50 Positiven pro Hybridisierung, wobei der Durchschnitt bei 27 lag.

Da die beiden Stämme AA2 und HNI aus ungeklärten Gründen in Europa nur sehr schlecht gehalten werden können, bildete der Cab-Stamm die Grundlage für den Mutagenesecscreen in J. Wittbrodts Labor in Heidelberg. Als mutant identifizierte Fische wurden gegen den Kaga-Stamm ausgekreuzt. Daher wurde außerdem eine weitere Referenzkreuzung, und zwar eine Geschwisterkreuzung von (Cab x Kaga)-Fischen angesetzt, von der 192 Nachkommen analysiert wurden.

Ebenfalls analog zum Zebrafisch wurde der Anteil an polymorphen Markern auf kleinen Southernblots bestimmt. Auf Filtern mit IRS-PCR-Produkten von AA2 und HNI-Fischen, die mit den Primern MMA, Olrep1 und Olrep2 hergestellt wurden, zeigte etwa ein Drittel der als Hybridisierungsprobe eingesetzten Klone einen +/- -Polymorphismus. Das würde bei vollständiger Ausbeutung der Markerbank in 50 - 60 IRS-Markern resultieren. Bei Hybridisierung auf Southernblots von IRS-PCR-Produkt von Tieren der Cab- und Kaga-Stämme lag die Rate an polymorphen Klonen ähnlich hoch. Beispiele von Hybridisierungen auf Southernblots von IRS-PCR-Produkt von jeweils zwei Individuen der verschiedenen Stämme sind in Abbildung 33 dargestellt.

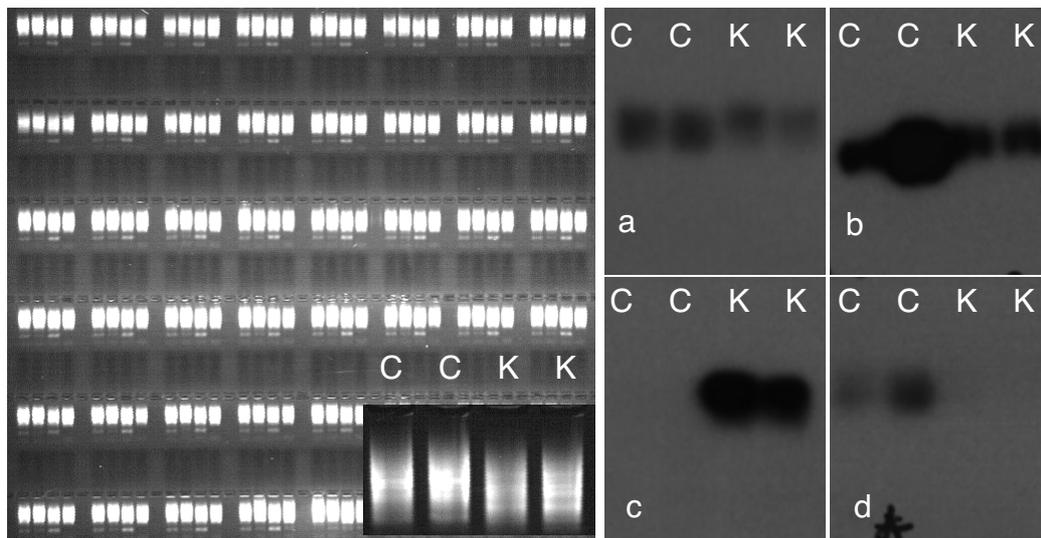


Abb. 33: links: IRS-PCR-Produkte von jeweils 2 Individuen des Cab- und des Kaga-Stammes wurden auf einem 1,4% Agarose-Gel aufgetrennt; rechts: Analyse klonierter IRS-PCR-Produkte auf 'Southern-Blots' des links dargestellten Gels.

Bei der Analyse der Markerklone fiel auf, daß Klone, die in einem der Tiere eines Stammes 'positiv' waren, dies immer auch in dem anderen waren, aber auch, daß innerhalb eines Stammes Intensitätsunterschiede vorkommen können, was zeigt, daß die Medaka-Stämme im Gegensatz zu den Zebrafisch-Stämmen sehr viel homogener sind, aber doch leichte Variationen beinhalten.

Kartierung der polymorphen Klone auf die AA2 x (AA2xHNI) Referenzkreuzung

Die zuvor durch Southernblot-Hybridisierung als polymorph identifizierten Marker wurden auf Kartierungsfilter hybridisiert und die Segregationsmuster in Mapmanager eingegeben. Hier lieferten immerhin 50% der zuvor als polymorph identifizierten Marker ein auswertbares Segregationsmuster. Die restlichen 50% zeigten Intensitätsabstufungen, die nicht, oder nur sehr schwer auszuwerten waren und daher nicht weiter verfolgt wurden oder stellten Hybridisierungen von Klonen mit offensichtlich identischer Sequenz dar.

Da auf dem Rückkreuzungspanel bereits rund 500, hauptsächlich RAPD-Marker kartiert worden waren, war es möglich, 10 von 13 der auswertbaren Marker einer der 29 Kopplungsgruppen zuzuordnen. Durch Marker, die in beiden Referenzkreuzungen auswertbar sind, ist es darüber hinaus möglich, in dem bislang uncharakterisierten Rückkreuzungspanel einige Ankerpunkte auf einer Kopplungsgruppe zu schaffen. Abbildung 34 zeigt ein Beispiel einer Hybridisierung eines Markers, der sowohl auf der AA2 x (AA2xHNI)-Rückkreuzung als auch auf der (CabxKaga)-Geschwisterkreuzung informativ war.

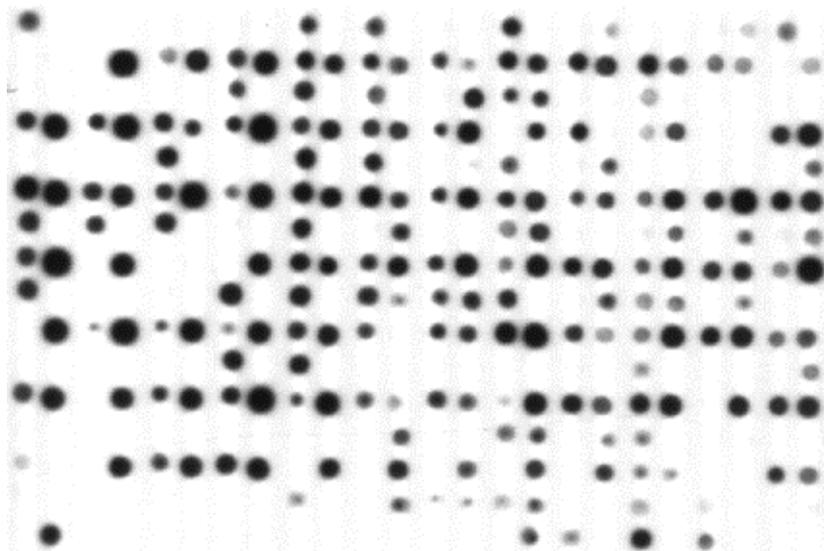


Abb. 34: Hybridisierung des Klons 317 auf einen Kartierungsfilter mit 192 Individuen der (CabxKaga)-Geschwisterkreuzung und der HNI x (AA2xHNI)-Rückkreuzung.

In Abbildung 35 ist die Integration der 10 neu identifizierten IRS-Marker in die bestehende Karte des Medakafisch, die aus 39 Tieren einer Rückkreuzung eines heterozygoten AA2xHNI-Männchen gegen ein AA2 - Weibchen besteht und die noch 3 Lücken aufweist, dargestellt. Die IRS-Marker sind jeweils durch eine Box hervorgehoben und von den Kopplungsgruppen ist nur der jeweils relevante Ausschnitt gezeigt.

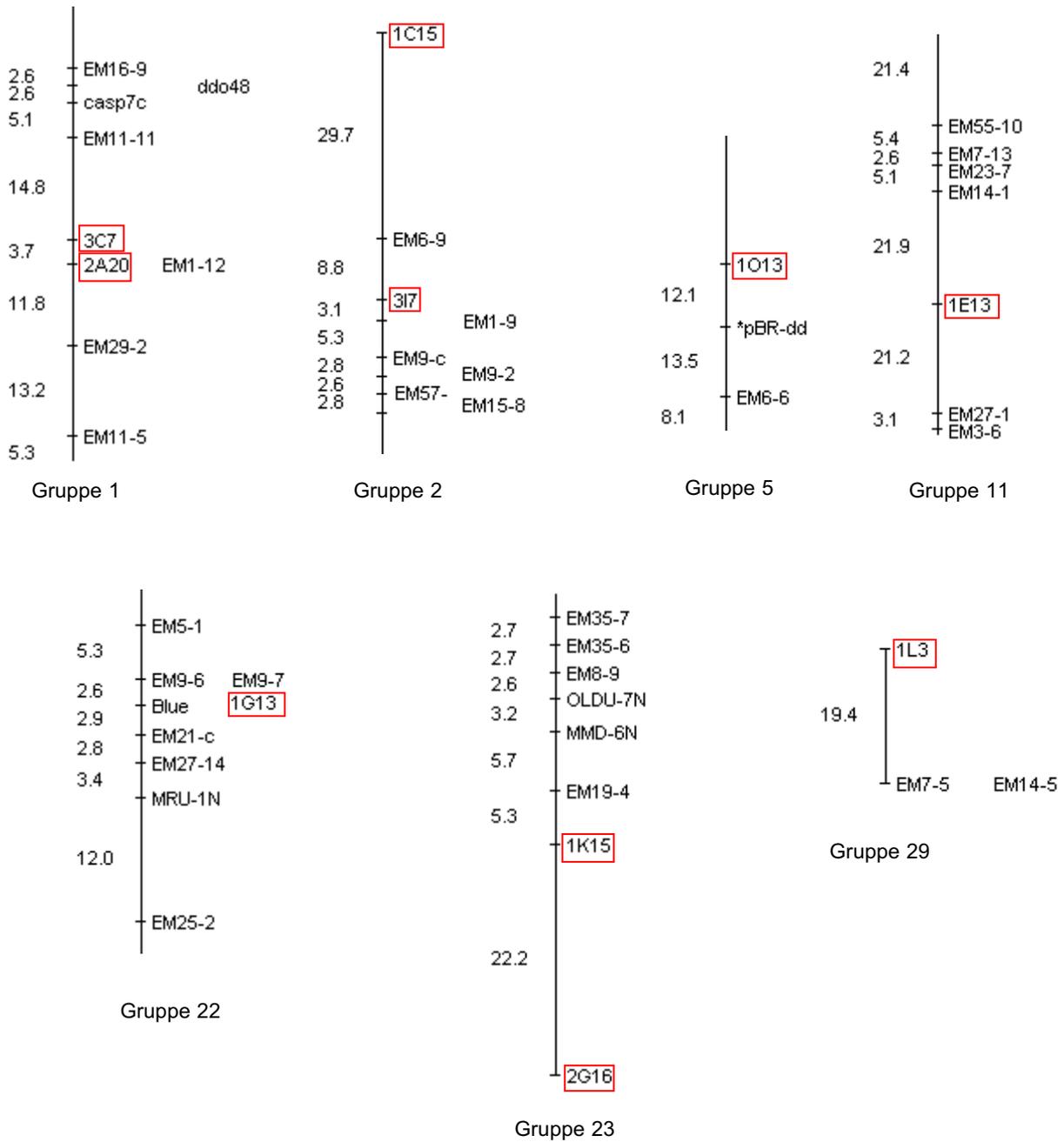


Abb. 35: Integration der identifizierten IRS-PCR-Marker in die bestehende Karte des Medakafisch, die aus 39 Tieren einer AA2x(AA2xHNI)-Rückkreuzung besteht.

3.2.2. Analyse mittels AFLP-Hybridisierung

Die Hybridisierung von IRS-Markern eröffnete im Medakafisch zwar eine schnelle und effiziente Möglichkeit, weitere, leicht zu handhabende Marker zu generieren, die als Ankerpunkte zwischen verschiedenen Referenzkreuzungen dienen könnten, aber die Anzahl der möglichen Marker ist selbst bei voller Ausschöpfung der polymorphen Marker in der Bank, mit 50-60 sehr eingeschränkt. Daher wurde einer weitere Methode, um Marker zu generieren, die durch Hybridisierung kartiert werden könnten, gesucht. In der Maus wurde bereits eine modifizierte AFLP-Strategie erfolgreich getestet (Himmelbauer et al., 1998), die leicht abgewandelt auch für das Medaka-Genom ausprobiert wurde. Durch vollständigen Verdau mit einem Restriktionsenzym mit einer 6bp langen Erkennungssequenz wurde jeweils das Genom der Medaka-Stämme Cab und Kaga in eine Population von Restriktionsfragmenten zerlegt. Durch Ligation von Adaptern und Verwendung eines komplementären Primers, der um zwei Basen verlängert war, konnte eine mehr oder weniger komplexe Fraktion des Genoms durch PCR amplifiziert werden (Abb.12, Seite23).

Einen Überblick über die Möglichkeiten durch die Wahl von einem oder zwei Restriktionsenzymen sowie verschiedenen Primern unterschiedlich komplexe Amplikons zu erhalten bietet Abb. 36. Während durch Verwendung eines Primers, der komplementär zur *Acc65I*-Schnittstelle ist, aus einer Population von mit *Bam*HI geschnittenen, mit Adaptor versehenen Restriktionsfragmenten keine Amplifikation möglich ist, können mit dem entsprechenden, *Bam*HI kompatiblen Primer je nach Stamm 3-8 Fragmente amplifiziert werden, und bei der Verwendung von einer Kombination von mehreren Primern entsteht ein kontinuierlicher Schmier, in dem sich einige Banden abzeichnen. Im direkten Vergleich der Amplikons aus dem Cab- und dem Kaga-Stamm werden außerdem die großen Unterschiede zwischen den beiden Stämmen deutlich.

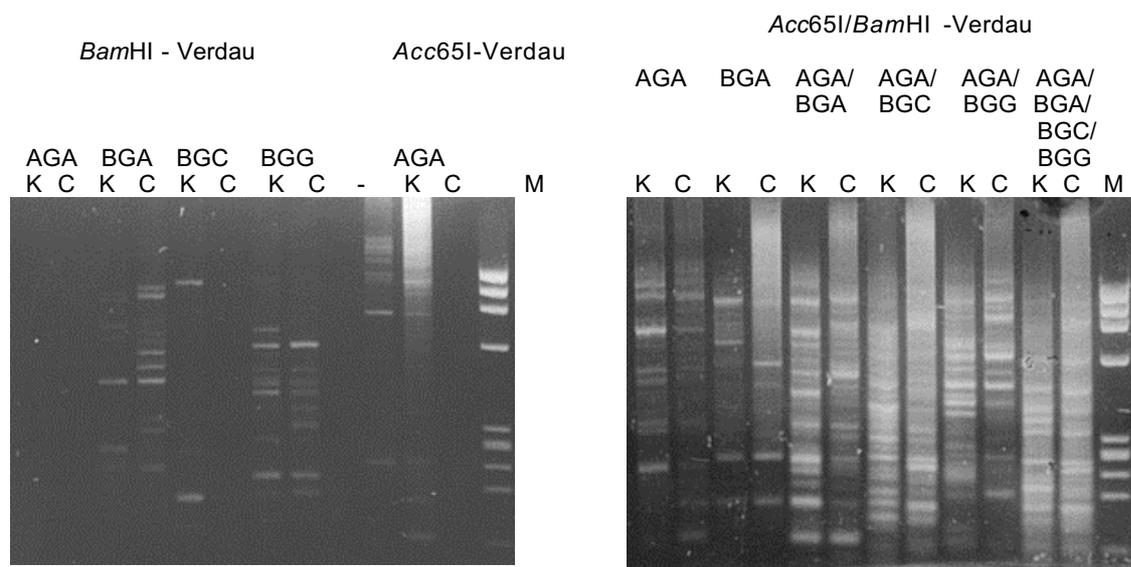


Abb. 36: Amplikons aus jeweils dem K=Kaga und C=Cab Stamm, die nach Verdau mit *Bam*HI bzw. *Acc65I* und der Verwendung verschiedener Primer-Kombinationen entstanden sind.

Die Amplikons, die durch Verdau mit *Bam*HI und *Acc*65I und der Verwendung der Primer AGA und BGA entstanden sind, wurden als Hybridisierungsprobe auf Kaga-Cosmidfilter (RZPD-Genbank-Nummer 73) verwendet. Die Autoradiogramme wiesen ein hohes Maß an differentiell positiven Klonen auf (Abb. 37).

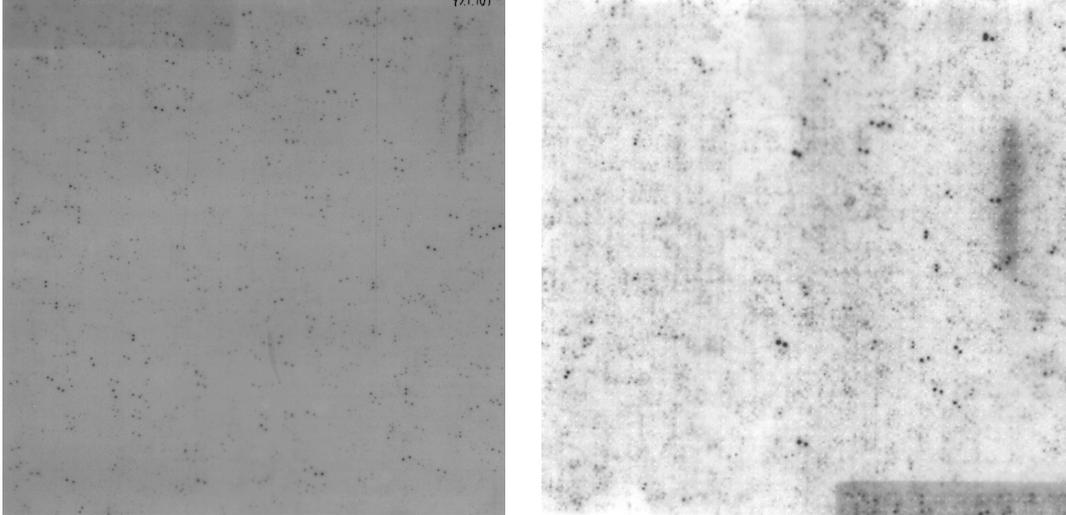


Abb. 37: Links: Kaga-Cosmidfilter hybridisiert mit einem Amplikon, das aus Cab-DNA, die mit *Bam*HI und *Acc*65I geschnitten, mit Adaptoren versehen und mit komplementären Primern mit GA-Extension amplifiziert wurde, hergestellt wurde. Rechts: Duplikat-Filter entsprechend hybridisiert mit einem Amplikon aus Kaga-DNA.

Es wurden 96 der differentiell hybridisierenden Cosmide aus der Bank isoliert, und es wurde versucht, durch Verdau mit *Bam*HI und *Acc*65I sowie den Einsatz der entsprechenden Adapter und Primer ein Fragment zu isolieren, das auf Amplikons von Cab- und Kaga-DNA einen +/- - Polymorphismus zeigen würde. Dies war in 21% der Klone möglich. Abb. 38 zeigt als Beispiel die Hybridisierung eines Fragmentes auf einen Filter, der Amplikons der (CabxKaga)-Geschwisterkreuzung trug, die analog zur Hybridisierungsprobe hergestellt wurden.

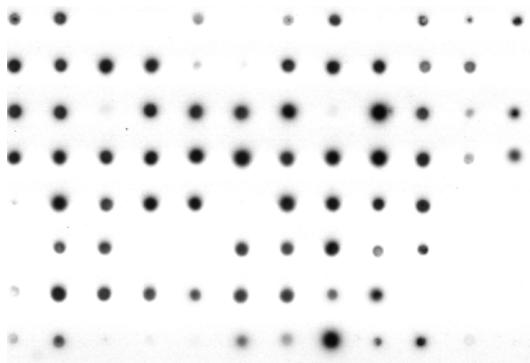


Abb. 38: Hybridisierung eines AFLP-Fragmentes aus einem Cosmid auf Amplikons der (CabxKaga)-Geschwisterkreuzung.