

HOMÖÖBOX-ENTHALTENDE GENE
IN *XIPHOPHORUS*

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Nina Merete Christiansen
aus
Oslo / Norwegen

Marburg 2008

D 26

Dekan: Prof. Dr. P. R. Schreiner

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Renkawitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. M. Scharl

Tag der mündlichen Prüfung:

Meiner Familie

DANKSAGUNG

Ich bin Herrn Prof. Fritz Anders, Genetisches Institut Gießen, für die Überlassung des Themas und dem stets fördernden Interesse an meiner Arbeit zu großem Dank verpflichtet. Ihm und seiner Frau, Dr. Annerose Anders, bin ich für die freundliche Atmosphäre im genetischen Institut dankbar. Sie sind zusammen mit den Mitarbeitern und Studenten für mich als Ausländerin wie eine große Familie gewesen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. R. Renkawitz, der in der Nachfolge von Herrn Prof. F. Anders die Verantwortung für meine Arbeit übernommen hat und es möglich gemacht hat, sie zu vollenden.

Herrn Prof. M. Scharl (Biozentrum, Universität Würzburg), bin ich zu Dank verpflichtet: Er hat mir zwei xiphophorine Genbänke für die Durchmusterung auf homöobox-haltige Klone zur Verfügung gestellt und mich durch einen 14-tägigen Aufenthalt in seinem Labor am Max Planck Institut, München, in Arbeiten mit rekombinanten Phagen und Restriktionskartierungen eingeführt.

Herrn Prof. M. Altmannsberger (Pathologisches Institut, Universität Gießen) bin ich für die Charakterisierung der Zelllinie DRLI durch Antikörper dankbar.

Ebenso will ich mich für die Bestimmung der Tyrosinase-Aktivität der Zelllinie DRLI bei Herrn Prof. H. Schmidt (Institut für Biochemie, Universität Halle) bedanken.

Diese Arbeit hat mir viel Freude bereitet und einen großen Teil meines Lebens stark geprägt.

Vielen Dank!

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 13 |
| DAS XIPHOPHORUS TUMOR-MODELL | 13 |
| Pigmentzellen und Farbmuster | 13 |
| Melanomentstehung durch interspezifische Kreuzungen | 14 |
| Formalgenetisch erkannte Chromosomen und Gene | 15 |
| Differenzierung der Pigmentzellen | 18 |
| Molekularbiologische und biochemische Charakteristika | 19 |
| Problemstellung dieser Arbeit | 21 |
| HOMÖOBOX-ENTHALTENDE GENE | 21 |
| Entwicklungs-spezifische Gene | 21 |
| Homöoboxen | 22 |
| Cluster-Anordnung der Homöoboxen | 23 |
| Funktion homöobox-enthaltender Gene | 26 |
| ZIELE | 27 |
| 2. MATERIAL | 28 |
| XIPHOPHORUS | 28 |
| <i>Xiphophorus maculatus</i> | 28 |
| Rio Jamapa (Mexiko) | 28 |
| Belize River (British Honduras) | 28 |
| Rio Usumacinta (Mexiko) | 29 |
| <i>Xiphophorus variatus</i> | 29 |
| Rio Panuco (Mexiko) | 29 |
| <i>Xiphophorus helleri</i> | 29 |
| Rio Lancetilla (British Honduras) | 29 |
| <i>Xiphophorus xiphidium</i> | 30 |
| Rio Soto la Marina (Mexiko) | 30 |
| <i>Xiphophorus montezumae cortezi</i> | 30 |
| Rio Axtla (Mexiko) | 30 |
| Interspezifische Kreuzungen | 30 |
| Pigmentzellmuster-Mutanten | 30 |
| <i>DrSd'</i> | 30 |
| <i>BrNi^e</i> | 31 |
| <i>Dr</i> | 31 |
| <i>Sd^T</i> | 31 |
| <i>DrSd^{rec}</i> | 31 |
| <i>DrArSr</i> | 31 |
| <i>DrAr</i> | 31 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| <i>(ArSr)Del</i> | 32 |
| <i>ArSr'</i> | 32 |
| <i>Br</i> | 32 |
| <i>DrLi</i> | 32 |
| <i>YeLiOrPu</i> | 32 |
| ANDERE FISCH- UND TIER-ARTEN | 34 |
| ZELLKULTUREN | 35 |
| PSM | 35 |
| A ₂ | 35 |
| BsT | 36 |
| LUNA | 36 |
| FM | 36 |
| DRLi | 36 |
| <i>Danio rerio</i> | 36 |
| <i>Corydoras paleatus</i> | 36 |
| <i>Vipera russelli</i> | 36 |
| BAKTERIEN | 37 |
| Q359 | 37 |
| JM 83 | 37 |
| C600 und C600 <i>Hfl</i> | 37 |
| HB 101 | 37 |
| PHAGEN | 37 |
| Genomische Genbibliotheken | 37 |
| λ-gt10 | 37 |
| λ-DNA Verpackungsextrakte | 38 |
| PLASMIDE | 38 |
| Nicht-rekombinante Plasmide | 38 |
| pUC | 38 |
| Rekombinante, erworbene Plasmide | 38 |
| p903G und pFS2 | 38 |
| λ-HAc-69A | 38 |
| 3. METHODEN | 39 |
| BAKTERIEN-VERFAHREN | 39 |
| Agarplatten | 39 |
| Ausplattierung von Bakterien | 39 |
| Übernachtskultur | 39 |
| Dauerkultur | 40 |
| Präparation von kompetenten Bakterien | 40 |
| PHAGEN-VERFAHREN | 40 |
| Kultivierung von Phagen auf Agarplatten | 40 |
| Phagentiter-Bestimmung | 41 |
| Gewinnung einzelner rekombinanter Phagen | 41 |
| Anzucht des erwünschten Phagen auf Agarplatten (Plattenlysate) | 41 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| DNA-ISOLIERUNG | 41 |
| Genomische DNA-Isolierung | 41 |
| Genomische DNA-Isolierung im Makroansatz | 41 |
| Genomische DNA-Isolierung im Mikroansatz | 42 |
| Phagen DNA-Isolierung | 42 |
| Plasmid DNA-Isolierung | 43 |
| Plasmid DNA-Isolierung über einen CsCl/Ethidiumbromid-Dichtegradienten | 43 |
| Plasmid DNA-Isolierung über eine Ionenaustauschsäule (Qiagen) | 44 |
| Plasmid DNA-Isolierung im Mikroansatz | 45 |
| ANALYSE DER DNA | 45 |
| Spektralfotometrische Analyse der DNA | 45 |
| Restriktionsenzymatische Verdauung der DNA | 45 |
| Elektrophoretische Auftrennung der DNA | 46 |
| Elektrophoretische Analyse der DNA | 46 |
| Hochmolekularität der genomischen DNA | 46 |
| Analyse von Plasmid- und Phagen-DNA | 46 |
| Präparative Southern Blot Verfahren | 47 |
| Übertragung von DNA auf Filtermembranen (Southern Blot) | 47 |
| Southern Analysen der genomischen DNA | 47 |
| Southern Analysen der rekombinanten Vektoren | 48 |
| ISOLIERUNG SPEZIFISCHER DNA-FRAGMENTE | 48 |
| Isolierung spezifischer DNA-Fragmente von über 400 bp | 48 |
| Trennung der DNA von der Agarose über eine NACS-Säule | 49 |
| Trennung der DNA von der Agarose mittels Elektroelution und Qiagen-Säulen | 49 |
| Isolierung spezifischer DNA-Fragmente von weniger als 400 bp | 50 |
| HERSTELLEN, SCREENEN UND CHARAKTERISIEREN REKOMBINANTER DNA | 50 |
| Herstellen einer genomischen Teil-Genbibliothek | 50 |
| Gewinnung der genomischen Insertions-DNA | 50 |
| Einbau der isolierten DNA in einen Phagen-Vektor | 50 |
| Verpackung der rekombinanten Phagen-DNA | 51 |
| Isolierung spezifischer Phagenklone (Genbibliothek-Durchmusterung) | 51 |
| Kartierung von Restriktions-Schnittstellen | 52 |
| Subklonierung von DNA-Fragmenten | 52 |
| Subklonierung spezifischer DNA-Fragmente | 53 |
| Sukzessive Verkürzung der Insertionen | 53 |
| Transformation und Durchmusterung von Bakterien | 55 |
| Transformation von kompetenten Bakterien | 55 |
| Durchmusterung von transformierten Bakterien | 55 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| SEQUENZ-VERFAHREN | 55 |
| Die Sequenzreaktion | 55 |
| Das Sequenzieren mit dem Klenow-Fragment | 56 |
| Das Sequenzieren mit der Sequenase ^R | 56 |
| Elektrophoretische Analyse der Sequenzprodukte | 57 |
| Vorbehandlung der Glasplatten | 57 |
| Die Herstellung des Sequenzgels | 57 |
| Elektrophoretische Auftrennung der Sequenzprodukte | 57 |
| Nachbehandlung des Gels | 58 |
| Autoradiographie | 58 |
| Nachbehandlung der Glasplatten | 58 |
| RNA-VERFAHREN | 59 |
| RNA-Isolierung | 59 |
| Isolierung der Gesamt-RNA | 59 |
| Selektion von Poly(A) ⁺ und Poly(A) ⁻ RNA | 60 |
| Elektrophoretische Auftrennung der RNA | 60 |
| Northern Analysen | 61 |
| AUFFINDEN SPEZIFISCHER SEQUENZEN GEBUNDEN AN FILTERMEMBRANEN (SOUTHERN UND NORTHERN BLOT ANALYSEN, GENBIBLIOTHEK-DURCHMUSTERUNG) | 61 |
| Markierung der Sonde | 61 |
| Vorhybridisierung und Hybridisierung der Filter | 62 |
| Waschen der Filter und Autoradiographie | 62 |
| Entfernung der hybridisierten DNA-Sonden ("Stripping") | 63 |
| ZELLKULTUR-VERFAHREN | 63 |
| 4. ERGEBNISSE | 65 |
| A-1) NACHWEIS VON HOMÖOBOXEN IM GENOM VON XIPHOPHORUS | 65 |
| B-1) CHARAKTERISIERUNG DES GENS XI-X | 72 |
| C-1) ISOLIERUNG DES HOMÖOBOX-ENTHALTENDEN XI-X-FRAGMENTES | 72 |
| Herstellung einer Xi-X-enthaltenden Teil-Genbibliothek | 72 |
| Durchmusterung der Teil-Genbibliothek auf das Xi-X-Fragment | 74 |
| C-2) UMKLONIERUNG, SUBKLONIERUNG UND EINE ERSTE, STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG DES ISOLIERTEN GENFRAGMENTES XI-X | 76 |
| Umklonierung, Subklonierung und Grobkartierung von Xi-X | 76 |
| Southern Analysen des isolierten Genabschnitts Xi-X | 78 |
| Die Herstellung und Subklonierung von kleineren DNA-Fragmenten | 80 |
| Subklonierung von spezifischen Xi-X Restriktionsfragmenten | 80 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|------------|
| Verkürzung des <i>Xi-X</i> Subfragments <i>Xi-X_A</i> mit Exonuclease III und Nuclease S1 _____ | 81 |
| C-3) SEQUENZANALYSEN DES ISOLIERTEN GENFRAGMENTES <i>Xi-X</i> _____ | 86 |
| Die Sequenz von <i>Xi-X</i> _____ | 86 |
| Vergleichende Sequenzanalysen von <i>Xi-X</i> _____ | 90 |
| Das Homöobox Gen, <i>Xi-X-HB</i> _____ | 90 |
| Nukleinsäure-Ebene _____ | 91 |
| Aminosäure-Ebene _____ | 92 |
| Gen unbekannter Motive, <i>Xi-X-LC</i> _____ | 103 |
| Die simplen repetitiven Sequenzen _____ | 109 |
| C-4) STRUKTURELLE ORGANISATION VON <i>Xi-X</i> IN VERSCHIEDENEN ARTEN, RASSEN UND POPULATIONEN VON <i>XIPHOPHORUS</i> _____ | 109 |
| Die Organisation von <i>Xi-X</i> im Genom von <i>X. maculatus</i> _____ | 110 |
| <i>X. maculatus</i> , Rio Jamapa _____ | 110 |
| <i>X. maculatus</i> , Belize River _____ | 113 |
| <i>X. maculatus</i> , Rio Usomacinta _____ | 113 |
| Die Organisation von <i>Xi-X</i> im Genom von <i>X. helleri</i> _____ | 115 |
| <i>X. helleri</i> , Rio Lancetilla _____ | 115 |
| <i>X. helleri</i> , Rio Jamapa _____ | 116 |
| <i>X. helleri</i> , Belize River _____ | 116 |
| Die Organisation von <i>Xi-X</i> im Genom von <i>X. variatus</i> _____ | 117 |
| Die Organisation von <i>Xi-X</i> in den Genomen von <i>X. xiphidium</i> und <i>X. montezumae cortezi</i> _____ | 117 |
| Vergleiche der Organisation von <i>Xi-X</i> mit flankierenden Regionen in den Genomen von <i>X. maculatus</i> und <i>X. helleri</i> _____ | 120 |
| C-5) VERERBUNG DER ARTSSPEZIFISCHEN <i>Xi-X</i>-FRAGMENTE IN RÜCKKREUZUNGSBASTARDEN DER WILDTYPEN UND DER PIGMENTZELLMUSTERMUTANTEN _____ | 123 |
| Chromosomale Lokalisation von <i>Xi-X</i> _____ | 125 |
| Gesamtanalysen an DNA, isoliert aus mehreren Fischen _____ | 125 |
| Untersuchungen an DNA, isoliert aus einzelnen Fischen _____ | 131 |
| Strukturelle Organisation von <i>Xi-X</i> in Rückkreuzungsbastarden der Pigmentzellmuster-Mutanten und in Zelllinien _____ | 139 |
| Pigmentzellmuster-Mutanten _____ | 139 |
| Zelllinien _____ | 143 |
| Abweichungen der erwarteten <i>Xi-X</i>-Organisation und des <i>Xi-X</i>-Erbgangs in Bastarden von <i>Xiphophorus</i> _____ | 147 |
| X- und Z-Chromosom von <i>X. maculatus</i> _____ | 147 |
| Y-Chromosom von <i>X. maculatus</i> _____ | 148 |
| X-Chromosom von <i>X. variatus</i> _____ | 149 |
| <i>X. helleri</i> -spezifische <i>Xi-X</i> -Fragmente _____ | 150 |
| C-6) CHARAKTERISIERUNG DER SEQUENZ POLY(GTCT/GACA) IM GENOM VON <i>XIPHOPHORUS</i> _____ | 151 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|------------|
| C-7) KONSERVIERUNG VON XI-X IN DER EVOLUTION | 156 |
| C-8) FUNKTIONELLES CHARAKTERISIEREN VON XI-X DURCH RNA EXPRESSIONSSTUDIEN | 159 |
| Methodische Aspekte der Expressionsanalysen | 159 |
| Qualität und Quantität der gewonnenen Gesamt-RNA | 159 |
| Qualität und Quantität der isolierten Poly(A) ⁺ -RNA | 159 |
| Qualität und Auswertung der Hybridisierungssignale | 161 |
| Das Expressionsmuster von Aktin | 162 |
| Xi-X Expression der verschiedenen Gewebe- und Zelltypen von <i>Xiphophorus</i> | 165 |
| Xi-X Expression in der Leber | 165 |
| Verschiedene Leber-Transkripte | 166 |
| Quantitative Schwankungen | 168 |
| Xi-X Expression im Gehirn | 171 |
| Xi-X Expression in Hoden | 171 |
| Xi-X Expression in Kiemen | 171 |
| Xi-X Expression in Milz, Pankreas, Nieren, Darm und Fettgewebe | 171 |
| Xi-X Expression in Muskelgewebe | 173 |
| Quergestreifte Muskulatur | 173 |
| Quantitative Schwankungen der Xi-X-Expression in der Skelettmuskulatur | 175 |
| Herz und glatte Muskulatur | 179 |
| Xi-X Expression in der Haut | 180 |
| Xi-X Expression in Zelllinien | 183 |
| Xi-X Expression in Flossen | 186 |
| Xi-X Expression in sich regenerierenden Rückenflossen | 190 |
| Xi-X Expression im Melanom und in melanomtragenden Flossen | 194 |
| Xi-X Expression im Peritoneum | 196 |
| Xi-X Expression im Kopfbereich | 197 |
| Expressionsmuster von Xi-X während der Entwicklung | 199 |
| B-2) CHARAKTERISIERUNG DER ZELLINIE DRLI | 205 |
| Morphologie und Wachstum | 205 |
| Differenzierungseigenschaften | 206 |
| Untersuchungen zur Merkmale der Melanocytenreihe der Pigmentzellen | 207 |
| B-3) ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG WEITERER HOMÖOBOX-ENTHALTENDEN GENE AUS VOLLSTÄNDIGEN, GENOMISCHEN GENBIBLIOTHEKEN | 210 |
| A-2) DIE ANORDNUNG UND ZAHL VON HOMÖOBOXEN IM GENOM VON XIPHOPHORUS (EINE ZUSAMMENSTELLUNG) | 219 |
| 5. DISKUSSION | 228 |
| HOMÖOBOXEN IM GENOM VON XIPHOPHORUS | 228 |
| Nachgewiesene Homöoboxen | 228 |
| Zusammenfassung/weitere Fragestellungen | 232 |
| STRUKTURELLE ASPEKTE VON XI-X | 232 |
| Strukturelle Beschaffenheit und Konservierung | 233 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|------------|
| Das Homöobox Gen, <i>Xi-X-HB</i> _____ | 233 |
| Gen unbekannter Motive, <i>Xi-X-LC</i> _____ | 236 |
| SSRs in der isolierten <i>Xi-X</i> -Region _____ | 237 |
| Zusammenfassung/weitere Fragestellungen _____ | 238 |
| Chromosomale Lokalisation _____ | 238 |
| Kopplungsanalysen _____ | 238 |
| Zusammenfassung/weitere Fragestellungen _____ | 239 |
| <i>Xi-X</i> Organisation in den Wildtypen und Farbmuster-Mutanten _____ | 240 |
| Spielt die unterschiedliche <i>Xi-X</i> -Organisation für die PSPM eine Rolle? _____ | 240 |
| Charakterisierung der mutierten Geschlechtschromosomen _____ | 241 |
| Verwandtschaftsanalysen _____ | 242 |
| Poly(GTCT/GACA) und die molekulare Grundlage des RFLPs _____ | 242 |
| Zusammenfassung/weitere Fragestellungen _____ | 244 |
| Geschlechtsbestimmung _____ | 245 |
| <i>Xi-X</i> und geschlechts-determinierende Eigenschaften bei <i>X. helleri</i> _____ | 245 |
| <i>Xi-X</i> und geschlechts-determinierende Eigenschaften bei <i>X. maculatus</i> _____ | 246 |
| <i>Bkm</i> -DNA bei der Geschlechtsbestimmung _____ | 248 |
| Zusammenfassung/weitere Fragestellungen _____ | 250 |
| <i>Xi-X</i>-Organisation in den Bastarden: DNA-Umlagerungen _____ | 251 |
| Bedeutung von SSRs für die DNA-Instabilität _____ | 252 |
| Bedeutung von PS-Genen (<i>Tu</i> -Komplex und <i>R_{Diff}</i>) für die Aberrationen _____ | 255 |
| Ist <i>R_{Diff}</i> ein Gen der Zellzyklusüberwachung? _____ | 257 |
| Charakteristika des <i>Xiphophorus</i> -Tumormodells, die durch <i>R_{Diff}</i> als ein Gen der Zellzyklusüberwachung eine Erklärung finden würden _____ | 258 |
| Spielt <i>R_{Diff}</i> bei der Unterdrückung der Rekombination zwischen unterschiedlichen DNA Regionen eine Rolle? _____ | 259 |
| Beziehung des PS-Geschlechtschromosoms zu der meiotischen und mitotischen Instabilität ____ | 260 |
| Spielt die Chromatinstruktur für die Instabilität eine Rolle? _____ | 262 |
| Effekt von Röntgenstrahlen auf die Stabilität von SSRs _____ | 263 |
| Zusammenfassung/weitere Fragestellungen _____ | 265 |
| <i>EXPRESSION VON XI-X</i> _____ | 266 |
| Expression von <i>Xi-X</i> in der Leber, Skelettmuskulatur und dem Herzen _____ | 268 |
| Charakterisierung der Transkripte _____ | 268 |
| Expressionsmuster _____ | 270 |
| Leber _____ | 271 |
| Muskel _____ | 271 |
| Embryonalentwicklung _____ | 272 |
| Die Gene <i>Xi-X</i> und <i>pdx-1</i> im Intestinaltrakt _____ | 273 |
| Zusammenfassung/weitere Fragestellungen _____ | 276 |
| <i>XI-X</i> UND PIGMENTZELLEN _____ | 276 |
| Eine differenzierungs-bezogene Expression von <i>Xi-X</i> in den Pigmentzellen _____ | 277 |
| Eine differenzierungs-bezogene Expression von <i>Xi-X</i> in den Pigmentzellen; Studien der Rückenflossen, Melanom, Peritoneum und Zelllinien _____ | 277 |
| Zusammenfassung/weitere Fragestellungen _____ | 280 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|------------|
| Die Zelllinie DRLI | 281 |
| Allgemeine Charakteristika, Differenzierungsinduktion, <i>Xi-X</i> -Expression | 281 |
| Differenzierungseigenschaften | 284 |
| Zusammenfassung/weitere Fragestellungen | 285 |
| Determination und Differenzierung der Muster-Pigmentzellen | 285 |
| Vergleich der Farbmusterungen von <i>X. helleri</i> und <i>X. maculatus</i> | 286 |
| Modell zur Differenzierung und <i>Xi-X</i> -Transkription | 288 |
| Molekulare Mechanismen der Farbmusterentstehung | 292 |
| Mögliche Funktionen von <i>Xi-X</i> | 292 |
| Ist die Synthese des 2,3 kb <i>Xi-X</i> -Transkriptes in den Musterungen <i>Sd</i> und <i>Sp</i> vom Gen <i>R_{Diff}</i> abhängig? | 293 |
| Ist das 2,3 kb <i>Xi-X</i> -Transkript mit spezifischen Eigenschaften der Makropigmentzellen in den verschiedenen Farbmusterungen verbunden? | 295 |
| Besteht eine Beziehung zwischen den Genen <i>Xi-X</i> , <i>R_{Diff}</i> und <i>erbB^{*a}</i> (<i>Xmrk</i>) und den Wachstumseigenschaften der verschiedenen Farbmusterungen? | 296 |
| Zusammenfassung/weitere Fragestellungen | 298 |
| Zusammenfassung | 298 |
| Weitere Fragestellungen | 299 |
| | |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG | 302 |
| | |
| 7. ANHANG | 304 |
| | |
| LÖSUNGEN UND MEDIEN | 304 |
| Bakterien-Verfahren | 304 |
| Phagen-Verfahren | 306 |
| DNA-Isolierung | 306 |
| Analyse der DNA | 309 |
| Isolierung spezifischer DNA-Fragmente | 311 |
| Herstellen, screenen und charakterisieren rekombinanter DNA | 312 |
| Sequenz-Verfahren | 312 |
| RNA-Verfahren | 316 |
| Auffinden spezifischer Sequenzen gebunden an Filtermembranen (Southern und Northern Blot) | |
| Analysen, Genbibliothek-Durchmusterung) | 317 |
| Zellkultur-Verfahren | 318 |
| | |
| ABKÜRZUNGEN | 319 |
| DNA/Gen-Bezeichnungen | 319 |
| Pigmentzell-Loci | 320 |
| Aminosäuren (Drei- und Ein-Buchstabencode) | 321 |
| Diverse | 321 |
| | |
| 8. LITERATURVERZEICHNIS | 323 |

1. EINLEITUNG

DAS XIPHOPHORUS TUMOR-MODELL

Die lebendgebärenden Zahnkarpfen (*Teleostei; Poeciliidae*), die zu der Gattung *Xiphophorus* gehören, bewohnen kleine Seen, Flüsse, Bäche und Tümpel in Mittelamerika, mit einer Ausbreitung von Nord-Honduras bis nach Nord-Mexiko (Kallman, 1975). Es sind 18 Arten bekannt (Meyer, M. & Scharl, 1979; Rosen, D.E., 1979; Radda, 1980; Scharl & Schröder, 1988) und eine Vielzahl von Rassen und Populationen sind u.a. durch die geographische und ökologische Isolation entstanden, die durch die verschiedenen Flüsse und Seen bedingt sind (Atz, 1962; Zander, 1967). Die verschiedenen Arten, Rassen und Populationen kann man an charakteristischen Farbmustern erkennen.

Pigmentzellen und Farbmuster

Die Farbmuster der Fische entstehen aus drei Typen von Pigmentzellen, die Iridophoren, die Pterinophoren und die Melanophoren (Breider & Seeliger, 1938). Die Iridophoren verleihen den Fischen einen silbrigen Glanz. Die Pterinophoren versehen den Fischen mit einer gelben, orangen oder roten Färbung, die von den Pterinen der Xanthophoren, Xanthoerythrophoren bzw. Erythrophoren ausgehen (Henze *et al.*, 1977). Die Melanophoren sind durch das schwarze Polymerprodukt Eumelanin gekennzeichnet, das in den Zellen in Melanosomen gespeichert vorkommt.

Die Melanophoren unterteilt man in Mikro- und Makromelanophoren (Gordon, 1927; Anders, F. *et al.*, 1972; Anders, A. *et al.*, 1973a,b; Schmidt, E.R., 1978). An der graugrünen Grundfärbung nehmen hauptsächlich die Mikromelanophoren, die Xanthophoren und die Iridophoren teil. Zusätzlich gibt es eine populations-spezifische Färbung, die durch gelb und rot pigmentierte Pterinophoren und durch Makromelanophoren hervorgerufen ist. Die erblich-bedingte, spezifische Schwarzfärbung ist immer auf bestimmte Körperareale begrenzt, z.B. auf die Rückenflosse, auf den hinteren Teil des Körpers, auf den vorderen Teil des Körpers, auf das Auge, das Maul usw. (Anders, A. & Anders, F., 1978). Abb. 1 (siehe S. 14) zeigt die Kompartimente (Co), in denen die Makromelanophorenmuster, abhängig vom genetischen Hintergrund, entstehen können. Im Abschnitt Material (siehe S. 28ff.) werden einige der Pigmentzellmuster genauer erläutert.

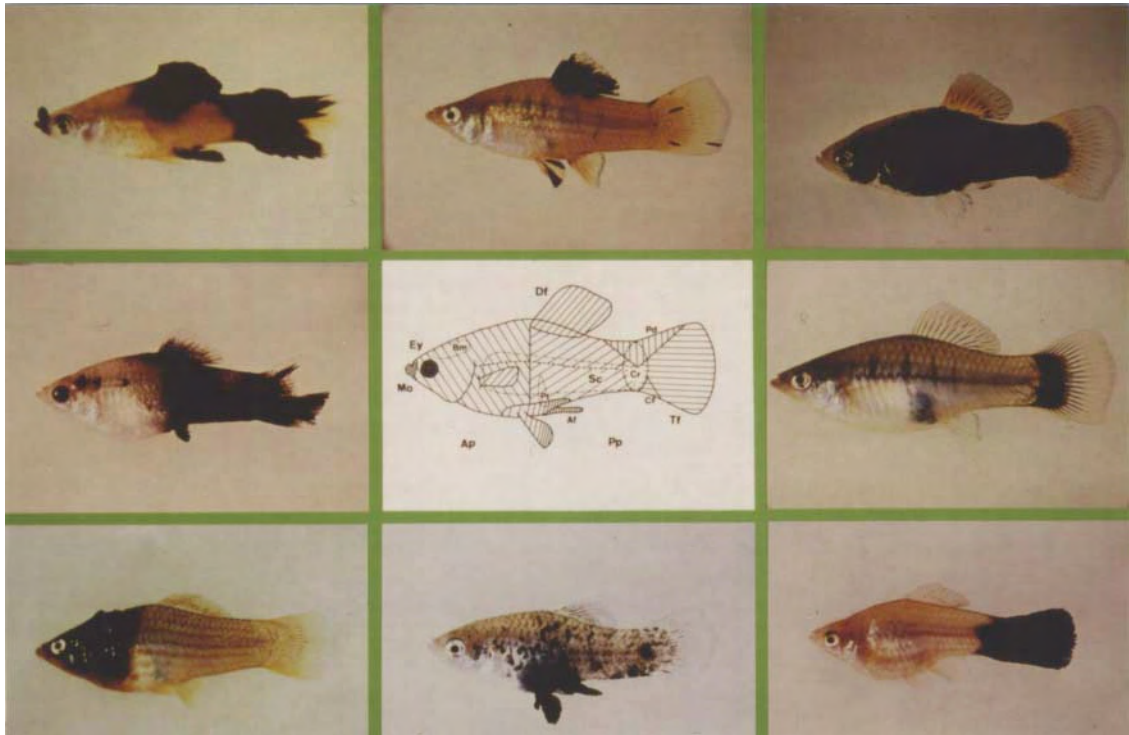


Abb. 1

Ausgewählte Beispiele von kompartment-abhängiger Melanomentstehung in interspezifischen Kreuzungsbastarden von *Xiphophorus*.

Das mittlere Foto zeigt die Kompartimente (Co), in denen die Makromelanophoren-Muster bzw. Melanome entstehen können (Anders, A. & Anders, F., 1978).

Melanomentstehung durch interspezifische Kreuzungen

In ihren natürlichen Habitaten sind keine Artsbastarde von *Xiphophorus* gefunden worden (Kallman & Atz, 1967; Zander, 1969). Artifizielle Insemination erlaubt die Erzeugung von fertilen Bastarden (Zander, 1961). Bei bestimmten interspezifischen Kreuzungsprodukten von *X. maculatus* und *X. variatus* mit *X. helleri* erfolgt eine Intensivierung der Farbmuster der Platyfische, und die Makromelanophoren verlieren die Wachstumskontrolle, zur Entstehung von Melanomen führend. Diese genetisch-bedingte Tumorentstehung wurde gleichzeitig von drei Wissenschaftlern beschrieben (Gordon, 1927; Häussler, 1928; Kosswig, 1928). Weitere Analysen konnten die kreuzungsbedingte, spontane Melanomentwicklung auf die Regulation eines Locus der Geschlechtschromosomen von *X. maculatus* und *X. variatus* eingrenzen (Gordon, 1958; Anders, F., 1967). Durch gezielte Kreuzungen von bestimmten Arten bzw. Populationen von *X. maculatus* und *X. variatus* mit *X. helleri* konnte vergleichsweise Bastarde hergestellt werden, die kein spontanes Melanom entwickeln, aber gegenüber krebserregende Substanzen hoch sensibel sind (Anders, F. *et al.*, 1985; Anders, A. *et al.*, 1991a,b).

Unten wird das klassische Kreuzungsschema von *X. maculatus* und *X. helleri* vorgestellt (siehe Abb. 2A, S. 17) bevor im nächsten Abschnitt die für die Melanombildung beteiligten Chromosomen und Gene erläutert werden (siehe Abb. 2B, S. 17):

Durch die Kreuzung von *X. maculatus* *DrSd'* (schwarze Punkte in der Rückenflosse und auf der hinteren Körperseite, sowie eine schwache Rotfärbung in der Rückenflosse) mit *X. helleri* (besitzt kein entsprechendes spezifisches Makromelanophoren- oder Pterinophoren-Muster) entsteht ein F₁-Bastard mit vergrößerten Makromelanophoren-Flecken und einer intensivierten Rotfärbung (siehe Abb. 2A, S. 17). Die Makromelanophoren-Flecken haben ein dreidimensionales Wachstum und können als benignes Melanom bezeichnet werden. Zusätzlich ist die Rotfärbung, die auch in den Wildtypen im Rückenflossenbereich lokalisiert ist, verstärkt und weit ausgebreitet. Eine Rückkreuzung der F₁-Bastarde mit *X. helleri* (F₂R) spaltet die Fleckenfärbung nach Mendel 1:2:1 phänotypisch auf. 50% der F₂R-Generation haben keine spezifische Pterinophoren- oder Makromelanophoren-Färbung und sind phänotypisch von *X. helleri* nicht zu unterscheiden. Die andere Hälfte spaltet sich zu je 50% benigne und maligne Melanome auf. Beide Gruppen melanomtragender Bastarde zeigen eine verstärkte Rotfärbung.

Kreuzt man einen Rückkreuzungsbastard, der ein benignes Melanom trägt, mit *X. helleri*, entsteht in der nächsten Rückkreuzungsgeneration die gleiche 1:2:1 Aufspaltung. Eine Rückkreuzung eines Rückkreuzungsbastards, der ein malignes Melanom trägt, mit *X. maculatus* macht die Tumorentstehung rückgängig, Fische mit benignen Melanomen entstehen. Eine wiederholte Rückkreuzung mit *X. maculatus* führt zu Nachkommen, bei denen die Makromelanophoren wieder als kleine Flecken und die Rotfärbung als eine schwache Färbung im Rückenflossenbereich zu sehen ist.

Formalgenetisch erkannte Chromosomen und Gene

Zwei Chromosomenpaare von *X. maculatus* spielen bei der Tumorentstehung eine wichtige Rolle (siehe Abb. 2B, S. 17), die Geschlechtschromosomen (X, Y und Z, siehe Beschreibung unter dem Hauptabschnitt Material, S. 28ff.) und ein autosomales Chromosomenpaar mit dem Gen *Diff* oder *R_{Diff}* (siehe S. 16). Die spezifischen Makromelanophoren- und Pterinophoren-Loci liegen auf den Geschlechtschromosomen von *X. maculatus* und *X. variatus*. Wegen des kausalen Zusammenhangs zwischen dem Makromelanophoren-Locus und der Melanombildung in Bastarden, wurde ein Gen dieser Region das "Tumor-Gen" (*Tu*) benannt (Anders, F. *et al.*, 1974), später als *Tu*-Komplex definiert (Anders, F., 1991). Der *Tu*-Komplex liegt terminal auf den Chromosomen und ist, wie Translokations- und Deletionsstudien gezeigt haben, für den Fisch nicht essentiell (Anders, A. *et al.*, 1973b; Zechel *et al.*, 1993). Der *Tu*-Komplex besteht aus einem Onkogen (*onc*), eine Beziehung zu dem Onkogen *erbB* konnte später hergestellt werden (siehe S. 20), und kompartiments-spezifische (insgesamt *R_{Co}*) und gewebs-spezifische (insgesamt *R_{Gew}*), regulatorische Gene dieses Gens. Studien der Chromosomen-Aberrationen haben gezeigt, dass die regulatorischen Gene *R_{Co}* und *R_{Gew}* sehr eng mit dem *onc*-Gen gekoppelt sind und ihre Funktionen in *cis*-Position ausüben (Anders, A & Anders, F., 1978; Anders, F. *et al.*, 1984). Intakte *R_{Co}* unterdrücken die Expression des

onc-Gens. Intakte R_{Gew} reprimieren die Expression des *onc*-Gens in neuronalen (R_{neu}), mesenchymalen (R_{mes}) und epithelialen (R_{epi}) Geweben und in Melanophoren (R_{Mel}). Für ein Makromelanophoren-Muster bzw. für die örtliche Melanombildung ist sowohl ein geschwächtes R_{Mel} (R_{Mel}') als auch ein geschwächtes Gen der R_{Co} -Gene (z.B. R_{Df} und R_{Pp}' , siehe Abb. 2B, S. 17) erforderlich.

Zusätzlich zu dem *onc*-Gen, mit dessen gewebs- und kompartiments-spezifischen, regulatorischen Genen, liegt auf den Geschlechtschromosomen ein Pterinophoren-Locus (*Ptr*), der auch unter einer kompartimentalen Regulation steht. Der Pterinophorenlocus ist eng an den Makromelanophoren-Locus gekoppelt und gehört zum definierten *Tu*-Komplex (Anders, F., 1991).

Die Geschlechtsbestimmung bei *X. helleri* ist polygen. Diese *Xiphophorus*-Art hat keine Geschlechtschromosomen, wie sie bei *X. maculatus* vorzufinden sind. Es existiert aber ein zu den Geschlechtschromosomen homologes Chromosomenpaar, wodurch eine interspezifische Kreuzung ermöglicht wird. Cytogenetische Studien haben keine signifikanten, morphologischen Unterschiede zwischen den beiden Arten aufdecken können (Tantithakura, 1990; Tantithakura *et al.*, 1993). Die homologen Chromosomen von *X. helleri* tragen keine zu den Platyfischen entsprechenden Loci für eine spezifische Pterinophoren- und Makromelanophoren-Färbung, und der *Tu*-Komplex ist nicht im Genom vorhanden.

Ein autosomales Chromosomenpaar von *X. maculatus* besitzt ein Tumor-Suppressorgen (Anders, A. & Anders, F., 1978). Es fördert die terminale Differenzierung der Makromelanophoren (Vielkind, 1976) und wird entsprechend als *Diff*-Gen bzw. R oder R_{Diff} (Meierjohann & Schartl, 2006) bezeichnet. Die Makromelanophoren werden nach einer gewissen Alterung von den Makrophagen entfernt. Die Wirkung des R_{Diff} -Gens ist dosisabhängig (Anders, A. *et al.*, 1985). *X. maculatus* hat zwei Kopien dieses Gens, die sehr effektiv die Differenzierung teilungsfähiger Melanoblasten und Makromelanocyten zu den teilungsunfähigen Makromelanophoren induzieren. Damit wird die Ausbreitung der Makromelanophoren auf kleine Flecken oder Linien begrenzt. Fische mit gutartigem Melanom besitzen eine Kopie des R_{Diff} -Gens im Genom. Dies erlaubt eine gewisse terminale Differenzierung zu Makromelanophoren, es findet aber eine gewisse Melanoblasten- und Melanocyten-Proliferation statt, die Schwarzfärbung wird intensiviert und breitet sich außerhalb des Kompartiments aus. Beim Fehlen von R_{Diff} -Genen im Genom zeigt sich eine erhöhte Melanoblasten- und Melanocytenproliferation, wodurch ein invasives, malignes Wachstum zustande kommt.

Differenzierung der Pigmentzellen

Die Vorläuferzellen der Pigmentzellen, die Chromatoblasten, lösen sich am 4. Tag der Embryonalentwicklung von der Neuralleiste und wandern zu ihren Zielorten in der Haut, im Peritoneum, Pericardium und im Bindegewebe der Hauptblutgefäße (Peter *et al.*, 1985). Am Zielort differenzieren sie zu Iridophoren, Pterinophoren und Melanophoren. Für die Melanophoren läuft die Differenzierung über die S- (S: "stem"/Stamm), I- (I: "intermediate"/Intermediär) und A- (A: "advanced"/ fortgeschrittene) Stadien der Melanoblasten zu den Melanocyten und weiter zu den terminal differenzierten, teilungsunfähigen Melanophoren (siehe Abb. 3, S. 19; Anders, F. *et al.*, 1980, 1985). Nach einer gewissen Zeit werden die Melanophoren von den Makrophagen entfernt. Die neoplastische Transformation der Pigmentzellen erfolgt in einem bestimmten, kompetenten Stadium der Zelldifferenzierung, im Stadium der I-Melanoblasten (Diehl, 1980). Aus den I-Melanoblasten entstehen *Tr*-I-Melanoblasten (Tr: transformierte) und weiter *Tr*-A-Melanoblasten, *Tr*-Melanocyten und *Tr*-Melanophoren. So wie das Gen *R_{Diff}* die terminale Differenzierung der Melanophoren beeinflussen kann (siehe S. 16), gibt es andere Gene, die in den Differenzierungsvorgang eingreifen können:

Das rezessive Gen "golden" (*g*), das auf einem autosomalen Chromosomenpaar liegt, blockiert im homozygoten Zustand die weitere Differenzierung von S-Melanoblasten (Diehl, 1980). Dieser Block ergibt Fische mit einem hellen, gelblichen Phänotyp, der hauptsächlich durch Xanthophoren und sehr wenige Melanophoren gekennzeichnet ist. Die Differenzierung der Iridophoren und Pterinophoren erfolgt unbeeinflusst von dieser Blockierung. Eine Behandlung der Fische mit Promotoren, wie z.B. TPA, Steroidhormone oder Cyclamat, überwindet diesen Block, so dass Melanome entstehen können (Anders, A. *et al.*, 1991a,b; Anders, A. *et al.*, 1994a).

Die intakten, regulatorischen Gene des *onc*-Gens (*R_{Co}*) blockieren ebenfalls die Differenzierung von S-Melanoblasten (Diehl, 1980), jedoch nur von denen, die sich zu *Tr*-Melanophoren bzw. Makromelanophoren entwickeln würden. Die Mikromelanophoren durchlaufen ihre normale Differenzierung, so dass die Fische dadurch ihre Grundfärbung behalten. Geschwächte *R_{Co}*, vorausgesetzt *R_{Mel}* ist auch beeinträchtigt, erlauben die weitere Differenzierung von Makromelanophoren, ein Makromelanophoren-Muster entsteht.

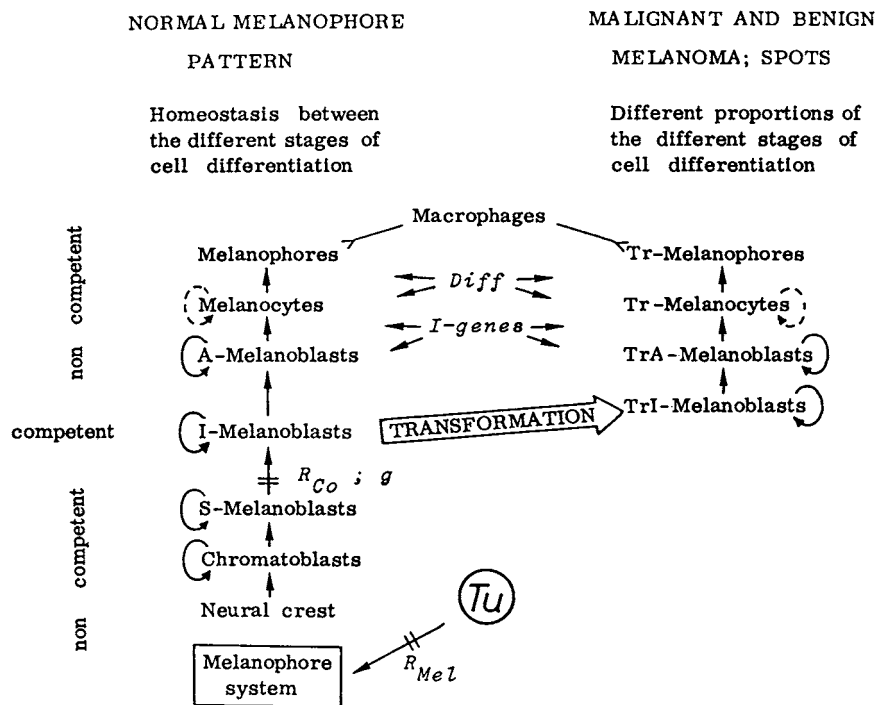


Abb. 3

Die Differenzierung von Melanophoren der Grundfärbung (die Mikromelanophoren) und der spezifischen Pigmentzellmuster der Platyfische (die Makromelanophoren bzw. die transformierten Melanophoren, die in Bastarden zu Melanome entarten können).

Nach Anders, F. *et al.* (1985).

Molekularbiologische und biochemische Charakteristika

Das formal-genetisch gut charakterisierte *Xiphophorus* Tumorsystem ist auch molekularbiologisch ausführlich untersucht worden (zusammenfassend beschrieben in Anders, F. *et al.*, 1984 und Anders, F., 1991).

Virale und zelluläre Onkogen-Sonden wurden in Southern Analysen eingesetzt, um Homologien mit den formalgenetisch bekannten Genen im *Xiphophorus* Tumor-Modell aufzufinden. Zelluläre Kopien der Onkogene *src*, *neu*, *sis*, *abl*, *myb*, *myc*, *raf/mil*, *fos*, *ras*, *yes*, *fms*, *fgr*, *fes/fps*, *bcl2* und *erbA* konnten alle im xiphophorinen Genom nachgewiesen werden (Anders, F., 1989). Diese Gene weisen keine Restriktionsfragment-Längen Polymorphismen (RFLP's) auf, die eine Beziehung zu den Genen *onc*, R_{Co} , R_{Me1} oder R_{Diff} herstellen konnten. Viele der xiphophorinen Proto-Onkogene (Homologien zu den Genen *erbA*, *myb*, *myc*, *ras*, *sis*, *src*) sind zum Teil sequenziert und durch Expressionsanalysen charakterisiert worden (Gronau, 1987; Gröger, 1987; Mäueler, 1988; Mäueler *et al.*, 1988a,b; Pfütz, 1988; Schleenbecker, 1988; Robertson, S.M., 1989; Peters, 1990; Wagner, 1990; Burcin, 1991; Krekeler, 1991; Leers, 1991; Zechel *et al.*, 1992a).

Es konnte jedoch mit *erbB*-Sonden in Southern Analysen ein RFLP gezeigt werden, der sowohl mit dem X-, Y- und Z- Chromosom von *X. maculatus*, sowie mit dem X- und Y-Chromosom von *X. variatus* korreliert (Zechel, 1988; Zechel *et al.*, 1988). Das zum viralen Gen *erbB* und humanen EGF-Rezeptor verwandte Gen wurde *x-erbB^{*a}* (a; „accessory“: Zechel, 1988; Zechel *et al.*, 1988) bzw. *ONC-Xmrk* (Wittbrodt *et al.*, 1989) oder nur *Xmrk* (Meierjohann & Schartl, 2006) genannt, in dieser Arbeit mit *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) bezeichnet. Die Lokalisation von *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) konnte zu bestimmten Geschlechtschromosomen (X, Y und Z) von *X. maculatus* und *X. variatus* festgelegt werden (Zechel *et al.*, 1988; Zechel *et al.*, 1989), aber ist nicht im Genom von *X. helleri* anwesend. Durch Studien von Deletionen und Translokationen der PS-Pigmentzellloci konnte die Lokalisation von *x-erbB^{*a}* zu einer Region zwischen den Pterinophoren- und Makromelanophoren-Loci eingegrenzt werden (Zechel *et al.*, 1988; Zechel *et al.*, 1992b). Sequenzstudien einer *Sd*-Nullmutante (Wittbrodt *et al.*, 1989) und die Herstellung von transgenen Fischen mit einer *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*)-Genkopie (Winkler *et al.*, 1994) sprechen dafür, dass *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) ein integrierter Teil des *Tu*-Komplexes darstellt. Die Bedeutung des Gens *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) für die Melanomentstehung wird durch die hohe Expression dieses Gens im Melanom untermauert (Peters, 1990; Zechel *et al.*, 1992a).

Es gibt ein zu *x-erbB^{*a}* hoch homologes Gen, *x-erbB^{*i}* (i; „indispensable“: Anders, A. *et al.*, 1990) bzw. *INV-Xmrk* (Adam *et al.*, 1991) oder *EGFR* (Meierjohann & Schartl, 2006), in dieser Arbeit mit *x-erbB^{*i}* (*EGFR*) bezeichnet, das auch eine geschlechtschromosomale Lokalisation aufweist (Schartl, 1990). Sequenzanalysen schlagen ein Duplikationsgeschehen des Gens *x-erbB^{*i}* (*EGFR*) aufgrund einer nicht-homologen Rekombination mit einem unbekanntem Locus *D* in *X. maculatus* vor (Adam *et al.*, 1993), zu *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) führend. Dabei ist das Protoonkogen u.a. zu einer neuen Promoterregion gelangt und hat dabei transformierende Eigenschaften erhalten. Es wird im Melanom überexprimiert und ein Austausch von zwei As führt zu einer konstitutiven hohen Aktivität des Rezeptors (Gomez *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) ist *x-erbB^{*i}* (*EGFR*) im Genom aller untersuchten, xiphophorinen Genome, *X. helleri* einschließend, präsent. Der Abstand der beiden Gene *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) und *x-erbB^{*i}* (*EGFR*) beträgt vermutlich unter 300 kb (Gutbrod & Schartl, 1999).

Im Melanom konnte eine hohe Aktivität des Proto-Oncogens *x-src* nachgewiesen werden, aber auch im gesunden Gewebe des Gehirns der melanomtragenden Fische ist eine erhöhte Aktivität nachweisbar (Schartl *et al.*, 1982). Die pp60^{*x-src*}-Aktivität im zentralen Nervensystem korreliert mit der Malignität der Melanome (Schartl *et al.*, 1985). Weiter erwies sich, dass der Phosphatidylinosit-Turnover mit der *x-src*-Aktivität korreliert (Gronau, 1987; Präfrock, 1988; Smith *et al.*, 1991). Werden die beiden Aktivitäten im gesunden Gewebe gegeneinander geplottet, können sie als ein Prognose-Parameter für die Suszeptibilität und Malignität von Tumoren eingesetzt werden (Anders & Zechel, 1994).

Kazianis *et al.* (1998, 2000) haben eine Lokalisation vom Gen *CDKN2X* zu dem *R_{Diff}*-tragenden Chromosom von *Xiphophorus* festlegen können. Es wird im xiphophorinen Melanom überexprimiert und die humanen, homologen Gene spielen in humanen Tumoren, Melanome inklusive, eine Rolle als Tumor Suppressoren. Es wurde vorgeschlagen, dass das Gen *CDKN2X* dem Gen *R_{Diff}* entsprechen könnte.

Problemstellung dieser Arbeit

In dieser Arbeit habe ich einen Schlüssel zum Verständnis der kompartimentalen Regulation des *onc*-Gens bzw. der Bildung von Pigmentzellmustern und Tumoren gesucht. Hinweise auf solche Regulationsgene waren mir aus der *Drosophila*-Genetik bekannt. Auch hier gibt es Gene, die für die Musterbildung der Fliegen verantwortlich sind. Diese Gene hatten durch die Entdeckung einer gemeinsamen DNA-Sequenz, die Homöobox, großes Interesse gefunden (McGinnis *et al.*, 1984b; Scott & Weiner, 1984). Die Homöobox ist in der Evolution, von Anneliden bis zum Menschen, gut konserviert (McGinnis *et al.*, 1984a). Der Gedanke war, dass möglicherweise xiphophorine Gene, die mit den musterbildenden Genen bei *Drosophila* verwandt sind, bei *Xiphophorus* bei der Spezifizierung von Pigmentzellmustern beteiligt sein könnten. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die für den Hintergrund wichtigen entwicklungs-spezifischen Gene von *Drosophila* (siehe unten), die Homöobox allgemein (siehe S. 22), die häufige Cluster-Anordnung von Homöoboxen (siehe S. 23) und die Kenntnisse der Funktion von den inzwischen vielzählig bekannten homöobox-enthaltenden Genen (siehe S. 26) gegeben.

HOMÖOBOX-ENTHALTENDE GENE

Entwicklungs-spezifische Gene

Die Homöobox hat ihren Namen durch den Anteil in homöotischen Genen erhalten, die mutiert zu homöotischen Transformationen führen können. Homöotische Transformationen sind entwicklungs-spezifische Anomalitäten, bei der ein Körperteil sich mit der Charakteristik eines anderen Körperteils entwickelt. Viele Beispiele der Homöosis wurden im vorletzten Jahrhundert von Bateson (1894) beschrieben, der auch den Namen dieses Phänomens geprägt hat. Homöotische Mutationen sind für eine Reihe von Organismen, u.a. für Pflanzen, Insekten, Echinodermen, Krebstiere, Fische, Reptilien und Säuger beobachtet worden. Diese Transformationen wurden schon von Bateson als wichtige genetische Veränderungen vorgeschlagen, die benutzt werden könnten, um Gene zu identifizieren, die das Wachstum und die Musterbildung bei der Entwicklung kontrollieren.

Das Phänomen der Homöosis ist besonders für *Drosophila* ausführlich untersucht worden. Durch Mutationsstudien wurden Gene identifiziert, die den Bauplan der Taufliege bestimmen. Die Gene der Morphogenese lassen sich in drei Gruppen einteilen, die zusätzlich zu den homöotischen Genen die mütterlichen Gene und die Segmentierungsgene umfassen (Zusammenfassungen von Akam, 1987 und Ingham, 1988). Schon in der Oocyte werden die räumlichen Koordinaten der Fliege, die dorso-ventrale und anterior-posteriore Achse, durch mütterliche Gene (z.B. *bicoid*, *bcd*) festgelegt. Nach der Befruchtung folgt, je nach Position im Ei und Konzentration verschiedener mütterlicher Genprodukte, die Aktivierung der Segmentierungsgene. Es gibt drei Untergruppen der Segmentierungsgene, deren Aktivität zu einer Segmentierung der Embryonen führt, die "gap"- (z.B. *hunchback*, *hb*), die "pair-rule"- (z.B. *fushi tarazu*, *ftz*) und die "segment-polarity"-Gene (z.B. *engrailed*, *en*). Nach der Metamerisierung

fängt die Differenzierung der einzelnen Segmente an, die für eine morphologische und funktionelle Musterbildung sorgt. Hierbei spielen die homöotischen Gene eine wichtige Rolle. Das bekannteste Beispiel dieser Genklasse ist das Gen *Antennapedia* (*Antp*). Eine Mutation dieses Gens kann eine Lokalisation des Beinpaars, das normalerweise auf dem zweiten Thoraxsegment sitzt, anstelle des Antennenpaars auf dem Kopf verursachen. Die Abgrenzung der Expressionsdomänen der homöotischen Gene ist sowohl von der mütterlich-organisierten Genaktivität, als auch durch die Aktivität der Segmentierungsgene definiert.

Die Aktivität der Gene, die die frühen Ereignisse der Embryogenese steuern, wird durch ein diffiziles, regulatorisches Netzwerk kontrolliert. Gruppen von entwicklungs-spezifischen Genen regulieren Gruppen anderer Gene in einer hierarchischen Anordnung, indem auch die Aktivität von Genen innerhalb einer Gruppe von gegenseitigen, regulatorischen Kreisen beeinflusst werden.

Homöoboxen

Die Suche nach den Schlüsselgenen, die die embryologischen Vorgänge steuern, hatte durch das Auffinden der Homöobox, ein Bestandteil von vielen entwicklungs-spezifischen Genen, einen deutlichen Fortschritt gemacht. Die Entdeckung der Homöobox wurde die Entdeckung des Jahres 1984 genannt (Maddox, 1984), und die Folgen dieser Auffindung, die eine Vielzahl neuer Forschungsvorhaben stimuliert hat, wurde von einigen Wissenschaftlern als eine "Homöo Verrücktheit" bzw. als ein "Homöobox Fieber" beschrieben (Marx, 1986; Wilkins, 1986).

Die Entdeckung der Homöobox resultierte aus der Kenntnis der *Drosophila* Embryogenese und der Erforschung formalgenetisch bekannter Entwicklungsgene mit molekularbiologischen Methoden. Durch das Klonieren und Charakterisieren der Gene *Antp*, *ftz* und *Ultrabithorax* (*Ubx*) wurden homologe Bereiche der Gene gefunden (McGinnis *et al.*, 1984b; Scott & Weiner, 1984). Die Homologie beschränkt sich auf ca. 180 bp und wurde, wegen des Vorkommens in homöotischen Genen, die Homöobox genannt. Die entsprechende Aminosäuresequenz, die Homöodomäne, besitzt ein DNA-bindendes „Helix-Schleife-Helix“-Motiv und eine Interaktion mit der DNA ist durch Strukturanalysen gezeigt worden (Übersicht von Gehring *et al.*, 1994).

Die Entwicklungsgenetik, die bei *Drosophila* gut ausgearbeitet war, fehlte weitgehend bei den Vertebraten, was das Klonieren von Genen und das Verständnis der molekularen Mechanismen der Ontogenese zu einem anscheinend unerreichbaren Ziel machte (diskutiert von u.a. McGinnis, 1994). Die Entdeckung einer gemeinsamen Gensequenz, der Homöobox, in vielen musterbildenden Genen bei *Drosophila* und deren Konservierung in der Evolution, eröffnete einen Zutritt zu den entwicklungs-spezifischen Genen der Vertebraten.

Homöoboxen sind nicht nur, wie der Namen sagt, ein Bestandteil von homöotischen Genen, sondern sind auch in anderen Typen entwicklungs-spezifischer Gene ausfindig gemacht worden. Inzwischen sind bei *Drosophila* über 60 Gene bekannt, die Homöoboxen enthalten (McGinnis, 1994). Es wird geschätzt, dass 0,1% des vertebralen Genoms aus Homöobox Genen besteht (Stein *et al.*, 1996). In den vielen Homöoboxen,

die charakterisiert sind, wurden unterschiedliche Homologien mit den zuerst charakterisierten Homöoboxen gefunden. Es wurde dadurch notwendig, Kriterien für die Zuordnung von Proteinen mit einem "Helix-Schleife-Helix"-Motiv zu den Homöodomän-Proteinen festzulegen. NMR und röntgenkristallographische Strukturanalysen haben Aminosäuren aufdecken können, die für die Sekundär- und Tertiärstrukturen und für die Interaktion der Homöodomänen mit der DNA von Bedeutung sind (Otting *et al.*, 1988; Qian *et al.*, 1989; Kissinger *et al.*, 1990; Otting *et al.*, 1990). Diese Struktureigenschaften sind in der Evolution sehr gut erhalten, was auf hoch konservierte Aminosäuren in allen Homöodomänen zurückzuführen ist (Wolberger *et al.*, 1991). Nachdem die stark konservierten Aminosäuren bekannt waren, konnten die Kriterien eines Homöodomän-Proteins festgelegt werden. Nach diesen Kriterien ist z.B. das Hefe-Protein MAT α 2 mit einem Homöodomän-Motiv versehen, obwohl die Homöodomäne eine Homologie von nur 28% mit der Homöodomäne von *Antp* aufweist (Shepherd *et al.*, 1984). Demgegenüber sind die viralen und bakteriellen regulatorischen Proteine mit einem "Helix-Schleife-Helix"-Motiv nicht als Homöodomän-Proteine zu klassifizieren (Scott *et al.*, 1989).

Aufgrund der unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der Homöodomänen und des Expressionsmusters der Homöobox Gene, können die homöobox-enthaltenden Gene in Klassen eingeteilt werden (siehe z.B. Scott *et al.*, 1989). Eine große Zahl der heute bekannten Homöoboxen zeigt eine hohe Homologie zu den früh entdeckten Homöoboxen der Gene *Antp*, *Ubx* und *ftz*, die Klasse *Antp* (siehe Übersicht von Deschamps & Meijlink, 1992). Die Klassen haben eine interspezifische Gültigkeit, wobei generell gilt, dass mit der Evolution die Zahl der Gene in den einzelnen Klassen zunimmt. Die homöobox-enthaltenden Gene bilden eine Super-Familie von Transkriptionsfaktoren, die bei den Vertebraten u.a. die große Familie *Hox* umfasst (siehe unten).

Cluster-Anordnung der Homöoboxen

Die homöotischen Gene von *Drosophila* mit einer Homöobox der Klasse *Antp* sind in zwei Genclustern lokalisiert; das *Antennapedia*-Complex, ANT-C (mit den homöotischen Genen *lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr* und *Antp*), und das *Bithorax*-Complex, BX-C (mit den homöotischen Genen *Ubx*, *abd-A*, *Abd-B*). Diese Komplexe aus homöotischen Genen wurden mit *HOM-C* und die entsprechenden Gene als *HOM*-Gene bezeichnet (Akam, 1989). Lewis (1978) beobachtete, dass die Reihenfolge der homöotischen Gene entlang des Chromosoms in dem BX-C ihren Funktionsbereichen entlang der anterior-posterioren Achse der Tiere entsprach. Diese Beobachtung wurde von Kaufman und seinen Kollegen auf die homöotischen Gene des ANT-C ausgedehnt (Kaufman *et al.*, 1980, 1990), wobei die Gene vom ANT-C für den anterioren und die Gene vom BX-C für den posterioren Bereich verantwortlich sind. Molekulare *in situ*-Analysen der embryonalen Genexpression haben später ergeben, dass die Lokalisation der Transkriptionsaktivität mit der Funktion der Gene übereinstimmt (Zusammenfassung von McGinnis & Krumlauf, 1992). So entspricht die Reihenfolge der Gene auf den Chromosomen sowohl dem Aktivitäts- als auch dem Funktionsbereich derselben entlang dem Körper.

Eine Clusteranordnung von Homöoboxen der Klasse *Antp* konnte auch sehr früh für andere Tierarten festgestellt werden (z.B. Hart *et al.*, 1985; Colberg-Poley *et al.*, 1985b; Harvey *et al.*, 1986). Besonders intensiv erforscht wurden die Homöoboxen der Maus und des Menschen, diese weisen eine sehr ähnliche genomische Organisation der clusterangehörigen Homöoboxen auf (siehe Abb. 4, S. 25). Die Zahl der Homöoboxen bei den Säugern ist höher als bei *Drosophila*, und 39 Homöoboxen in 4 Komplexen sind ausfindig gemacht worden, was vermutlich auf zwei Duplikationsgeschehen in der Evolutionsgeschichte zurückzuführen ist (Kappen *et al.*, 1989; Akam, 1989; Boncinelli *et al.*, 1991; Zeltser *et al.*, 1996).

Einige Homöoboxen von *Drosophila* weisen eine viel höhere Homologie zu den clusterangehörigen Homöoboxen der Vertebraten, als zu den anderen Homöoboxen von *Drosophila* auf (z.B. Carrasco *et al.*, 1984), und ein Expressionsmuster in diskreten anterior-posterioren Regionen der Embryonen wurde für viele Gene festgestellt (z.B. Awgulewitsch *et al.*, 1986; Gaunt *et al.*, 1986; Toth *et al.*, 1987; Utset *et al.*, 1987). Gründliche vergleichende Studien konnten diese Fakten zusammenstellen, und es wurden Homologien zwischen den beiden Clustern der Taufliege und den Clustern der Maus bzw. des Menschen festgestellt (Gaunt *et al.*, 1988; Duboule & Dollé, 1989; Graham *et al.*, 1989). Die Homöobox Gene können in 13 paralogen Gruppen eingeteilt werden (siehe Abb. 4, S. 25). Neben der Sequenzhomologie und Reihenfolge in den Clustern zeigen die Gene der paralogen Gruppen eine Verwandtschaft im anterior-posterioren Expressionsmuster. Ein kollinearer Zusammenhang zwischen der Reihenfolge der Gene entlang den Chromosomen und ihre Expression bzw. Funktion entlang der anterior-posterioren Achse des Embryos wird, wie bei der Taufliege, auch für die Gene der Vertebraten deutlich (Krumlauf, 1994). Diese Kolinearität bezieht sich sowohl auf das räumliche, als auch auf das temporale Expressionsmuster, so dass Gene im extremen 3'-Bereich der Cluster als erste während der Embryogenese exprimiert werden, wobei sie die meist anteriore Begrenzung der Expression zeigen. Gene in der 5'-Richtung nehmen progressiv ein späteres und mehr posteriores Expressionsmuster an.

Die in Clustern angeordneten Gene der Homöoboxen, die in bezug auf die Sequenzhomologien, die Reihenfolge in den Clustern und das anterior-posteriore Expressionsmuster eine Verwandtschaft mit den *HOM-C*-Genen von *Drosophila* aufweisen, werden mit *Hox* bezeichnet (Scott, 1992, 1993).

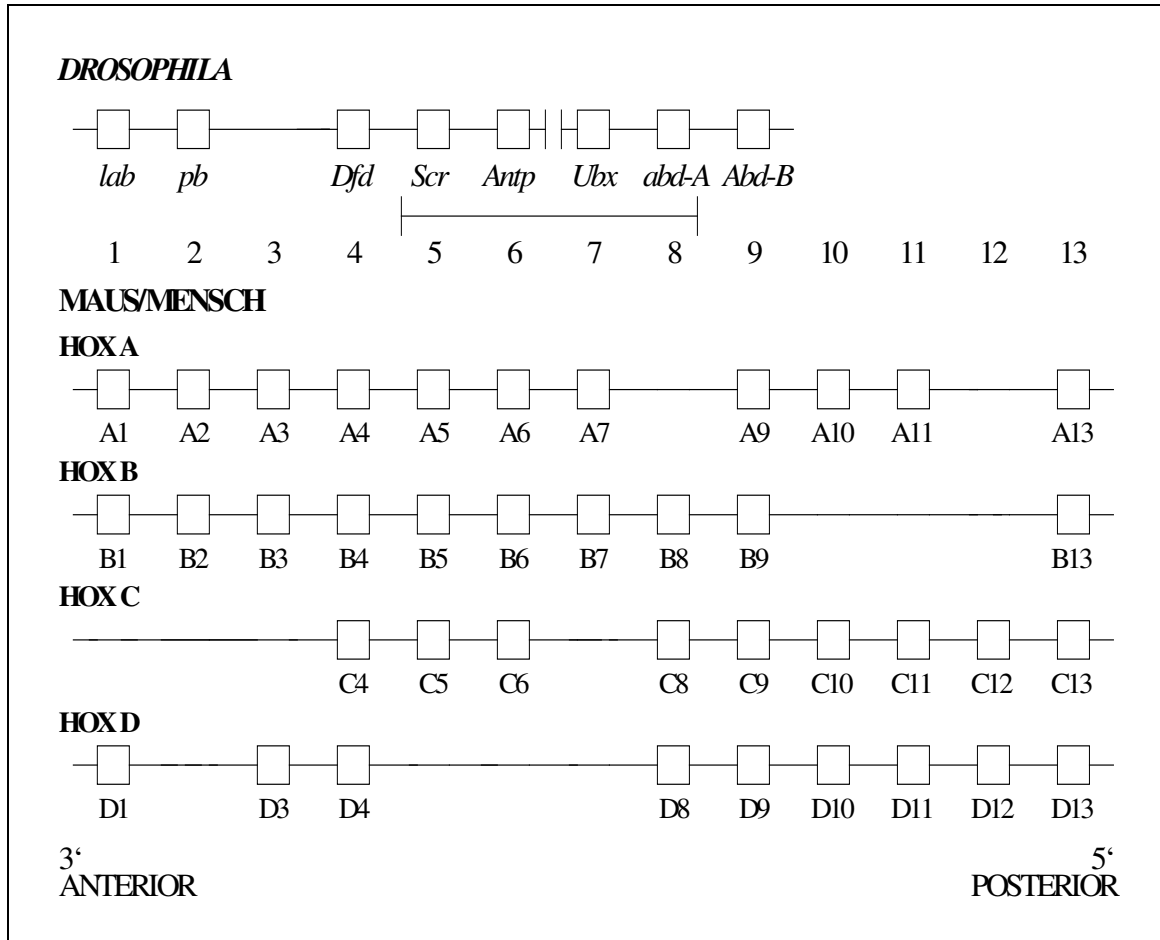


Abb. 4

Die Anordnung von Homöoboxen in den Genclustern von *Drosophila* und der Maus bzw. des Menschen.

Die 4 *Hox*-Cluster von Maus/Mensch werden mit A, B, C und D bezeichnet. Die Gene zeigen aufgrund der Sequenzhomologie, Reihenfolge in den Clustern und des anterior-posterioren Expressionsmusters eine Homologie untereinander und mit den *HOM*-Genen von *Drosophila* und werden in 13 paralogen Gruppen eingeteilt. Die Gene *Scr*, *Antp*, *Ubx* und *abd-A* von *Drosophila* sind den einzelnen paralogen Gruppen 5-8 der Vertebraten nicht genau zuzuordnen. Gene im extremen 3'-Bereich der Cluster werden als erste während der Embryogenese exprimiert, wobei sie die meist anteriore Begrenzung der Expression zeigen. Gene in der 5'-Richtung nehmen progressiv ein späteres und mehr posteriores Expressionsmuster an.

Die cluster-angehörigen Homöoboxen der Vertebraten sind seit 1992 mit einer neuen Nomenklatur versehen (Scott, 1992). In den Namen gehen die Cluster-Angehörigkeit und die paralogen Gruppen ein. Für die Maus sind die Gene mit z.B. *Hoxb-4* und *Hoxd-3*, während die entsprechenden humanen Gene mit *HOXB4* und *HOXD3* zu bezeichnen sind. Eine Übersicht über den Zusammenhang der alten und neuen Nomenklatur wird von Scott (1992) gegeben.

Noch zwei Klassen Homöobox Gene, mit den Genen *Evx1* und *Evx2* bzw. *Emx1* und *Emx2*, sind den Clustern an den 5'-Enden angeschlossen (nicht eingezeichnet), werden aber aufgrund der geringen Sequenzhomologie und des abweichenden Expressionsmusters nicht zu den *Hox*-Genen gerechnet.

Funktion homöobox-enthaltender Gene

Den *Hox*-Genen sind im gesamten Tierreich wichtige, grundlegende Funktionen bei der embryonalen Spezifizierung der anterior-posterioren Koordinaten zuzuschreiben (Übersicht von Deschamps & van Nes, 2005). Mutationen dieser Gene führen zu morphologischen Defekten, die auf bestimmten segmentalen Zonen entlang der anterior-posterioren Achse begrenzt sind und homötischen Transformationen entsprechen können. Die *Hox*-Gene sind auch wichtig für die morphologische Vielfalt auf der evolutionären Ebene (Pearson *et al.*, 2005). Die 5'-liegenden Gene in den Clustern *HoxA* und *HoxD* sind für die korrekte Bildung der Extremitäten, Digitalen und Genitalien der Vertebraten mitverantwortlich (Cobb & Duboule, 2005; Robert & Lallemand, 2006).

Für viele Homöobox Gene, den *Hox*-Genen eingeschlossen, ist eine organspezifische Expression während der Entwicklung und in den adulten Tieren nachgewiesen worden. Homöobox Gene üben wichtige Funktionen sowohl bei der Bildung der Organe und Spezifizierung des Gewebstyps bei der Organogenese als auch bei der Erhaltung der entsprechenden Differenzierungseigenschaften im adulten Organismus aus (diskutiert u.a. von Ohlsson *et al.*, 1993; Di Lauro *et al.*, 1995; Lichty *et al.*, 1995; Oefelein *et al.*, 1996; Samee *et al.*, 2007). Nullmutanten führen zu einer Missbildung und in einigen Fällen auch zu einer Agenesie der exprimierenden Organe.

35 Zielgene der *Hox*-Gene sind gut dokumentiert und eine Vielzahl weiterer Gene sind von der *Hox*-Expression beeinflusst (Übersicht von Pearson *et al.*, 2005). Viele der Zielgene von *Hox*-Genen betreffen die Zellteilung, den Zelltod, die Zelladhäsion und die Zellmigration; Eigenschaften, die u.A. für die Morphologie essentiell sind, aber bei einer dysregulierten Expression auch einer malignen Entartung der Zellen hervorrufen können. Eine Beteiligung der Gene ist für verschiedene Krebsarten nachgewiesen worden (siehe Übersichte von Abate-Shen, 2003; Schulz & Hatina, 2006; Argiropoulos & Humphries, 2007; Hennessy & Mills, 2006; Yu *et al.*, 2007).

Eine Reihe von Genen konnten identifiziert werden, die von Homöobox Genen, die nicht den *Hox*-Genen zuzuordnen sind, reguliert werden. Sie reichen bei den Säugern von z.B. den Genen der Hormone Prolaktin und Wachstumshormon im Gehirn (Bodner *et al.*, 1988; Ingraham *et al.*, 1988), Thyroglobulin und Thyroperoxidase der Schilddrüse (Guazzi *et al.*, 1990), Osteocalcin in den Osteoblasten (Towler *et al.*, 1994), über intestinale Sucrase-Isomaltase im Darmepithel (Suh *et al.*, 1994), Insulin in der Bauchspeicheldrüse (Karlsson *et al.*, 1990; Peers *et al.*, 1994) bis zum retinalen Crystallin (Funahashi *et al.*, 1993).

In der ersten Zeit nach der Identifizierung der Homöobox als Bestandteil von vielen entwicklungs-spezifischen Genen erhoffte man sich hierdurch, die genetische Grundlage einiger entwicklungs-bedingter Defekte erklären zu können. Inzwischen hat man insgesamt 114 Homöodomän-Proteine ausfindig machen können, die eine Beziehung zu verschiedenen humanen, genetischen Krankheitsbildern aufweist (Banerjee-Basu *et al.*, 2000, 2003). Für nur drei der *Hox*-Gene konnten Defekte gefunden werden, die alle mit der korrekten Bildung der Digitalen und Genitalien verbunden sind.

Nicht nur bei den Metazoen konnten homöobox-enthaltende Gene isoliert werden. Auch bei Pflanzen sind zahlreiche Homöobox Gene nachgewiesen worden (Hay *et al.*, 2002;

Kumar *et al.*, 2007; Proveniers *et al.*, 2007). Sie spielen auch hier für die Differenzierung und Morphogenese eine wichtige Rolle. Bei den Basidiomyceten (Casselton & Olesnicky, 1998), wie bei Hefe (Goutte & Johnson, 1994), sind Homöoboxen Bestandteile von Genen, die für die Spezifizierung des Zelltyps entscheidend sind.

Die Homöodomäne ist Bestandteil einer breiten Funktionsgruppe von Transkriptionsfaktoren. Studien der entwicklungs-spezifischen Gene bei *Drosophila* hat zu der Identifikation und Charakterisierung zahlreicher Gene geführt, die für die Morphogenese und Differenzierung der spezifischen Zellverbände im gesamten eukaryontischen Bereich von äußerster Bedeutung sind.

ZIELE

Die Intention dieser Arbeit war homöobox-enhaltende Gene in *Xiphophorus* zu untersuchen. Ein erster Überblick über Homöoboxen im Genom von *Xiphophorus* sollte gegeben werden, mit dem Ziel, Hinweise auf eine eventuelle strukturelle bzw. funktionelle Beteiligung homöobox-enhaltender Gene bei der pigmentalen Musterbildung von *Xiphophorus* ausfindig zu machen.

Zum Nachweis von Homöoboxen dienen homöobox-enhaltende Proben der Gene *Antp* und *ftz* von *Drosophila* als Sonden. Unterschiede in der Struktur homöobox-enhaltender Gene zwischen verschiedenen *Xiphophorus*-Arten und Populationen unterschiedlicher Pigmentzellmuster und eine mögliche Vererbung derselben mit den bekannten genetischen Markern des xiphophorinen Melanom-Modells, der *Tu*-Komplex (*Ptr*, *R_{CO}*, *R_{Gew}*, *onc*) und das Gen *R_{Diff}*, in Rückkreuzungsbastarden sollten gesucht werden, um eine mögliche strukturelle Korrelation zwischen den für die Entstehung von Pigmentzellmustern wichtigen Genen und den homöobox-enhaltenden Genen feststellen zu können. Hierzu wurde beabsichtigt, xiphophorine, homöobox-enhaltende Gene aus genomischen Genbibliotheken zu isolieren und durch Restriktionsenzym-Schnittstellen zu kartieren. Ausgewählte Gene mit Hinweisen auf eine strukturelle oder funktionelle Beziehung zu den Pigmentzellmustern sollten durch Sequenz- und RNA-Expressionsstudien nachgegangen werden.

2. MATERIAL

XIPHOPHORUS

Ich verwendete Fische der Gattung *Xiphophorus* (*Teleostei*, *Poeciliidae*), die aus Wildfängen ihrer natürlichen Habitate in Mittelamerika stammen. Die Fische wurden seit über 30 Jahren im Fischlabor des Genetischen Instituts, Gießen, gezüchtet und erhalten. Eine ausführliche Beschreibung der verschiedenen Arten, Rassen, Populationen und Pigmentzellmuster-Mutanten wird von Anders, A. *et al.* (1973a,b), Kallman (1975), Wolf & Anders (1975) und Basolo (2006) gegeben. Ein Übersicht über die Pigmentzellloci und die pigmentzellloci-tragenden Chromosomen, die für diese Arbeit wichtig sind, wird in der Tab. 1 (siehe S. 33) zusammengefasst.

Xiphophorus maculatus

X. maculatus, der unter den Aquarien-Liebhabern Platyfisch genannt wird, besitzt spezifische Pigmentzellmuster (PSPM; platysspezifische Pigmentzellmuster), die geschlechtschromosomal vererbt werden.

Rio Jamapa (Mexiko)

Die *X. maculatus*-Populationen aus dem Rio Jamapa sind im weiblichen Geschlecht homogametisch (XX), im männlichen Geschlecht heterogametisch (XY).

Die Geschlechter sind durch verschiedene Pigmentzellmuster gekennzeichnet. Das X-Chromosom trägt entweder der Komplexlocus *DrSd*, der eine Rotfärbung (*Dr*: "dorsal red") bzw. schwarze Punkte (*Sd*: "spotted dorsal") in der Rückenflosse bedingen, oder der Komplexlocus *DySp*, der eine schwarze Fleckenzeichnung auf der Körperseite (*Sp*: "spotted") und eine sehr schwache Gelbfärbung (*Dy*: "diluted yellow") verursachen.

Auf dem Y-Chromosom ist der Komplexlocus *ArSr* lokalisiert. *Ar* (*Ar*: "anal red") kodiert für eine Rotfärbung der Analflosse, *Sr* (*Sr*: "stripe-sided") für ein schwarzes Zickzackmuster auf der Körperseite.

Belize River (British Honduras)

Diese Population von *X. maculatus* aus dem Belize River hat statt des X-Chromosoms ein W-Chromosom sowie statt des Y-Chromosoms ein Z-Chromosom. Sie ist im weiblichen Geschlecht heterogametisch (WZ) und im männlichen Geschlecht homogametisch (ZZ). Das Z-Chromosom trägt einen Locus für eine Braunfärbung der Körperseite, *Br* (*Br*: "brown"). Eng an diesen Locus ist der Makromelanophoren-Locus *Ni* gekoppelt, der eine schwarze Fleckenfärbung in serialer Anordnung der Körperseite bewirkt (*Ni*: „Nigra“).

Rio Usumacinta (Mexiko)

Die Weibchen haben eine heterogametische (WZ) und die Männchen eine homogametische (ZZ) Geschlechtsbestimmung. Sie besitzen keine spezifische Pterinophoren- oder Makromelanophoren-Muster.

Xiphophorus variatus

Rio Panuco (Mexiko)

Fische der Art *X. variatus* werden von den Aquarianern ebenfalls Platyfische genannt. Die verwendete Population stammt aus dem Rio Panuco in Mexiko. Die Geschlechtsbestimmung von *X. variatus* ist für Weibchen homogametisch (XX), und für Männchen heterogametisch (XY).

Das X-Chromosom trägt einen Komplexlocus, der für das Makromelanophoren-Muster *Li* (*Li*: "lineatus") kodiert. *Li* ist durch schwarze Linien im Bereich der Seitenlinie gekennzeichnet. An den *Li*-Locus ist ein Pterinophorenlocus *Ye* (*Ye*: "yellow") gekoppelt, der in Weibchen eine schwache Gelbfärbung des dorsalen Rückens bewirkt. Die Expression dieses Locus wird bei Männchen im Fortpflanzungsalter stark erhöht.

Das Y-Chromosom trägt den Makromelanophoren-Locus *Pu* (*Pu*: "punctatus"), der zu kleinen schwarzen Pünktchen auf der dorsalen Körperseite führt, und den Pterinophoren-Locus *Or* (*Or*: "orange"), der in der Schwanzflosse eine leuchtend orange Färbung verleiht.

Xiphophorus helleri

Die Männchen von *X. helleri* sind durch eine zu einem „Schwert“ verwandelte Schwanzflosse gekennzeichnet, die zur Bezeichnung Schwertträger geführt hat. Die Schwertträger haben keine Geschlechtschromosomen (eine polyfaktorielle Geschlechtsbestimmung) und keine Flecken, die denen der Platyfische vergleichbar wären.

Es wurden Populationen aus dem Rio Lancetilla (British Honduras), dem Belize River (British Honduras) und dem Lake Catemaco (Mexiko) untersucht.

Rio Lancetilla (British Honduras)

Diese *X. helleri*-Population wurde für die interspezifischen Kreuzungen und Rückkreuzungen von *X. maculatus* und *X. variatus* verwendet (siehe Abb. 2, S. 17).

Eine Subpopulation dieser Art trägt schwarze Punkte auf der Körperseite. Dieser Stamm wird mit *Db* bezeichnet (*Db*: "dabbed"). Der Melanophorenlocus, der für diese Flecken verantwortlich ist, liegt auf einem Chromosomenpaar, das nicht zu den Geschlechtschromosomen von *X. maculatus* und *X. variatus* homolog ist.

Xiphophorus xiphidium

Rio Soto la Marina (Mexiko)

Diese Tiere sind platyfisch-ähnlich, sie tragen auf der Körperseite ein schwarzes zickzackförmiges Farbmuster, das aus Mikromelanophoren besteht.

Xiphophorus montezumae cortezi

Rio Axtla (Mexiko)

Ein Reticularmuster in der dorsalen Körperhälfte ist deutlich ausgeprägt. Das Schwert ist von einem schwarzen Saum eingefasst. Die Flossen und die Bauchregion der Männchen kann gelb bis orange ausgefärbt sein.

Interspezifische Kreuzungen

Die interspezifischen Kreuzungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, waren alle mit *X. helleri* aus dem Rio Lancetilla durchgeführt. Für die weiteren Bezeichnungen wird deswegen auf eine genauere Spezifizierung verzichtet. Die entstandenen F₁-Bastarde wurden mit *X. helleri* zurückgekreuzt und die Bastarde, die die platispezifischen Pigmentzellloci (PSPL) tragen, erneut mit *X. helleri* zurückgekreuzt. Generationen bis zur 28. Rückkreuzung (F₂₉R) wurden in dieser Arbeit verwendet. Der Grad der Rückkreuzung, der verwendet wurde, wird unter den einzelnen Ergebnissen beschrieben.

Pigmentzellmuster-Mutanten

Im Labor spontan, und durch Röntgenstrahlen induziert, sind Fischpopulationen entstanden, die phänotypisch ein geändertes Pigmentzellmuster aufweisen. Die Kompartimentsmutanten stehen hier in einer Sonderstellung. Bei diesen Mutanten wird das Pigmentzellmuster geändert, indem neue Kompartimente (Co) mit Makromelanophoren betroffen werden. Die Expressionsmutanten behalten die gleichen Pigmentzellloci und Pigmentzellmuster, aber die Stärke und Ausbreitung der Färbung ist geändert. In vielen Fällen sind Translokationen die Auslöser einer erhöhten Expression der Pterinophoren- und Makromelanophoren-Loci. Die Pigmentzellloci der Mutanten werden, zusammen mit den Pigmentzellloci der Wildtypen, in der Tab. 1 (siehe S. 33) zusammengefasst.

DrSd'

DrSd' ist eine Kompartimentsmutante, die von *X. maculatus* mit dem Phänotyp *DrSd* entstanden ist. Diese Fische tragen sowohl Punkte in der Rückenflosse als auch auf der Körperseite. Das kompartiments-spezifische, regulatorische Gen *R_{Pp}* (*Pp*: "posterior part") ist, zusätzlich zu dem kompartiments-spezifischen Gen *R_{Df}* (*Df*: "dorsal fin"), geschwächt worden und erlaubt eine zusätzliche Expression des *onc*-Gens auf der Körperseite (siehe Abb. 2, S. 17).

BrNi^e

Von *X. maculatus BrNi*, mit einer schwarzen Fleckenbildung auf der Körperseite, ist die Kompartimentsmutante *BrNi^e*, die eine Schwarzfärbung des ganzen Körpers, mit Ausnahme der Flossen, entstanden (*Ni^e*: "Nigra extended").

Dr

Von dem *DrSd*-tragenden X-Chromosom eines Rückkreuzungsbastards von *X. maculatus* mit *X. helleri* ist das Makromelanophoren-Muster *Sd*, wahrscheinlich durch einen Translokationsvorgang, verlorengegangen. Die Fische sind, durch den Locus *Dr* bedingt, rot gefärbt (siehe Abb. 65, S. 188; Abb. 67, S. 192).

SdT

In einem Rückkreuzungsbastard mit den Pigmentzellloci *DrSd* ist der Locus *Sd* von dem X-Chromosom von *X. maculatus* auf ein Chromosom von *X. helleri* transloziert worden. Die Fische in den weiteren Rückkreuzungsgenerationen haben eine Grundfärbung wie *X. helleri* mit, durch den Locus *Sd* bedingt, einer zusätzlichen melanotischen Ausbreitung von Pigmentzellen in der Rückenflosse. Der Rotfaktor *Dr* fehlt bei diesen Fischen.

DrSd^{rec}

Bei dieser Mutante ist der Locus *Sd* von einem Individuum mit den beiden mutierten Chromosomen mit den Loci *Dr* bzw. *SdT* auf das *Sd*-deletierte X-Chromosom *Dr* (siehe oben) zurücktransloziert worden, der ursprüngliche Genotyp *DrSd* ist wieder hergestellt worden (*rec*: "recombinant"). Hierbei ist die kompartimentale Expression im Vergleich zu der der *DrSd*-Loci etwas geändert, was eine Involvierung der kompartimentspezifischen, regulatorischen Gene der Pigmentzellloci im Translokationsprozess widerspiegelt.

DrArSr

Hier sind von *X. maculatus* die Pigmentzellloci des Y-Chromosoms, *ArSr*, auf das X-Chromosom (*DrSd*) transloziert worden. Dabei ist der Makromelanophoren-Locus *Sd* verlorengegangen, der Pterinophorenlocus *Dr* ist erhalten. Die Fische sind stark rot gefärbt und besitzen das Makromelanophoren-Muster des *Sr*-Locus.

DrAr

Diese Mutation ist aus der oben beschriebenen Mutation *DrArSr* entstanden, indem der Makromelanophoren-Locus *Sr* verlorengegangen ist. Die Pterinophorenloci *Dr* und *Ar* verleihen den Fischen eine starke, rote Färbung, die noch etwas ausgeprägter als bei der Mutation *DrArSr* zur Erscheinung kommt.

(ArSr)Del

Bei diesen Fischen sind sowohl der Pterinophorenlocus *Ar* als auch der Makromelanophoren-Locus *Sr* verlorengegangen.

ArSr'

An den *ArSr*-Loci auf dem Y-Chromosom von *X. maculatus* sind starke regulatorische Gene gekoppelt. Bei der *ArSr'*-Mutante sind diese Gene mutiert worden und erlauben eine erhöhte Expression des *Sr*-Locus.

Br

Bei einer Mutante von *X. maculatus* aus dem Belize River, ist der *Ni*-Locus verlorengegangen. Das Vorkommen des Z-Chromosoms in den Rückkreuzungsbastarden kann durch eine leichte Braunfärbung der Fische, bedingt durch den Locus *Br*, erkannt werden.

DrLi

In einem interspezifischen F₁-Hybrid von *X. maculatus* und *X. variatus* ist der Makromelanophoren-Locus *Li* vom X-Chromosom des *X. variatus* auf das X-Chromosom von *X. maculatus* transloziert worden. Bei dem Translokationsvorgang ist der Gelbfaktor *Ye* von *X. variatus* und der Makromelanophoren-Locus *Sd* von *X. maculatus* verlorengegangen.

YeLiOrPu

Bei dieser Mutation sind die Pigmentzellloci *OrPu* des Y-Chromosoms auf das X-Chromosom von *X. variatus* transloziert worden. Die Fische besitzen zusätzlich zu der normalen X-chromosomalen Färbung ein oranges Schimmer und eine erhöhte *Pu*-Expression.

MATERIAL

Tab. 1

Übersicht über Pigmentzellloci der Wildtypen und aus dessen entstandenen Pigmentzellmustermutanten von *X. maculatus* und *X. variatus*.

X, Y, W und Z bezeichnen die Geschlechtschromosomen von *X. maculatus* und *X. variatus* und A ein autosomales Chromosom von *X. helleri*. Die Pigmentzellloci und entsprechenden Pigmentzellmuster werden im Text genauer erläutert (siehe S. 28-32).

X. maculatus

| Fluss | Wildtyp/Mutante | Chromosom | Pigmentzell-Loci |
|----------------|------------------|-----------|---------------------------|
| Rio Jamapa | Wildtyp: | X | <i>DrSd</i> |
| | | X | <i>DySp</i> |
| | | Y | <i>ArSr</i> |
| | Mutante: | X | <i>DrSd'</i> |
| | | X | <i>Dr</i> |
| | | A | <i>SdT</i> |
| | | X | <i>DrSd^{rec}</i> |
| | | X | <i>DrArSr</i> |
| | | X | <i>DrAr</i> |
| | | Y | <i>ArSr'</i> |
| Y | <i>(ArSr)Del</i> | | |
| X | <i>DrLi</i> | | |
| Belize river | Wildtyp: | W | -- |
| | | Z | <i>BrNi</i> |
| | Mutante: | Z | <i>BrNi^e</i> |
| | | Z | <i>Br</i> |
| Rio Usumacinta | Wildtyp: | W | -- |
| | | Z | -- |

X. variatus

| | | | |
|------------|----------|---|-----------------|
| Rio Panuco | Wildtyp: | X | <i>YeLi</i> |
| | | Y | <i>OrPu</i> |
| | Mutante: | X | <i>YeLiOrPu</i> |

ANDERE FISCH- UND TIER-ARTEN

Die nicht-xiphophorinen Fischarten und andere verwendete nicht-piscine Tierarten werden in den Tabellen 2 (siehe unten) bzw. 3 (siehe S. 35) aufgelistet.

Tab. 2

Verwendete, nicht-xiphophorine Fischarten.

Folgende Fische wurden freundlicherweise vom Herrn Wutschka, Genetisches Institut Gießen, erhalten: *Cheirodon axelrodi*, *Aplocheilus lineatus* und *Pelvicachromis pulcher*. *Corydoras paleatus* wurde vom Herrn Dr. Förster, Humangenetisches Institut Gießen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. *Danio rerio* und *Poecilia sphenops* wurden käuflich erhalten. Die restlichen Fische waren Bestandteile vom Fischlabor des Genetischen Instituts Gießen.

| Art | Ordnung | Familie |
|-------------------------------|-----------------------|------------------------|
| <i>Cheirodon axelrodi</i> | <i>Cypriniformes</i> | <i>Characidae</i> |
| <i>Danio rerio</i> | " | <i>Cyprinidae</i> |
| <i>Corydoras paleatus</i> | <i>Siluriformes</i> | <i>Callichthyidae</i> |
| <i>Aplocheilus lineatus</i> | <i>Atheriniformes</i> | <i>Cyprinodontidae</i> |
| <i>Poecilia sphenops</i> | " | <i>Poeciliidae</i> |
| <i>Poecilia reticulata</i> | " | " |
| <i>Heterandria bimaculata</i> | " | " |
| <i>Pelvicachromis pulcher</i> | <i>Perciformes</i> | <i>Cichlidae</i> |

MATERIAL

Tab. 3

Verwendete, nicht-piscine Arten.

Die humane DNA war eine Gabe vom Herrn Prof. Dr. Christiansen, Kinderklinik Marburg. *Mus musculus* wurde vom Prof. Dr. Friis, Bern, zur Verfügung gestellt. *Sepia officinalis* war eine Gabe vom Herrn C. Duvos, Zoologisches Institut, Gießen. *Vipera russelli* stammt aus einer Zelllinie des Genetischen Instituts. *Planorbis corneus* stammt aus den Aquarien im Genetischen Institut. DNA aus *Ovis ammonis*, *Columba livia*, *Xenopus laevis* und *Paracentrotus lividus* waren freundlich von P. Kaiser, Genetisches Institut Gießen, zur Verfügung gestellt.

| Art | Stamm | Klasse |
|--|---------------|-------------|
| <i>Homo sapiens</i> (Mensch) | Chordata | Mammalia |
| <i>Mus musculus</i> (Maus) | " | " |
| <i>Ovis ammonis</i> (Schaf) | " | " |
| <i>Vipera russelli</i> (Schlange) | " | Reptilia |
| <i>Columba livia</i> (Taube) | " | Aves |
| <i>Sepia officinalis</i> (Tintenfisch) | Mollusca | Cephalopoda |
| <i>Planorbis corneus</i> (Schnecke) | " | Gastropoda |
| <i>Paracentrotus lividus</i> (Seeigel) | Echinodermata | Echinoidea |

ZELLKULTUREN

PSM

Diese Zelllinie wurde aus einem amelanotischen Melanom eines interspezifischen F₁-Hybrides von *X. maculatus* DySp mit *X. helleri* (albino) angelegt (Wakamatsu, 1981; Wakamatsu *et al.*, 1984). Die Zellen sind morphologisch heterogen. Es handelt sich um eine transformierte Zellkultur (Lind, 1988). Es wurden Zellen der 250. bis 255. Passage verwendet.

A₂

Diese Zelllinie wurde aus Embryonen von *X. xiphidium* angelegt (Kuhn, C. *et al.*, 1979). Die Zellen haben einen fibroblastidären Typus. Es handelt sich um nicht-transformierte Zellen (Lind, 1988). Es wurden Zellen der 295. bis 297. Passage verwendet.

BsT

Diese Zellkultur wurde aus tumortragenden Embryonen des Genotyps *DrLi/ArSr'* angelegt (Petry, H., 1989; Petry, H. *et al.*, 1992).

LUNA

Die Zellkultur LUNA stammt aus einer Hautregion eines tumortragenden Rückkreuzungsbastards mit dem Phänotyp *Sd^T*, die nicht mit Melanom befallen war. Die Zellen sind klein und spindelförmig, wahrscheinlich besteht der größte Teil der Kultur aus Fibroblasten. Die Zellkultur bildet Foci (Tantithakura, 1990; Tantithakura *et al.*, 1993).

FM

Die Zellkultur FM war von einer melanösen Region der Haut vom selben Fisch wie LUNA, d.h. von einem Rückkreuzungsbastard mit dem Phänotyp *Sd^T*, angelegt worden. Die Kultur ist eine Mischkultur, ca. die Hälfte der Zellen bilden Melanin, die andere Hälfte besteht wahrscheinlich aus Fibroblasten (Tantithakura, 1990; Tantithakura *et al.*, 1993).

DRLI

Diese Zelllinie stammt aus einem Hautpräparat von Weibchen mit der genetischen Konstitution *DrLi/DrLi*. Verschiedene, meist fibroblastenartige Zellformen wurden beobachtet. Die Zellkultur bildet Foci (Tantithakura, 1990; Tantithakura *et al.*, 1993).

Danio rerio

Eine Zellkultur angelegt von der Haut eines Weibchens des Zebrafisches (Tantithakura, 1990; Tantithakura *et al.*, 1993).

Corydoras paleatus

Eine Zellkultur angelegt von der Haut des gefleckten Panzerwelses (Tantithakura, 1990; Tantithakura *et al.*, 1993).

Vipera russelli

Die Zelllinie VSW wurde dem Genetischen Institut freundlicherweise von S. Aaronson (Natl. Inst. of Health, Bethesda) zur Verfügung gestellt.

BAKTERIEN

Q359

Der *E. Coli* Stamm Q359 (Karn *et al.*, 1980) wurde in dieser Arbeit für die Arbeiten mit den xiphophorinen, genomischen Genbibliotheken in dem Vektor EMBL 4 und aus dessen isolierten, rekombinanten Phagen verwendet (siehe unten).

Genotyp: *hsdR_k⁻, hsdM_k⁺, supF, ϕ 80^r, P2*

JM 83

Der Bakterienstamm JM 83 wurde als Wirtstamm für den Klonierungsvektor pUC (siehe S. 38) entwickelt (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

Genotyp: *ara, Δ (lac, pro), strA, thi-1, ϕ 80, dlacZ Δ M15*

C600 und C600Hfl

Die Bakterienstämme C600 und C600Hfl (Hoyt *et al.*, 1982) wurden für die Arbeiten mit λ -gt10 (siehe unten) verwendet. Der Bakterien-Stamm C600Hfl wurde für die Selektion rekombinanter Vektoren und der Bakterienstamm C600 für die nicht-rekombinanten Phagen verwendet.

Genotyp C600: *F⁻, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, λ ⁻*

Genotyp C600Hfl: *F⁻, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, supE44, λ ⁻, hflA150*

HB 101

Die rekombinante, erworbene Plasmide p903G und pFS2 wurden in dem Bakterien-Stamm HB 101 (Boyer & Roulland-Dussoix, 1969; Bolivar & Backman, 1979) erhalten.

Genotyp: *F⁻, hsdS20 (r_B⁻, m_B⁻), recA13, ara-14, galK2, lacY1, proA2, rpsL20(Sm^r), xyl-5, mtl-1, supE44, λ ⁻*

PHAGEN

Genomische Genbibliotheken

Die genomischen Genbibliotheken von *X. maculatus*, angelegt von der Population aus dem Rio Usumacinta bzw. aus einem Stamm mit den mutierten Pigmentzellloci *DrLi/ArSr'*, waren von der Frau Dr. C. Zechel und Herrn Dr. S.M. Robertson angelegt worden und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Genbibliotheken waren durch partielle *Sau3A*-Verdaue der genomischen DNA zu Fragmentlängen von ca. 15 kb geschnitten und in dem λ -Vektor EMBL 4 (Frischauf *et al.*, 1983) einkloniert worden.

λ -gt10

In dieser Arbeit wurde der λ -gt10 Vektor (Huynh *et al.*, 1984) für die Anlegung einer genomischen Teil-Genbibliothek verwendet. Der Vektor hat eine Klonierungskapazität von DNA-Fragmenten bis zu 7,4 kb-Länge.

λ -DNA Verpackungsextrakte

Für die Verpackung einer Teil-Genbibliothek in den Vektor λ -gt10 wurde ein Verpackungskit von der Firma Amersham verwendet. Die Extrakte A und B stammen von den *E.coli*-Stämmen BHB2688 bzw. BHB2690 (Hohn & Murray, 1977; Hohn, 1979).

Genotyp BHB2688: N205*recA*⁻ [γ *imm*⁴³⁴, *cIts*857, *b2*, *red3*, *Eam4*, *Sam7*]

Genotyp BHB2690: N205*recA*⁻ [γ *imm*⁴³⁴, *cIts*857, *b2*, *red3*, *Dam15*, *Sam7*]

PLASMIDE

Nicht-rekombinante Plasmide

pUC

In dieser Arbeit wurden die pUC-Plasmide 8/9 und 18/19 für die Subklonierungs-Arbeiten verwendet (Messing *et al.*, 1977; Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Die pUC-Plasmide wurden aus dem Plasmid pBR322 entwickelt. Die pUC-Plasmide 18 und 19 unterscheiden sich von pUC 8 und 9 nur durch die Anwesenheit von extra Restriktionsenzym-Schnittstellen im Polylinker. Die 8 zu 9 und 18 zu 19 Formen unterscheiden sich in der Richtung des Polylinkers.

Rekombinante, erworbene Plasmide

p903G und pFS2

Die Plasmide p903G und pFS 2 waren Geschenke vom Prof. Dr. W. Gehring, Basel. Die Plasmide beinhalten homöobox-enthaltende Regionen der Gene *Antp* und *ftz* von *Drosophila*. Die Plasmide waren in dem Vektor pAT 153 (Twigg & Sherratt, 1980) kloniert und haben dadurch eine Ampicillin-Resistenz, die Tetracyclin-Resistenz ist durch das Einklonieren der Insertionen verlorengegangen.

Das Plasmid p903G besitzt ein 600 bp homöobox-enthaltendes cDNA-Insert des Gens *Antennapedia* (Garber *et al.*, 1983). Das Insert konnte durch das Schneiden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pvu*II erworben werden.

Das Plasmid pFS2 besitzt ein 1310 bp genomisches homöobox-enthaltendes Insert des Gens *fushi tarazu* (Kuroiwa *et al.*, 1984). Für die Hybridisierungsarbeiten wurde der 1030 bp *Pvu*II-*Pvu*II Fragment verwendet.

λ -HAc-69A

Die rekombinante Aktin-Probe stammt aus einem Pseudogen des β -Aktin-Gens bei Hefe (Moos & Gallwitz, 1982, 1983). Der Klon wurde freundlicherweise vom Herrn Prof. Dr. Christiansen, Kinderklinik Marburg, zur Verfügung gestellt. Das 0,6 kb Insert wurde durch einen *Sal*I-*Eco*RI-Doppolverdau gewonnen.

3. METHODEN

Die Zusammensetzung und das Ansetzen der verschiedenen Lösungen werden im Anhang unter den jeweiligen Hauptabschnitten aufgelistet (siehe S. 304). Wenn kein Produzent der Chemikalien angegeben wird, wurden die Chemikalien von der Firma Merck bezogen.

Bei fehlender Angabe von Referenzen zu den Methoden richten diese sich entweder nach Maniatis *et al.* (1982) oder Ausubel *et al.* (1989).

BAKTERIEN-VERFAHREN

Es wurden für die Bakterienanzucht verschiedene Nährmedien verwendet. Transformierte Bakterien wurden, je nach Antibiotikaresistenz der Plasmide, mit einem selektiven Antibiotikum im Medium kultiviert. Für die Selektion von einzelnen, transformierten Bakterien wurden Platten mit der Farbstoffkomponente X-Gal (Sigma) versetzt (siehe unten).

Die Zusammensetzungen der verschiedenen Nährmedien werden im Anhang unter "Bakterien-Verfahren", die Anwendung unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

Agarplatten

Das bakterielle Nährmedium wurde mit 1% (w/v) Agar-Agar (Serva) versetzt, autoklaviert und unter sterilen Bedingungen in Petrischalen (Greiner) gegossen. Sollten die Platten mit einem Antibiotikum oder X-Gal (Sigma) versetzt werden, wurden diese erst im Anschluss an das Autoklaviervorgang nach einer Abkühlung des Mediums auf 55°C diesem hinzugefügt und die Platten anschließend gegossen. Nach dem Festwerden des Mediums erfolgte die Lagerung der Platten bei 4°C.

Ausplattierung von Bakterien

Um Einzelkolonien der Bakterien zu gewinnen, wurde eine Verdünnung einer Übernachtskultur (siehe unten) der Bakterien von 10^{-6} mit Medium hergestellt. 50 µl dieser Bakterienverdünnung wurden auf Agarplatten gegeben und mit einem sterilen Dreieckglasstab auf diesen verteilt. Eine Inkubation der Platten im Brutschrank (37°C, übernacht) führte zum Wachstum von 50-100 Bakterienkolonien, was einem Bakterientiter von $1-2 \times 10^9$ Bakterien/ml Übernachtskultur entspricht.

Übernachtskultur

Ca. 20 µl einer Dauerkultur (siehe unten) oder eine Einzelkolonie des Bakteriums (siehe S. 40) wurden zu 20 ml L-Broth gegeben. Die Bakterien wurden in einem Bakterien-schüttler (37°C, übernacht) vermehrt. Die Bakterienkultur erreichte dadurch die stationäre Wachstumsphase mit $1-2 \times 10^9$ Bakterien/ml.

Dauerkultur

0,6 ml einer frischen Übernachtskultur (siehe S. 39) einer Einzelkolonie des Bakteriums wurde mit 0,4 ml sterilem Glycerol (87%) vermischt. Die Dauerkulturen können für mehrere Jahre bei -70°C gelagert werden.

Präparation von kompetenten Bakterien

Die Bakterien wurden nach der Publikation von Hanahan (1983) sowie mit Modifikationen nach der Anleitung des EMBO-Kurses "Molecular Cloning" (Athen, 1984) für die Transformation mit rekombinanten Plasmiden (siehe S. 55) kompetent gemacht.

Eine Einzelkolonie des Bakteriums JM 83 wurde zu 5 ml ψ -Medium gegeben und bei 37°C in einem Bakterienerschüttler bis zu einer leichten Trübung des Mediums herangezogen. Diese 5 ml Vorkultur wurden zu 100 ml vorgewärmtem ψ -Medium gegeben und bis zu einer OD_{600} von 0,48 weiterkultiviert. Diese Bakterienkultur wurde auf Eis abgekühlt, die Bakterien bei 1000g und 4°C für 5 Minuten geerntet. Die weiteren Schritte wurden im Kühlraum auf Eis ausgeführt. Die Bakterien wurden in 30 ml eiskaltem Transformationspuffer I unter vorsichtigem Vortexen aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für eine Stunde. Die Bakterien wurden erneut durch eine Zentrifugation pelletiert und in 4 ml eiskaltem Transformationspuffer II vorsichtig resuspendiert. Diese transformierten Bakterien wurden dann in 200 μl Portionen in Eppendorffgefäße verteilt und anschließend in $\text{N}_2(l)$ eingefroren. Die Dauerlagerung erfolgte bei -70°C .

PHAGEN-VERFAHREN

Kultivierung von Phagen auf Agarplatten

Je nach Fragestellung wurden 10^2 - 10^5 Phagen in 100 μl SM-Puffer aufgenommen, mit 100 μl $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Lösung und 100 μl einer frischen Bakterienkultur (OD_{600} von 0,5-0,6) vermischt und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Phagen/Bakterien/ $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Mischung wurde schnell mit 3 ml flüssigem Top-Agar oder Top-Agarose, Medium mit 0,7% (w/v) Agar-Agar (Serva) bzw. Agarose (Biorad) versetzt, bei 50°C vermischt und auf 85 mm Agarplatten gegossen. Nach dem Festwerden der Agarplatten wurden diese in einem Brutschrank (37°C , übernacht) inkubiert. In einem trüben Bakterienrasen erschienen die einzelnen Phagen als klare Regionen, *pfu* ("plaque forming units").

Wurden 120 mm Agarplatten benutzt, wie bei der Durchmusterung von Genbibliotheken (siehe S. 51), betragen die entsprechenden Volumina der Phagenverdünnung, der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Lösung und der Bakterienkultur jeweils 200 μl . Das Volumen für die Top-Agarose betrug für die großen Agarplatten 10 ml.

Phagentiter-Bestimmung

Eine logarithmische Verdünnungsreihe der Phagen, je nach Titer eine Verdünnung von 10^{-2} - 10^{-7} , wurde in SM-Puffer hergestellt. Die Phagen wurden übernacht auf Agarplatten kultiviert (siehe S. 40) und die *pfu* am nächsten Tag ausgezählt.

Gewinnung einzelner rekombinanter Phagen

Der *pfu*, der sich bei der Genbibliothek-Durchmusterung als positiv erwiesen hatte (siehe S. 51), wurde mit einer sterilen Pasteurpipette aus der Top-Agarose entnommen und zu 1,0 ml SM-Puffer, versetzt mit einem Tropfen Chloroform, gegeben. 1-2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur erlaubte den Phagen die Herausdiffusion aus dem Agar.

Anzucht des erwünschten Phagen auf Agarplatten (Plattenlysat)

10^5 Phagen wurden mit Top-Agar auf Agarplatten ausplattiert. Nach ca. 16 Stunden Inkubation waren die *pfu* konfluent und die Platten wurden mit 5 ml SM-Puffer überschichtet. Nach einem vorsichtigen Schwenkvorgang der Platten für mindestens 2 Stunden bei 4°C wurde der SM-Puffer wieder abgesaugt, die Platten mit 1 ml SM-Puffer gespült und dieser Waschpuffer zu der ersten Phagenlösung gegeben. 0,1 ml Chloroform wurde hinzugefügt, das Ganze mit Hilfe eines Vortex vorsichtig durchmischt. Eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 4000g und 4°C entfernte etwaige Agarreste. Die Phagen konnten bei 4°C gelagert werden, wobei mit einer Abnahme des Phagentiters mit zunehmender Lagerungszeit gerechnet werden musste.

DNA-ISOLIERUNG

Genomische DNA-Isolierung

Die DNA wurde in Anlehnung an die Methode von Blin & Stafford (1976) extrahiert.

Wenn DNA aus mehreren Fischen oder aus anderen Tierarten oder Zellkulturen isoliert wurde, wurde nach der Methode im Makroansatz verfahren. DNA aus Einzelfischen wurde nach der Methode im Mikroansatz isoliert. Das Prinzip der Isolierung ist für die beiden Verfahren gleich, nur die Volumina, Zeiten und Reaktionsgefäße unterscheiden sich.

Aus den Fischen wurden Organe wie Gehirn, Hoden, Nieren, Leber, Herz, Milz und Kiemen gleich nach der Dekapitation der Fische entnommen. Aus den Mäusen wurden Gehirn und Leber für die DNA-Extraktion verwendet. Die Schnecken wurden als Ganzes in $N_2(l)$ zermörsert. Aus den Tintenfischen wurden die Herzen verarbeitet.

Genomische DNA-Isolierung im Makroansatz

Das Tiermaterial wurde entweder zuerst in $N_2(l)$ zermörsert und anschließend zu dem Extraktionspuffer (DNA) gegeben, oder direkt dem Extraktionspuffer zugefügt und anschließend vorsichtig mit einem Glashomogenisator (Potter Elvehjem) zerkleinert. Das Volumen des Extraktionspuffers betrug mindestens das 5-fache des Gewebevolumens.

Das Homogenat wurde im Wasserbad entweder bei 80°C für 3 Stunden oder bei 37°C übernacht inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Ein halbes Volumen Phenol wurde zu dem Homogenat hinzugegeben und dieses in einem Rundkolben für 10 Minuten vorsichtig emulgiert. Ein halbes Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde daraufhin hinzugefügt und das Ganze für weitere 10 Minuten emulgiert. Die organische Phase wurde durch eine Zentrifugation (5000g, 15°C, 5 Minuten) von der wässrigen, DNA-enhaltenden Phase getrennt. Die wässrige Phase wurde vorsichtig mit einer breitlumigen, abgeschnittenen Pipettenspitze abgehoben und mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) für 10 Minuten nochmals emulgiert. Eine erneute Zentrifugation trennte wieder die beiden Phasen.

Die wässrige, DNA-enhaltende Phase wurde mit 0,3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2 Volumina absolutem, eiskaltem Äthanol versetzt. Das Ganze wurde vorsichtig vermischt, die gefällte DNA um einen Glasstab gewickelt. Der Glasstab samt DNA wurde vorsichtig in 70%-igen Äthanol getaucht und anschließend luftgetrocknet. Die DNA wurde durch Lösung in 0,5-1,0 ml TE-Puffer von dem Glasstab entfernt.

Genomische DNA-Isolierung im Mikroansatz

400 µl Extraktionspuffer (DNA) wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben und diese auf Eis gestellt. Die Organe wurden aus einem Fisch entnommen und zu dem kalten Extraktionspuffer hinzugegeben. Mit einem Potter, den Eppendorfgefäßen angeformt, wurde das Gewebe vorsichtig zerkleinert. Nach einer Inkubation bei 80°C für 3 Stunden wurde das Homogenat auf Eis abgekühlt. Eine Phenol/Chloroform-Extraktion, wie oben beschrieben, wurde angeschlossen, wobei der Unterschied darin bestand, dass die Extraktion in Eppendorfgefäßen erfolgte und eine 10-malige Durchmischung der Gefäße ausreichte. Die wässrigen und organischen Phasen wurden durch eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 14000g getrennt. Nach der letzten Chloroform-Extraktion wurde die wässrige DNA-Phase mit 0,3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2 Volumina Äthanol versetzt, vermischt und die ausgefällte DNA mit einer Pipettenspitze entnommen. Die DNA wurde in einem neuen Eppendorfgefäß, mit 1 ml 70%-igen Äthanol gefüllt, gewaschen und anschließend in ein neues Eppendorfgefäß überführt und hier getrocknet. Abschließend wurde die DNA, je nach geschätzter, gewonnener Menge, in 50-200 µl TE-Puffer gelöst. Organe aus einem Fisch ergaben 100-200 µg DNA.

Phagen DNA-Isolierung

Diese Methode richtet sich nach Davis *et al.* (1986). Die isolierte Phagen-DNA wurde für analytische Zwecke rekombinanter Vektoren (siehe S. 52) und als Ausgangsmaterial für weitere Klonierungsarbeiten (siehe S. 52) verwendet.

4×10^9 Bakterien, Typ Q359 (OD₆₀₀=1 entspricht 8×10^8 Bakterien/ml), wurden aus einer frischen Übernachtskultur entnommen und für 10 Minuten bei 4000g abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 1,5 ml SM-Puffer aufgenommen und mit 6×10^7 Phagen versetzt. Eine Inkubation für 20 Minuten bei 37°C erfolgte. Die Phagen wurden in einer

Flüssigkultur gezüchtet, indem die Bakterien/Phagen-Lösung zu 100 ml vorgewärmtem NZCYM-Medium gegeben wurde und inkubiert, unter starkem Schütteln bei 37°C, bis eine Lyse erfolgte. Es wurde dann 5 ml Chloroform zur vollständigen Bakterienlyse hinzugefügt und die Inkubation für weitere 30 Minuten fortgesetzt. Die Bakterienreste wurden daraufhin abzentrifugiert (8000g, 4°C, 20 Minuten), der Überstand mit RNase A (Boehringer) und DNase I (Boehringer), je in Konzentrationen von 10 µg/ml, bei 37°C für eine Stunde verdaut. Ein gleiches Volumen 20%-iges PEG 6000 (Serva) mit 2 M NaCl in SM-Puffer wurde dazugegeben und eine Stunde in vollständiger Ruhe im Eiswasser inkubiert. Die Phagen wurden bei 10000g für 20 Minuten, 4°C, abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 12 ml SM-Puffer bei 4°C übernacht gelöst.

Die Suspension wurde erneut abzentrifugiert (8000g, 4°C, 5 Minuten) und der Überstand mit 0,1% SDS und 5,2 mM EDTA für 15 Minuten bei 68°C inkubiert. Danach erfolgte eine 10 minütige Extraktion mit einem halben Volumen Phenol, gefolgt von einer Extraktion mit einem halben Volumen Chloroform/Isoamylalkohol. Die wässrigen und organischen Phasen wurden durch eine Zentrifugation (2000g, 15°C, 5 Minuten) getrennt. Die wässrige, obere Phase wurde mit einem Volumen Isopropanol versetzt und für 20 Minuten bei -70°C gestellt. Eine erneute Zentrifugation (10000g, 4°C, 10 Minuten) fällte die Phagen-DNA, das Pellet wurde mit 70% Äthanol gewaschen und in 200 µl TE-Puffer aufgenommen. Diese Präparation ergab ca. 100 µg Phagen-DNA.

Plasmid DNA-Isolierung

Bei der Isolierung von Plasmiden wurde nach drei verschiedenen Methoden verfahren: Zum Einen wurde die Reinigung über einen CsCl/Ethidiumbromid-Dichtegradienten (siehe unten) durchgeführt, die im Hinblick auf Quantität und Qualität der Plasmide ein sehr gutes Ergebnis hervorrief. Zum Anderen wurden Qiagen-Säulen (siehe S. 44) bei der Plasmidisolierung eingesetzt. Die auf diese Weise isolierte Plasmide waren von höchster Qualität und die Methode zeitsparend. Drittens wurde ein sehr zeitbesparenderes Verfahren angewandt, die Isolierung im Mikroansatz, das aber mit einer deutlich geringeren Ausbeute und reduzierter Plasmidqualität verbunden war (siehe S. 45). Diese Plasmide waren für die Durchmusterung und die Grobanalyse rekombinanter Plasmide ausreichend.

Plasmid DNA-Isolierung über einen CsCl/Ethidiumbromid-Dichtegradienten

Diese Methode wurde von Clewell und Helinski (1969) beschrieben.

Bei "multi-copy"-Plasmiden (z.B. pUC-Plasmide) wurden 2 ml einer Übernachtskultur zu 400 ml L-Broth mit Ampicillin gegeben und Übernacht kultiviert. Bei "low-copy"-Plasmiden (z.B. pAT 153) wurde eine selektive Amplifikation der Plasmide mit Chloramphenicol durchgeführt: 400 ml L-Broth mit Ampicillin wurden mit 4 ml Übernacht-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 inkubiert. Chloramphenicol wurde hinzugegeben, die Bakterienkultur daraufhin für 16 Stunden weiterinkubiert.

Die Bakterien wurden durch eine Zentrifugation (8000g, 4°C, 10 Minuten) geerntet. Das Bakterienpellet wurde anschließend angeteigt, in 20 ml 0,9%-iges NaCl resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die Bakterien wurden danach in 20 ml eiskaltem Zuckrose-Puffer aufgenommen, mit 4 ml Lysozym-Lösung versetzt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. 8 ml 0,25 M EDTA (pH 8,0) wurde zugefügt und das Ganze für 5 Minuten auf Eis weiterinkubiert. 24 ml einer Detergenz-Lösung brachte die Bakterien zur Lyse (30°C, 10 Minuten). Eine Zentrifugation (40000g, 2°C, 45 Minuten) pelletierte die chromosomale DNA und Zellreste.

Der Überstand wurde mit 12 ml 0,25 M EDTA (pH 8,0), 72 g CsCl (s) (Serva) und 12 ml 1 mg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Dichte, gemessen durch einen Refraktionsindex von 1,397 (entspricht einem Dichtekoeffizienten von 1,69), wurde mit CsCl (s) bzw. 0,25 M EDTA (pH 8,0) eingestellt. Die Suspension wurde in vier 30 ml Polyallomer-Zentrifugentuben (Kontron) verteilt, diese mit einem Deckel verschlossen und mit dickflüssigem Paraffin aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte bei 90000g, 20°C, für 60-65 Stunden.

Die Plasmidbande, die unter UV-Licht sichtbar gemacht wurde, wurde mit einer 20 Gauge-Spritze herausgezogen. Das Ethidiumbromid wurde mit CsCl/TEG-gesättigtem Isopropanol aus der Plasmid-Lösung extrahiert: Ein gleiches Volumen des CsCl/TEG-gesättigten Isopropanols wurde zu der Plasmid-Fraktion gegeben, vermischt, die obere ethidiumbromid-enhaltende Isopropanol-Phase abpipettiert und dann verworfen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis keine Färbung des Isopropanols mehr eintrat. Die Plasmid-Lösung wurde gegen 4x1 Liter TEG dialysiert (Serva; Ausschlussgröße 10 000), die Plasmide anschließend mit 0,3 M Na-Acetat (pH 5,2) und zwei Volumina Äthanol gefällt und durch eine Zentrifugation (15000g, 4°C, 20 Minuten) pelletiert. Das Pellet wurde in 70%-igen Äthanol gewaschen und anschließend in TE-Puffer gelöst. Die Plasmide wurden bei -20°C gelagert. 400 ml Kultur ergab 1-2 mg Plasmide.

Plasmid DNA-Isolierung über eine Ionenaustauschsäule (Qiagen)

Diese Isolierungsmethode der Plasmide wurde als Kit von der Firma Qiagen angeboten. Das Prinzip der Bakterienlyse entsprach dem von Birnboim & Doly (1979) beschriebenen (siehe S. 45). Anstelle einer Phenol- und Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion wurde der Lysatüberstand über die Qiagen-Säule von Verunreinigungen befreit. Das Kit wird als Mini-, Midi- und Maxi-Kit angeboten, die entsprechenden Säulen haben eine DNA-bindende Kapazität von 10, 100 bzw. 500 µg. Das Prinzip der Plasmidreinigung wird hier nur für die Midi-Säulen erläutert.

50 ml einer Übernachtskultur von Bakterien mit rekombinanten Plasmiden wurden abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 4 ml P1-Puffer gelöst. 4 ml P2-Puffer wurden untermischt und eine Inkubation für 5 Minuten erfolgte. 4 ml eines P3-Puffers neutralisierte die Mischung und die DNA- und Membranreste wurden durch eine Zentrifugation (14000g, 4°C, 15 Minuten) pelletiert. Der Überstand wurde auf eine Qiagen-Säule geladen, die mit 2 ml QB-Puffer equilibriert worden war. Die Säule wurde anschließend mit 2 ml QC-Puffer gewaschen und die Plasmide mit 2 ml QF-Puffer eluiert. Die DNA wurde mit 0,8 Volumen Isopropanol gefällt, gleich darauf durch einer

Zentrifugation (14000g, 4°C, 15 Minuten) pelletiert, in 70%-igen Äthanol gewaschen und in 100 µl TE-Puffer gelöst. 50 ml Bakterienkultur, die mit pUC-Plasmiden transformiert worden waren, ergaben ca. 100 µg Plasmide.

Plasmid DNA-Isolierung im Mikroansatz

Diese Methode beruht auf einer Publikation von Birnboim & Doly (1979).

1,5 ml einer Übernachtskultur wurde durch eine Zentrifugation für 30 Sekunden bei 14000g geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl kalter PEB I-Lösung aufgenommen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 200 µl frisch angesetzte PEB II-Lösung wurde hinzugegeben, 5 Minuten auf Eis inkubiert, und das Ganze mit 150 µl PEB III-Lösung und erneuter Inkubation für 5 Minuten auf Eis neutralisiert. Eine 5 minütige Zentrifugation bei 14000g pelletierte die Bakterien-DNA. Der Plasmid-enthaltende Überstand wurde für 2 Minuten mit einem halben Volumen Phenol und einem halben Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) emulgiert und die wässrige Plasmid-enthaltende Phase durch eine erneute Zentrifugation (14000g, 5 Minuten) von den organischen Lösungsmitteln getrennt. Die Plasmide wurden mit 2 Volumina Äthanol gefällt, abzentrifugiert (14000g, 4°C, 15 Minuten), in 70%-igen Äthanol gewaschen, in 30 µl TE-Puffer aufgenommen und mit 3 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. 1,5 ml Bakterienkultur ergab ca. 10 µg Plasmide.

ANALYSE DER DNA

Spektralfotometrische Analyse der DNA

Die DNA kann, bedingt durch ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, durch eine Messung der OD_{260} quantitativ bestimmt werden. Eine OD_{260} gleich 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg dsDNA/ml.

Durch die Bildung der Quotienten unterschiedlicher optischer Dichten im Verhältnis zur OD_{260} können Aussagen über die Reinheit der DNA gemacht werden. Reine DNA hat z.B. den Quotienten: $OD_{280}/OD_{260}=0,54-0,55$.

Restriktionsenzymatische Verdauung der DNA

Mit der gewonnenen DNA, sei es genomische-, Plasmid- oder Phagen-DNA, wurden Verdauungen mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Der Verdauungserfolg erfolgte in einem Volumen von 10 µl pro µg DNA in einem geeigneten Restriktionsenzym-Puffer. 2-4 U Restriktionsenzym wurden pro µg DNA verwendet. Der Verdauungserfolg erfolgte für 3 Stunden bei 37°C. Verwendete Restriktionsenzyme und Restriktionsenzym-Puffer werden im Anhang beschrieben (siehe S. 309).

Elektrophoretische Auftrennung der DNA

Für die meisten Zwecke bestanden die Elektrophoresegele aus 0,8% (w/v) Agarose (Biorad) in TBE-Puffer, bei bestimmten Fragestellungen wurde auch 0,4%- (für die Auftrennung großer Fragmente) und 1,2%-igen (für die Auftrennung kleiner Fragmente) Agarosegele eingesetzt. Die Elektrophorese selbst erfolgte ebenfalls in TBE-Puffer. Als Gelkammern wurden horizontale Submerge-Gelkammern (Pharmacia, BRL) verwandt. Die Elektrophorese erfolgte mit 0,5-3 V/cm für die großen Gele (20 cm x 20 cm; 300 ml) und 4-8 V/cm für die kleinen Gele (10,6 cm x 7,8 cm; 50 ml).

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen in einen Gellade-Puffer (DNA) aufgenommen. Die restriktionsenzym-verdaute DNA wurde vor dem Auftragen zusätzlich für 5-10 Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele in einer Ethidiumbromid-Lösung, 10 µg EtBr/ml H₂O, für 20 Minuten gefärbt und in Wasser für 2x10 Minuten entfärbt. Die Gele wurden mit einer Polaroid-Kamera (MP4 Land Kamera) unter UV-Licht (Transilluminator-UVP, 257 nm) fotografisch festgehalten (Polaroid-Filme, Typ 667). Sollte in der Analyse die Länge bestimmter DNA-Fragmente bestimmt werden, wurden die Gele mit einem Lineal fotografiert.

Die Lauflänge von Standardfragmenten wurde gegen die Fragmentlänge derselben auf ein halb-logarithmisches Papier aufgezeichnet. Mit Hilfe dieser Standardkurve konnten die spezifischen Fragmentlängen durch ihre Laufgeschwindigkeit abgelesen werden. Als Standard dienten kommerzielle Standardlösungen (Boehringer). Standard I, II und III wurden auch selbst hergestellt; λ-DNA, Typ cI 857 Sam 7 (Boehringer) wurde für diesen Zweck verwendet.

Elektrophoretische Analyse der DNA

Hochmolekularität der genomischen DNA

Es war von Wichtigkeit, die zu isolierende, genomische DNA während des Extraktionsvorgangs nicht durch Scherkräfte abzubrechen. Fragmentlängen von mindestens 40-50 kb waren erwünscht. Dies wurde durch gleichzeitige Elektrophorese mit ungeschnittener λ-DNA, 49 kb, nachgewiesen.

Analyse von Plasmid- und Phagen-DNA

Ungeschnittene Plasmid-DNA ist zirkulär und nahm in der Gelelektrophorese mehrere verschiedene Positionen an; die "supercoiled" Form entsprach zwei intakten DNA-Strängen, die "nicked" Form entstand durch einzelsträngige Brüche, und die linearen Formen waren durch doppelsträngige Brüche gekennzeichnet. Multimere Formen der Plasmide kamen vor. Die verwendete Phagen-DNA war linear und belegte in ungeschnittener Form nur eine Position in dem Elektrophoresegel.

Durch die begrenzte Länge der Vektoren-DNA und deren einklonierter DNA-Stücke kamen bei der Gelelektrophorese nach Restriktionsenzymverdau DNA-Fragmente mit

definierten Längen zum Vorschein. Dadurch war es möglich, sowohl die Vektoren, als auch die inklonierten DNA-Stücke, durch das Schneiden mit Restriktionsenzymen zu charakterisieren (siehe auch "Kartierung von Restriktions-Schnittstellen", S. 52).

Präparative Southern Blot Verfahren

Übertragung von DNA auf Filtermembranen (Southern Blot)

Das Prinzip der DNA-Übertragung von einem Gel auf eine Filtermembran wurde von Southern (1975) entwickelt. In dieser Arbeit wurde nach einer etwas modifizierten Methode verfahren, die sich nach der Beschreibung des Filtermembran-Herstellers DuPont-NEN (1985) richtete.

Nach fotografischer Dokumentation und Größenadjustierung wurde das Gel zunächst in 0,25 N HCl für 15 Minuten behandelt, wodurch die Übertragung der längeren DNA-Fragmente erleichtert worden ist. Die DNA wurde dann in einer Denaturierungs-Lösung für 30 Minuten einzelsträngig gemacht, anschließend erreichte das Gel in einem Neutralisations-Puffer für 30 Minuten wieder einen neutralen pH.

Die Filtermembran (GeneScreen*Plus*TM, DuPont-NEN) wurde so zugeschnitten, dass sie auf jeder Seite 3-5 mm das Gel überragte. Die Filtermembran wurde in destilliertem Wasser angefeuchtet und für 10 Minuten in 10xSSC-Lösung behandelt. 3 Lagen Whatman 3MM-Papier und Handtuchpapier in 10-20 cm Stapelhöhe wurden in Gelgröße angefertigt.

Bedingt durch Kapillarkräfte wurde die DNA aus dem Gel auf die Filtermembran durch einen Strom von 10xSSC übertragen. Über einer mit 10xSSC gefüllter Schale diente Whatman 3MM-Papier, über einer Glasplatte gelegen, als Brücke. Auf die Glasplatte wurde das Gel und darüber die zugeschnittene Filtermembran luftblasenfrei gelegt. Darauf folgten die zurechtgeschnittenen Whatman 3 MM-Papiere, die gleichfalls luftblasenfrei aufgelegt wurden, und der Stapel mit Handtuchpapieren. Eine Glasplatte, beschwert mit einem Gewicht von 0,5-1,0 kg, sorgte für einen guten Kontakt zwischen den verschiedenen Lagen. Um das Gel herum wurde die Papierbrücke mit Plastikfolie abgedeckt; dies sollte einen Kurzschluss des Flüssigkeitsstroms verhindern. Das Blot-Verfahren wurde für 16 Stunden bis zu 3 Tagen durchgeführt, das Handtuchpapier wurde regelmäßig ausgewechselt.

Southern Analysen der genomischen DNA

Um Homologien bestimmter Gene oder Genabschnitte zu genomischer DNA aufdecken zu können, wurden Southern Analysen vorgenommen. Mit Hilfe desselben Verfahrens konnten auch die Restriktionsenzym-Fragment-Längen (RFL) bestimmter Gene oder Genabschnitte im Genom festgelegt werden.

10 µg der genomischen DNA wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut (siehe S. 45), mit 0,3 M Na-Acetat (pH 5,2) und zwei Volumina Äthanol gefällt und abzentrifugiert. Die DNA wurde mit demselben Restriktionsenzym nachverdaut, erneut

gefällt und in TE-Puffer gelöst. Die DNA wurde dann mit Gellade-Puffer (DNA) versetzt, denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe S. 46). Nach dem Färben der Gele mit Ethidiumbromid und fotografischer Dokumentation wurden die Gele auf eine Filtermembran geblottet (siehe S. 47) und anschließend diese mit einer geeigneten Sonde hybridisiert (siehe S. 61).

Southern Analysen der rekombinanten Vektoren

Bei der Analyse von rekombinanten Vektoren stellten sich zwei Fragen: Erstens, enthalten die rekombinanten Vektoren die erwünschten DNA-Fragmente, und zweitens, welche Position haben diese Sequenzen in den rekombinanten Klonen. Für diese Zwecke wurde die unverdaute DNA (0,5 µg) oder die restriktionsenzym-verdaute DNA (0,5-1,5 µg DNA) nach der Gelelektrophorese durch ein Southern Blot Verfahren auf eine Filtermembran transferiert (siehe S. 47), die mit einer geeigneten Sonde hybridisiert wurde (siehe S. 61).

ISOLIERUNG SPEZIFISCHER DNA-FRAGMENTE

Bei der Herstellung neuer rekombinanter Plasmide (siehe S. 52) wurde in einigen Fällen das erwünschte Genstück vor dem Einbau in den Vektor isoliert. Auch für den Nachweis bestimmter Sequenzen bei Southern Analysen, Northern Analysen und Genbibliothek-Durchmusterungen (siehe S. 61) wurden bestimmte Abschnitte eines Gens aus rekombinanten Plasmiden isoliert und als Gensonden eingesetzt.

Fragmente von über 400 bp wurden in Agarosegelen aufgetrennt und anschließend über Ionenaustausch-Säulen gereinigt (siehe unten). Fragmente von weniger als 400 bp wurden in Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mittels einer Elution von dem Gelrest befreit (siehe S. 50).

Isolierung spezifischer DNA-Fragmente von über 400 bp

40 µg des rekombinanten Plasmids wurden in einem Volumen von 400 µl mit den geeigneten Restriktionspuffern und Restriktionsenzymen für 3 Stunden bei 37°C verdaut (siehe S. 45) und mit Gellade-Puffer (DNA) versetzt.

Die Elektrophorese fand in 0,8%-1,2% (w/v) LMP-Agarose (BRL), je nach Länge der zu isolierenden DNA-Abschnitte, bei 4°C statt (siehe S. 46). Die äußeren beiden Gelspuren wurden nach der Elektrophorese abgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Unter UV-Licht wurde die Position der gewünschten DNA-Banden mit einer Skalpell markiert. Die äußeren markierten Gelspuren wurden in die richtige Position neben das Gel gelegt, eine 0,5 cm breite Bande mit dem erwünschten DNA-Fragment konnte somit herausgeschnitten werden.

Die DNA wurde von dem Agarose-Gel alternativ nach einem der beiden unten beschriebenen Verfahren getrennt: Entweder wurde die DNA durch eine Ionenaustausch-Säule (NACS-PREPAC™; BRL) von der Agarose getrennt, oder sie wurde erst von

dem Gel durch eine Elektroelution befreit und anschließend über eine Ionenaustausch-Säule (Qiagen; Diagen) gereinigt. Die Ausbeute beider Verfahren war vergleichbar; von 40 µg rekombinanten Plasmiden wurden ca. 4-8 µg Insertion gewonnen.

Trennung der DNA von der Agarose über eine NACS-Säule

Für die Trennung der DNA von der Agarose wurden Ionenaustausch-Säulen, NACS-PREPACTM (BRL), verwendet. Die empfohlene Methodik des Herstellers wurde befolgt.

Das herausgeschnittene Gelstück wurde in einem Wasserbad bei 70°C geschmolzen. Für DNA-Stücke, die kürzer als 1 kb waren, wurden zu dem geschmolzenen Gel vier Volumina einer 0,25 M NaCl-Lösung in TE-Puffer (pH 7,2) zugesetzt. Für DNA-Stücke, die länger als 1 kb waren, wurden zu dem geschmolzenen Gel vier Volumina eine 0,625 M NaCl-Lösung in TE-Puffer (pH 7,2) zugesetzt. Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei 70°C wurde die DNA-Lösung nochmals für 10 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Puffer A, B, C und D wurden alle bei 42°C gehalten.

Die NACS-Säulen wurden mit 3 ml Puffer D hydriert und mit 3-5 ml Puffer A (für DNA-Stücke kürzer als 1 kb) oder Puffer C (für DNA-Fragmente länger als 1 kb) equilibriert. Die DNA-Lösung wurde mit einer Geschwindigkeit von ca. 1ml/Minute auf die Säule aufgetragen. Nach der Applikation wurde die Säule mit 3-5 ml Puffer A bzw. Puffer C gewaschen. Die DNA wurde mit 400 µl Puffer B (für DNA-Fragmente kürzer als 1 kb) bzw. Puffer D (für DNA-Fragmente länger als 1 kb) eluiert und mit 2 Volumina absolutem Äthanol gefällt. Nach der Pelletierung (14000g, 4°C, 30 Minuten) wurde die DNA mit 1 ml 70% Äthanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl TE-Puffer gelöst. Um das Insert qualitativ und quantitativ beurteilen zu können wurde 1 µl für die Elektrophorese eingesetzt.

Trennung der DNA von der Agarose mittels Elektroelution und Qiagen-Säulen

Die 0,5 cm breiten Gelstreifen, die die zu isolierenden DNA-Fragmente enthalten, wurden aus dem LMP-Gel, wie oben beschrieben, herausgeschnitten. Die Gelstreifen wurden anschließend in Dialyseschläuche gelegt, diese mit 3 ml TBE-Puffer gefüllt und luftblasenfrei verschlossen. Die Gelstreifen wurden in die Gelkammer zurückgelegt und die Elektrophorese erfolgte für 2 Stunden mit 3,5 V/cm. Anschließend wurde die Richtung der Elektrophorese für 2 Minuten revertiert. Der DNA-enhaltende TBE-Puffer wurde aus den Dialyseschläuchen entnommen, die Dialyseschläuche, den Gel-Streifen enthaltend, mit 2 ml TBE-Puffer nachgespült.

Die DNA-Lösung wurde zum Entfernen von Gelresten filtriert (0,8 µm, Schleicher & Schüll) und mit 1/10 Volumen 5 M NaCl und 1/20 Volumen 1 M MOPS (pH 7,0) mit 15% Äthanol versetzt. Die Applikation auf die Qiagen-Säule erfolgte nach der Beschreibung des Herstellers (Diagen) (siehe S. 44).

Isolierung spezifischer DNA-Fragmente von weniger als 400 bp

Für die Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten, die kleiner als 400 bp waren, wurden nach dem restriktionsenzymatischen Verdau die Fragmente in einem 8%-igen Polyacrylamidgel [Acrylamid:Bisacrylamid (29:1, w/w), mit Ammoniumpersulphat und TEMED versetzt, siehe "Sequenz-Verfahren", S. 55] aufgetrennt [Gelkammer LKB 2001; Gelgröße (14x14x0,075) cm³; 6 V/cm]. Nach einer Ethidiumbromid-Färbung der DNA (siehe S. 46) wurden die gefragten Fragmente aus dem Gel herausgeschnitten. Die DNA wurde von dem Gelrest mittels einer Elution getrennt: Das Gelstück wurde zerkleinert und in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml; Eppendorf) mit dem zweifachen Volumen Elutionspuffer überführt. Die Elution fand im Wasserbad bei 37°C für 3 Stunden statt. Eine Zentrifugation für eine Minute (14000g) trennte die gelöste DNA von den Gelstückchen. Das Gel wurde mit einem kleinen Volumen Elutionspuffer gespült. Anschließend wurde die DNA mit 2 Volumina Äthanol gefällt, in TE (pH 7,6) gelöst und erneut gefällt, bevor die DNA wiederholt in TE (pH 7,6) gelöst wurde.

HERSTELLEN, SCREENEN UND CHARAKTERISIEREN REKOMBINANTER DNA

Herstellen einer genomischen Teil-Genbibliothek

Um Teile eines bestimmten, homöobox-enthaltenden Gens *Xi-X* (siehe Ergebnisse S. 72ff.) zu isolieren, wurde eine Teil-Genbibliothek *EcoRI*-geschnittener DNA von ca. 2,2 kb im Phagenvektor λ -gt10 angelegt.

Gewinnung der genomischen Insertions-DNA

100 μ g DNA von *X. maculatus DrSd/DrSd* wurde mit *EcoRI* verdaut (siehe S. 45) und anschließend mit 0,3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2 Volumenteilen Äthanol gefällt. Die verdaute DNA wurde in 100 μ l TE-Puffer in einer Konzentration von 1 μ g/ μ l gelöst, mit Gellade-Puffer (DNA) versetzt und auf ein 0,8%-iges (w/v) LMP-Agarosegel (BRL) aufgetragen. Mit Hilfe eines λ -*HindIII*-Standards wurde ein Gelstreifen in dem Fragmentlängen-Bereich 2,2 kb der *EcoRI*-verdauten, genomischen DNA herausgeschnitten. Das auf dieser Weise isolierte Gelstück wurde bei 70°C geschmolzen und die Agarose von der DNA mit Hilfe einer NACS-Säule (BRL) getrennt (siehe S. 49). Es wurden Bedingungen eingehalten, die für Fragmente länger als 1 kb zutrafen. Die DNA wurde in 10 μ l TE-Puffer gelöst und ein Aliquot der DNA elektrophoretisch in einem Agarose Gel analysiert, um die Quantität und Qualität der gewonnen DNA beurteilen zu können.

Einbau der isolierten DNA in einen Phagen-Vektor

Das Protocolon λ -gt10 System von der Firma Promega Biotec wurde als Vektorsystem für die Herstellung der Teil-Genbibliothek verwendet. Die Phagen wurden als *EcoRI*-verdaute und phosphatase-behandelte Phagenarme angeboten. Die Ligation der isolierten

genomischen Insert-DNA in die Phagenarme erfolgte in der vom Hersteller beschriebenen Weise:

0,5-1,0 µg der gewonnenen DNA wurde mit 1 µg λ-gt10 in Ligase-Puffer mit 0,5 U T₄-Ligase (Boehringer) in einem Volumen von 5 µl bei 12°C übernacht ligiert. Nach der Ligation wurde 3 µl der ligierten DNA in λ-Phagenköpfe verpackt (siehe unten).

Verpackung der rekombinanten Phagen-DNA

Für die Verpackung der hergestellten, rekombinanten λ-gt10-DNA wurde ein Verpackungskit von der Firma Amersham verwendet. Das Kit besteht aus Proteinextrakten von zwei verschiedenen, aber komplementären Mutanten der Phagen-Verpackung. Durch Mischung der beiden Extrakte kann die DNA zu infektiösen Phagen verpackt werden. Die Verpackung erfolgte gemäß der Beschreibung des Herstellers:

Es war von äußerster Wichtigkeit, die Experimente schnell auszuführen, im Besonderen die Verwendung der Extrakte A und B gleich nach dem Auftauen auf Eis. Die DNA, die verpackt werden sollte, wurde zu dem Extrakt B gegeben und gleich darauf der Extrakt A vorsichtig untergemischt. Der Inhalt wurde durch eine 10-sekündige Zentrifugation gesammelt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. 0,5 ml SM-Puffer mit 10 µl Chloroform wurde anschließend untermischt. Die Phagen konnten in diesem Zustand bei 4°C aufbewahrt werden.

Isolierung spezifischer Phagenklone (Genbibliothek-Durchmusterung)

Die Methode der Durchmusterung von Genbibliotheken basiert auf den Ergebnissen von Benton & Davis (1977) und Grunstein & Hogness (1975). Filtermembranen (NEF 978 A) von der Firma DuPont-NEN wurden hierzu benutzt.

Für die Durchmusterung der Genbibliotheken wurden 120 mm Agarplatten mit 10 ml Top-Agarose für die Kultivierung der Phagen verwendet. Die Phagen wurden auf Agarplatten, bis zu 1000 *pfu* pro Platte, ausplattiert (siehe S. 40). Die Teil-Genbibliothek in λ-gt10 wurde mit dem *E. Coli*-Stamm C600Hfl und die vollständigen, genomischen Genbibliotheken in EMBL 4 mit dem *E. coli*-Stamm Q359 ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Platten für eine Stunde bei 4°C gelagert und anschließend von den Agarplatten zwei Abdrücke der *pfu* auf Filtermembranen (NEF 978 A) angefertigt. Nach dem Auflegen der Filter wurden diese und die Agarplatten mit einer Nadel markiert, um die positiven *pfu* nach der Filterhybridisierung ausfindig machen zu können. Der erste Filter wurde für 3 Minuten auf die Agarplatte gelegt, das Duplikat für 6 Minuten. Nach der *pfu*-Übertragung von den Platten auf die Filtermembranen wurden die Membranen für 4 Minuten auf 0,5 N NaOH und anschließend 4 Minuten auf einen neutralisierenden Puffer von 1,0 M Tris·Cl (pH 7,5) gelegt.

Die Filterduplikate wurden mit geeigneten Sonden, in dieser Arbeit mit den homöobox-enthaltenden Sonden von *Antp* oder *ftz*, hybridisiert (siehe S. 61). Der *pfu*, der sich auf

beiden Filtern als positiv erwies, wurde mit einer sterilen Pasteurpipette aus der Top-Agarose entnommen. Phagen aus dieser *pfu* wurden gewonnen (siehe S. 41) und für einen zweiten bzw. dritten Screen, im Prinzip wie das erste Screenen verlaufend, aber mit einer reduzierten Phagenzahl, eingesetzt.

Kartierung von Restriktions-Schnittstellen

Zur Charakterisierung der aus den Genbibliotheken isolierten Klone wurden Restriktionskarten hergestellt. Der isolierte Klon, der auf beiden Filtern positiv war, wurde isoliert und vermehrt (siehe S. 41), die DNA aus den Phagen isoliert (siehe S. 42) und Verdauung mit verschiedenen Restriktionsenzymen vorgenommen (siehe S. 45). In einigen Fällen wurden Doppelverdauungen mit zwei verschiedenen Enzymen durchgeführt, entweder gleichzeitig im selben Restriktionsenzym-Puffer oder durch eine zwischenzeitliche DNA-Fällung und Wechsel des Puffers. Die gewonnenen DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Längen der Fragmente gemäß ihrer Laufgeschwindigkeit während der Gelelektrophorese aus einer Standardkurve abgelesen (siehe S. 46). Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme wurden miteinander verglichen. Die bekannten Schnittstellen der Vektoren wurden bei der Auswertung der Fragmentlängen berücksichtigt.

Für die Grobkartierung größerer DNA-Fragmente war es in vielen Fällen notwendig, Teile dieser DNA-Fragmente in einen neuen Vektor zu klonieren (siehe unten) und diese verkürzten Klone erneut mit Restriktionsenzymen zu charakterisieren. Die Informationen der kleineren Subklone wurden danach auf das ganze DNA-Stück übertragen und zusammengefasst. Von den Subklonen spezifischer DNA-Fragmente konnten auch Feinkarten mit häufig schneidenden Enzymen hergestellt werden.

Sowohl der ursprüngliche Phagenklon als auch die neu erstellten Subklone wurden restriktionsverdaut (siehe S. 45), elektrophoretisch aufgetrennt (siehe S. 46), geblottet (siehe S. 47) und die Filtermembranen mit einer Gensonde hybridisiert (siehe S. 61). Auf diese Weise konnte die Position des Genabschnitts von Interesse, hier die Homöobox, in den Restriktionskarten bestimmt werden.

Subklonierung von DNA-Fragmenten

Für bestimmte Fragestellungen war es erwünscht, kleinere Abschnitte der gewonnenen, rekombinanten Vektoren zu isolieren und als eigene Subklone zu erhalten. Die Subklone wurden u.a. für die Restriktionskartierung, die Sequenzierung und die Expressionsanalysen benötigt. Wenn für die Subklonierung geeignete Restriktionsschnittstellen in den Insertionen vorhanden waren, wurden spezifische Restriktionsfragmente subkloniert (siehe "Subklonierung spezifischer DNA-Fragmente", S. 53). Wenn keine geeigneten Restriktionsschnittstellen in den Insertionen vorhanden waren, wurden die Insertionen sukzessive von einem Ende mit Hilfe der Enzyme Exonuklease III und Nuklease S1 verkürzt und nach einer Ausfüllungsreaktion mit DNA-Polymerase die beiden Enden wieder vereint (siehe "Sukzessive Verkürzung der

Insertionen", unten). Nach der Transformation der Bakterien mit den neu hergestellten rekombinanten Plasmiden und Ausplattierung der Bakterien auf selektionierende Agarplatten wurden Einzelkolonien der Bakterien entnommen und restriktionsenzymatische Analysen ihrer DNA unternommen, um die gewonnenen Klone zu charakterisieren (siehe "Transformation und Durchmusterung von Bakterien", S. 55).

Subklonierung spezifischer DNA-Fragmente

Die Subklonierung spezifischer DNA-Fragmente verlief nach zwei verschiedenen Prinzipien: Zum Einen wurde das erwünschte, subzuklonierende Fragment vor dem Einbau in den Vektor isoliert (siehe S. 48). Damit konnten nur Subklone mit diesem spezifischen Fragment entstehen. Zum Anderen wurde nach der "Shotgun"-Methode verfahren, indem ein Verdau von einem größeren Genabschnitt vorgenommen wurde und alle gewonnenen Restriktionsfragmente in den Vektor eingebaut wurden. Eine Vielfalt verschiedener Subklone konnten dadurch entstehen.

Die Subklone wurden in den Vektoren pUC 8/9 oder pUC 18/19 hergestellt. Sowohl die pUC-Vektoren, als auch der subzuklonierende Genabschnitt, der je nach Fragestellung sich entweder im Vektor λ -gt10, EMBL 4 oder pUC befand, wurden zu je ca. 3 μ g mit den geeigneten Restriktionsenzymen (siehe S. 45) geschnitten. Bei der Verwendung von nur einem Enzym wurde zur Vermeidung der Selbstligation des Vektors ein Phosphatase-Verdau durchgeführt. Der Phosphatase-Verdau erfolgte in einem Phosphatase-Puffer mit 0,5 U CIP (Phosphatase aus Kälberdarm, Boehringer) pro μ g DNA bei 37°C für 45 Minuten. 0,5 μ g-Aliquots wurden aus den beiden verdauten Einheiten entnommen und elektrophoretisch auf Vollständigkeit des Verdau untersucht. Die verdaute DNA wurde mit 0,3 M Na-Acetat und zwei Volumina Äthanol gefällt, mit 70% Äthanol gewaschen und das Pellet in sterilem H₂O in einer Konzentration von 0,1 μ g DNA/ μ l gelöst.

Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit 300 ng des verdauten Vektors und entweder 900 ng des verdauten größeren Genabschnitts mit Vektor oder 100 ng des isolierten DNA-Fragments in Ligase-Puffer mit 1 U T₄-Ligase (Boehringer) bei 15°C für 4-16 Stunden.

Sukzessive Verkürzung der Insertionen

Bei der Verkürzung der Insertionen durch Exonuklease III/Nuklease S1 wurde in Anlehnung an die von Guo *et al.* (1983) beschriebenen Methode vorgegangen.

Die Exonuklease III ist eine Nuklease, die Nukleotide spezifisch von Enden mit 5'-überhängenden Nukleotiden entfernt. Das Enzym ist spezifisch für doppelsträngige DNA und entfernt Nukleotide in 3'-5' Richtung. Nach einer Verkürzung des einen DNA-Strangs durch die Exonuklease III, entfernt Nuklease S1 die dadurch entstandene einzelsträngige DNA. Durch die Aktivitäten der beiden Enzyme sind die Insertionen vom einen Ende verkürzt worden, das Ausmaß der Verkürzung ist von der Basenzusammensetzung der DNA, der Enzymkonzentration und der Reaktionszeit abhängig. Um die beiden Enden des rekombinanten Plasmids wieder zu vereinigen,

METHODEN

werden kurze Regionen einzelsträngiger DNA mit einer DNA-Polymerase ausgefüllt, und die Ligation der entstandenen stumpfen Enden erfolgt.

Das zu verkürzende Plasmid wurde zuerst zwei Mal durch einen CsCl-Gradienten gereinigt (siehe S. 43), denn die Exonuklease III ist sehr empfindlich gegenüber Verunreinigungen. 15 µg des gereinigten Plasmids wurden zuerst mit dem Restriktionsenzym, das das 3'-überhängende, geschützte Ende produzierte, im geeigneten Restriktions-Puffer verdaut. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde durch eine elektrophoretische Analyse eines Aliquots des verdauten Plasmids bestätigt. Der Verdau mit dem Restriktionsenzym, das das 5'-überhängende, angreifbare Ende produzierte wurde anschließend durchgeführt. Die Qualität des verdauten Plasmids wurde durch eine Elektrophorese getestet.

Um eventuelle Faktoren, die bei den anschließenden Nuklease-Verdauen stören könnten, zu beseitigen, wurden die verdauten Plasmide mit Phenol und Chloroform extrahiert, und die entstandene wässrige Phase mittels einer Säulenchromatographie von eventuellen Phenol- und Chloroform-Resten und Salzen befreit. Die angewandte Säule (Sephadex G-50, Pharmacia) und Bedingungen der Chromatographie entsprachen denjenigen, die auch bei der Trennung Radioaktiv-markierter Sonden von freien Nukleotiden Verwendung fanden (siehe S. 61). Damit war bekannt, in welchen Fraktionen die Plasmide von der Säule eluiert wurden. Die Plasmide wurden anschließend mit Äthanol gefällt und in einer Konzentration von 0,2 µg DNA/µl in destilliertem Wasser gelöst.

5 µg restriktionsenzym-verdauter, gereinigter Plasmide wurden zuerst in 50 µl Exonuklease-Puffer für 2 Minuten bei 37°C vorgewärmt. 5 µl (0,5 µg) wurden als Kontrolle für die Zeit gleich Null entnommen und mit Gellade-Puffer (DNA) versetzt. 2 µl Exonuklease III (175 U/µl, Boehringer) wurden zu dem Rest vermischt und nach erwünschten Inkubationszeiten bei 37°C Aliquots von 15 µl (ca. 1,5 µg) entnommen, zu 50 µl destilliertem Wasser gegeben und das Enzym gleich für 10 Minuten bei 70°C inaktiviert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt.

Die Exonuklease III-verdaute DNA (1,5 µg) wurde mit Nuklease S1-Puffer in der Konzentration 10 ng/µl und 50 U Nuklease S1 (Boehringer)/µg DNA versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur verdaut. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von einer Stopper-Lösung (6-fach konzentriert) beendet. 0,5 µg der entstandenen DNA wurde, nach einer Einengung des Volumens durch eine Vakuum-Zentrifugation, mit Gelladepuffer (DNA) versetzt und durch eine elektrophoretische Analyse die verschiedenen Exonuklease-Inkubationszeiten im Vergleich zu der Kontrolle bei Zeit Null evaluiert.

0,5 µg der rekombinanten Plasmide, die die erwünschte Verkürzung der Insertionen erreicht hatten, wurden direkt mit 10 U Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli* (5 U/µl, Boehringer) bei 37 °C inkubiert. Nach 2-minütiger Inkubationszeit wurden 2 µl einer "Chase"-Lösung, die je 31,25 µM der Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP beinhaltet (siehe S. 60), für 10 Minuten bei 37 °C weiterinkubiert. Die DNA wurde anschließend mit Äthanol gefällt und in destilliertem Wasser gelöst. Die

verkürzten, linearen Plasmide wurden in einem Volumen von 20 µl in Ligase-Puffer mit 1 U T₄-Ligase (Boehringer) für ca. 16 Stunden zirkularisiert und anschließend kompetente Bakterien mit 10 µl der Ligations-Lösung transformiert (siehe unten).

Transformation und Durchmusterung von Bakterien

Transformation von kompetenten Bakterien

Die Transformation der kompetenten Bakterien wurde nach der Arbeitsanleitung des EMBO-Kurses "Molecular Cloning" (Athen, 1984) durchgeführt. 200 µl kompetenter Bakterien (siehe S. 40) wurden auf Eis aufgetaut, ca. 100 ng Plasmide zu den kompetenten Bakterien gemischt und auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Nach leichtem Schwenken des Reaktionsgefäßes in einem Wasserbad bei 42°C für 90 Sekunden und kurzer Abkühlung auf Eis wurden 0,5 ml L-Broth hinzugefügt. Einer Inkubation in einem Bakterienrührer (37°C, 45 Minuten) folgte eine Ausplattierung der Bakterien auf OJA-Platten oder L-Broth Platten mit Ampicillin.

Durchmusterung von transformierten Bakterien

Eine Ausplattierung der transformierten Bakterien auf OJA-Platten erlaubt eine doppelte Selektion: Erstens werden aufgrund des Ampicillin-Gehalts der Platten nur Bakterien, die mit einem Plasmid, das ein Gen für Ampicillin-Resistenz besitzt, transformiert worden sind, auf den Platten wachsen. Zweitens erlaubt die Anwesenheit von X-Gal in den Platten eine Selektion von rekombinanten gegenüber nicht-rekombinanten Plasmiden.

Einzelne, weiße Bakterienkolonien wurden mit einer sterilen Pasteurpipette von den Agarplatten entnommen und zu 5 ml L-Broth mit Ampicillin gegeben. Eine Plasmid-Isolierung von 1,5 ml der Übernachtskulturen wurde durchgeführt (siehe S. 45) und die einklonierten DNA-Fragmente durch die charakteristischen Restriktionsschnittstellen erkannt (siehe S. 45).

SEQUENZ-VERFAHREN

Durch die Anwendung von zwei verschiedenen Primern konnten die Insertionen in den pUC-Vektoren von beiden Enden sequenziert werden. Die Insertionen der Plasmide durften im Idealfall nur so lang sein, dass eine überlappende Region in der Mitte der Insertionen sequenziert werden konnte. Die DNA-Abschnitte mussten deswegen oft in kleinere Fragmente unterteilt und subkloniert werden (siehe S. 52).

Die Sequenzreaktion

Es wurde nach der Didesoxynukleotid-Methode, beschrieben von Sanger *et al.* (1977), verfahren. Zwei verschiedene Ansätze wurden bei der Sequenzreaktion verfolgt. Der zuerst angewandte Ansatz richtete sich nach der Anleitung von der Firma Boehringer (1986), nach der alle benötigten Komponenten (Boehringer) separat angesetzt wurden.

Diese Sequenzreaktion verwendete das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli* und war für das Sequenzieren der ersten 150-200 Basen eines Fragments geeignet. Der später eingeführte Ansatz beruhte auf einem Sequenzierungs-Kit der Firma USB (United States Biochemical Corporation). Dieses Kit verwendet ein Enzym "Sequenase^R, Version 2,0", das ein Produkt einer genetisch manipulierten T7-DNA-Polymerase ist, das für das Sequenzieren gute Eigenschaften besitzt. Mit dem zweiten Ansatz konnten bis 400 Basen in einer Richtung abgelesen werden.

Das Sequenzieren mit dem Klenow-Fragment

Von dem zu sequenzierenden, rekombinanten Plasmid wurden 2 µg entnommen und mittels einer Vakuum-Zentrifugation getrocknet. Die DNA wurde in 40 µl Denaturierungs-Lösung aufgenommen und während einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur einzelsträngig gemacht. Die Lösung wurde mit 0,2 M Ammonium-Acetat (pH 4,5) neutralisiert und mit 2 Volumina Äthanol für 10 Minuten bei -70°C gefällt. Nach einer Abzentrifugation (14000g, 4°C, 10 Minuten) wurde das Pellet mit 1 ml 70% Äthanol gewaschen, erneut für 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet eine Minute mittels Vakuum-Zentrifugation getrocknet.

Die einzelsträngige DNA wurde in einen Hybridisierungs-Puffer mit 2,5 pmol Primer und 20-30 µCi [α -³⁵S]dCTP (Amersham, 1270-1400 Ci/mmol) in einem Gesamtvolumen von 15 µl aufgenommen und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. 3,3 µl dieser Lösung wurden zu je 2 µl der entsprechenden Nukleotid-Mixe (A-, C-, G- und T-Mixe) gegeben und mit jeweils 3 U Klenow-Fragment (Boehringer) vermischt. Nach einer Inkubation für 20 Minuten bei 30°C wurden 1,5 µl Verlängerungslösung ("Chase") zugesetzt, und es wurde für 15 Minuten bei 30°C weiterinkubiert. Die Flüssigkeit wurde anschließend durch eine Vakuum-Zentrifugation entfernt und die DNA in 4 µl Gellade-Puffer (Sequenz) aufgenommen. Vor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, wurden sie für 2 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Das Sequenzieren mit der Sequenase^R

3-5 µg Plasmide wurden in 20 µl Denaturierungs-Lösung für 30 Minuten bei 37°C denaturiert. Anschließend wurden die denaturierten Plasmide mit 0,3 M Na-Acetat (pH 4,5) und 2 Volumina absolutem Äthanol gefällt. Nach 15-minütiger Lagerung bei -70°C wurde die DNA abzentrifugiert (14000g, 4°C, 30 Minuten). Bevor die DNA in 7 µl sterilem, destilliertem Wasser gelöst wurde, wurde das Pellet mit 70% Äthanol gewaschen und kurz luftgetrocknet. Die gelöste DNA wurde mit 0,5 pmol Primer und Sequenzierungs-Puffer versetzt und für 2 Minuten bei 65°C erneut denaturiert. Eine langsame Abkühlung auf Raumtemperatur für 30 Minuten führte zu einer Hybridisierung des Primers mit dem Plasmid. Anschließend wurde die Lösung auf Eis gestellt.

Nach der Hybridisierung des Primers mit dem Plasmid erfolgte eine Markierungsreaktion. 6,7 mM DTT, 5 µCi [α -³⁵S]dATP (1200 Ci/mmol), 2 µl einer Markierungslösung und 2 µl Sequenase^R wurden zu der Primer/Templat-DNA zugesetzt und für 2-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert; das Gesamtvolumen betrug 15 µl. Die Sequenase^R wurde immer 1:8 in einem bestimmten Enzym-Verdünnungspuffer

verdünnt angewandt. Für die Sequenzierung der ersten 200-300 Basen wurde die Markierungslösung in einer Verdünnung von 1:5 verwendet. War ein weiteres Ablesen erwünscht, wurde die Markierungslösung unverdünnt zusammen mit 10 μCi [α - ^{35}S]dATP eingesetzt.

3,5 μl der verlängerten, radioaktiv markierten Primer wurden anschließend zu jeweils 2,5 μl , für eine Minute vorgewärmte Nukleotid-Terminationslösungen (ddA-, ddC-, ddG- und ddT-Terminationsmische) gegeben, und die Sequenzreaktion fand für 3-5 Minuten bei 37 °C statt. Die Reaktion wurde durch die Versetzung mit 4 μl Gellade-Puffer (Sequenz) beendet, und die Proben konnten bei -70°C aufbewahrt werden. 3 μl wurden, nach einer 2-minütigen Denaturierung bei 95°C und folgende Abkühlung auf Eis, auf das Gel aufgetragen (siehe unten).

Elektrophoretische Analyse der Sequenzprodukte

Vorbehandlung der Glasplatten

Die Glasplatten (von 40 bzw. 60 cm Länge) wurden mit 0,1% SDS, Äthanol und 0,5 M NaOH gereinigt. Fusselfreie Papierhandtücher (Kimwipes) wurden zum polieren der Glasplatten benutzt. Die mit dem Gel in Kontakt tretenden Seiten wurden entweder mit Binde-Silan (die Binde-Platte) oder Repel-Silan (die abstoßende Platte) behandelt: In Abhängigkeit von der Glasplattengröße wurden 3 bzw. 5 ml der entsprechenden Lösungen auf die Glasplatten mit einem Papierhandtuch verteilt, zum Eintrocknen gebracht und poliert. Für die abstoßende Platte wurde die Behandlung wiederholt. 3 bzw. 5 ml absoluten Äthanol wurden anschließend auf die Platten verteilt, zum Eintrocknen gebracht, und die Platten wieder poliert. Die Äthanolbehandlung wurde für beide Platten wiederholt. Die Glasplatten wurden dann unter Druckluft staubfrei gemacht und mit 0,4 mm Spacer zusammenmontiert.

Die Herstellung des Sequenzgels

Eine 6%-ige Polyacrylamid-Gellösung [das Verhältnis Acrylamid (LKB, ultrapur) zu NN'-Methylen-Bisacrylamid (LKB, ultrapur) entsprach 20:1] mit 6 M Harnstoff (BRL, ultrapur) in TBE-Puffer (Sequenz) wurde vorbereitet, sterilfiltriert und mit TEMED (LKB, ultrapur; 68 μl pro 45 ml Gel) und Ammoniumpersulfat (LKB, ultrapur; 240 μl 10%-ige, frisch angesetzte Lösung pro 45 ml Gel) versetzt. Mit Hilfe einer 50 ml Spritze wurde die Gellösung zwischen die beiden montierten Glasplatten gegossen. Die Hinterseite eines Gelkamms wurde mit der geraden Seite ca. 4 mm Tief zwischen die Glasplatten eingeschoben. Das Gel wurde frühestens nach 2 Stunden Polymerisierungszeit verwendet.

Elektrophoretische Auftrennung der Sequenzprodukte

Eine Sequenzanlage von der Firma Renner wurde benutzt.

Nach Verfestigung des Gels wurde hinter die Glasplatten eine Aluminiumplatte, die für eine gute Wärmeverteilung sorgte, montiert. TBE-Puffer (Sequenz) wurde in die oberen

und unteren Puffer-Reservoir eingefüllt. Der eingeschobene Kamm wurde herausgezogen und der Raum unter Verwendung einer Spritze mit reichlich TBE-Puffer (Sequenz) gespült, um Gel- und Harnstoff-Reste zu beseitigen. Ein Kamm mit Haifisch-Zähnen wurde zwischen die Glasplatten hineingeschoben, die Zähne 1-2 mm in das Gel hineinreichend.

Jeder zweite Auftrageraum wurde mit Gellade-Puffer (Sequenz) gefüllt, ein Vorlauf des Gels fand für eine Stunde mit 25 mA statt. Der Lauf der Marker zeigte die Qualität der Gellaufefigenschaften an. Die Auftrageräume wurden erneut mit TBE-Puffer gespült, um Harnstoff-Reste zu entfernen.

Entweder 1,5 µl (für die Sequenzreaktion mit dem Klenow-Fragment) oder 3 µl (für die Sequenzreaktion mit der Sequenase^R) der denaturierten Sequenzproben, mit Gellade-Puffer (Sequenz) versetzt, wurden in die Auftrageräume aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 25 mA sowohl für das 40 cm lange Gel als auch für das 60 cm lange Gel, ungefähr 1,7 bzw. 2,5 kV entsprechend. Die Laufzeit hing von der Fragestellung des Sequenzierens ab. Der Lauf des Markers Bromphenolblau entsprach einem Abstand von ca. 25 Basen vom Primer, der Lauf des Markers Xylene Cyanol ca. 75 Basen.

Nachbehandlung des Gels

Nach dem Lauf wurden die beiden Glasplatten mit Hilfe eines Spatels voneinander getrennt und mit dem Gel in eine Wanne mit 10%-iger Essigsäure gelegt. Für 30 Minuten unter vorsichtigem Schütteln wurde der Harnstoff aus dem Gel herausgewaschen. Das Gel wurde dann für 1 Stunde bei 80°C getrocknet.

Autoradiographie

Ein Röntgenfilm (Kodak, XAR-5) wurde auf die Glasplatte mit dem getrockneten Gel gelegt, zusammen mit einer Plastikplatte montiert und in einem lichtdichten Behältnis verpackt. Die Exposition erfolgte bei Raumtemperatur für 1-3 Tage.

Die exponierten Röntgenfilme wurden nach erfolgter Exposition für 5 Minuten in einem Röntgenfilm-Entwickler (Kodak, LX 24) entwickelt, für 1 Minute gewässert und für weitere 4 Minuten in einem Röntgenfilm-Fixierer (Kodak, AL-4) fixiert. Danach wurden sie für 20 Minuten in einem Wasserbad mit fließendem Wasser gespült und anschließend getrocknet.

Nachbehandlung der Glasplatten

Das Gel wurde durch eine Behandlung mit 0,2 N NaOH von der Glasplatte gelöst. Die beiden Glasplatten wurden mit Wasser gespült und mit Aceton abgerieben.

RNA-VERFAHREN

Alle Arbeiten mit RNA wurden mit Handschuhen durchgeführt. Die verwendeten Materialien (Glasswaren, Pipettenspitzen usw.), Aqua bidest. und Lösungen waren mit 0,1% DEPC (Fluka Chemie AG) übernacht behandelt und anschließend autoklaviert. Die Materialien wurden bei 80°C getrocknet.

RNA-Isolierung

Isolierung der Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wurde nach der Methode von Chirgwin *et al.* (1979) isoliert.

Die Organe, aus denen die RNA zu isolieren war, wurden gleich nach der Abtötung der Tiere entnommen und in N₂(l) eingefroren. Die Organe wurden entweder bei -70°C gelagert oder gleich weiter verwendet. Die Zellen aus Zellkulturen wurden mit einem "Rubber-Policeman" aus den Zellkulturflaschen entnommen und durch eine Zentrifugation (1000g, 20°C, 10 Minuten) geerntet.

Bis zu 0,50 g Organ- oder Zellgewicht wurden in N₂(l) gemörsert, das fein gemahlene Pulver zu 2,5 ml des frisch angesetzten Extraktions-Puffers (RNA) gegeben und umgehend mit einem Ultraturax gut vermischt. Das Homogenat wurde mit 1000g bei Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand zu neuen Zentrifugentuben gegeben und wiederholt für 10 Minuten zentrifugiert, jetzt bei 8000g.

Der Gewebeextrakt wurde vorsichtig zu Polyallomer-Tuben (Beckman, 4 ml Inhalt) mit 1,7 ml 5,7 M CsCl (BRL) gegeben, die Tuben bis zu 1 mm Abstand vom oberen Rand aufgefüllt. In einem SW-60 Rotor (Beckman) wurde die RNA pelletiert (180000g, 20°C, 20 Stunden). Nach der Zentrifugation wurden die Guanidinisothiocyanat- und die CsCl-Phasen vorsichtig mit mehrmalig erneuerten Pipettenspitzen abgehoben, ca. 0,5 cm des Überstands zurücklassend. Der Rest des Überstands wurde mit einer schnellen Bewegung abgekippt und die Zentrifugentuben ca. 4-5 mm über dem RNA-Pellet mit einem Skalpell abgeschnitten.

Die RNA wurde in 2 x 100 µl H₂O gelöst und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die RNA-Lösung wurde jetzt mit 100 µl Phenol für 10 Sekunden gevortext, 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurden zugegeben und dieser Ansatz erneut für 30 Sekunden gevortext. Nach 2-minütiger Inkubation wurden die Phasen durch eine Zentrifugation getrennt. Die organische Phase und die Interphase wurden mit 100 µl H₂O reextrahiert. Die wässrige Phase wurde nach erneuter Zentrifugation mit dem übrigen Extrakt vermischt, mit 0,3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumina absolutem Äthanol versetzt. Nach 10-minütiger Lagerung bei -70°C wurde die RNA bei einer Zentrifugation (14000g, 4°C, 20 Minuten) pelletiert, mit 1 ml 70% Äthanol gewaschen und erneut für 5 Minuten zentrifugiert. Die RNA wurde in H₂O gelöst und spektralfotometrisch bei OD₂₆₀ quantitativ bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entsprach einer Konzentration von 40 µg RNA/ml. Die RNA wurde entweder in Wasser gelöst oder als Pellet unter 70% Äthanol bei -70°C gelagert.

Selektion von Poly(A)⁺ und Poly(A)⁻ RNA

Dieses Verfahren beruht auf eine Publikation von Aviv & Leder (1972).

0,1 g Oligo-(dT)-Cellulose (Boehringer) pro Milligramm Gesamt-RNA wurde in Lade-Puffer suspendiert und in eine 1 ml Einmalspritze gefüllt. Die Säule wurde mit 3 Säulenvolumina H₂O, dann mit 3 Säulenvolumina 0,1M NaOH/5mM EDTA und erneut mit H₂O gewaschen bis ein pH-Wert des Durchflusses kleiner 8 erreicht wurde. Anschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina Lade-Puffer equilibriert.

Die RNA wurde in H₂O gelöst, für 5 Minuten auf 65°C erhitzt, mit dem gleichen Volumen zweifach konzentriertem Lade-Puffer versetzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die RNA-Lösung wurde so auf die Säule gegeben, der Durchfluss gesammelt und wieder auf 65°C erhitzt, anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt und die Säule erneut beladen. Der Durchfluss wurde aufbewahrt und entsprach der Poly (A)⁻-RNA. Die Säule wurde mit 10 Volumina Lade-Puffer, gefolgt von 4 Volumina Lade-Puffer mit 0,1 M NaCl, gewaschen. Die Poly (A)⁺-RNA wurde mit H₂O eluiert und Fraktionen von je einem Säulenvolumen gesammelt. Die OD₂₆₀ wurde von Aliquots der Fraktionen gemessen, die zwei Fraktionen mit der höchsten OD wurden gesammelt und die OD₂₆₀ erneut bestimmt.

Elektrophoretische Auftrennung der RNA

Für die elektrophoretische Auftrennung der RNA wurde die Methode, beschrieben von Davis *et al.* (1986), durchgeführt.

300 ml eines 1%-igen (w/v) Agarose-Gels (Biorad) mit 0,66 M Formaldehyd und 0,67 µg Ethidiumbromid/ml MAE-Puffer wurden benutzt. Die Agarose wurde in MAE-Puffer zum Kochen gebracht und nach Abkühlung auf 55°C mit Formaldehyd und Ethidiumbromid versetzt. Das Gel wurde in einem Abzug gegossen. Die Elektrophorese fand bei 2,5 V/cm in MAE-Puffer für 5-7 Stunden statt. Die Elektrophorese-Kammern entsprachen der Beschreibung für die Elektrophorese von DNA (siehe S. 46).

Das Volumen der RNA-Lösung wurde mittels einer Vakuum-Zentrifugation auf weniger als 5 µl eingengt und anschließend mit 20 µl Gellade-Puffer (RNA) versetzt. Alternativ wurde die erwünschte RNA-Menge entnommen, mit 0,3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 2,5 Volumina Äthanol gefällt und das Pellet unter 70% Äthanol aufbewahrt. Nach erneuter Zentrifugation und einer kurzen Lufttrocknung wurde das RNA-Pellet direkt in Gellade-Puffer (RNA) aufgenommen. Vor dem Auftragen der RNA auf das Gel wurde die RNA für 15 Minuten bei 65°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte wie oben beschrieben.

Northern Analysen

Das Blot-Verfahren, wie vorgeschlagen von den Filterherstellern (DuPont-NEN), wurde durchgeführt.

Für die Northern Analysen wurden 20 µg Gesamt- und Poly (A)⁻-RNA und ca. 2 µg angereicherte Poly (A)⁺-RNA verwendet.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht (257 nm) fotografiert. Das Gel wurde von überschüssigem Formaldehyd durch einen Waschvorgang für 15 Minuten in 0,5 Liter H₂O gefolgt von 15 Minuten in 0,5 Liter 10xSSC befreit. Die Übertragung der RNA vom Gel auf die Filtermembran (GeneScreenPlusTM) erfolgte in 10xSSC, wie für den Southern Blot beschrieben (siehe S. 51). Die Übertragungszeit betrug 12-20 Stunden. Nach dem Blot wurde der Filter für 10 Minuten in 2xSSC gewaschen, getrocknet und die Formaldehyd-Reaktion für 2 Stunden bei 80°C revertiert.

Durch das Einsetzen humaner Gesamt-RNA (isoliert aus Neuroblastomen, Kinderklinik, Gießen), rRNA aus *E. Coli* (Boehringer) und RNA-Markern I, II und III (Boehringer), konnten sowohl die Längen der rRNA bei *Xiphophorus* als auch die Transkriptlängen der untersuchten *Xi-X* und Aktin-Transkripte festgelegt werden. Die humane rRNA-Transkripte haben die Längen 2,0 kb (18 S) und 5,1 kb (28 S), rRNA von *E. coli* haben die Längen 1,6 kb (16 S) und 2,9 kb (23 S).

AUFFINDEN SPEZIFISCHER SEQUENZEN GEBUNDEN AN FILTERMEMBRANEN (SOUTHERN UND NORTHERN BLOT ANALYSEN, GENBIBLIOTHEK-DURCHMUSTERUNG)

Markierung der Sonde

Als Sonden wurden isolierte Insertionen aus den rekombinanten Plasmiden verwendet. Es wurden die Nicktranslations-Kits N-5000 bzw. N-5500 der Firma Amersham oder ein Nicktranslations-Kit der Firma Boehringer verwendet.

100 ng einer Insertion (siehe S. 48) wurden mit 20 µCi [α -³²P]dCTP (Amersham, 3000 Ci/mmol) und den Nukleotiden und Enzymen des Kits in einem gesamten Puffervolumen von 10-20 µl für ca. 1 Stunde bei 15°C radioaktiv markiert. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden von der DNA über eine Chromatographie-Säule mit einem Volumen von 2 ml (Sephadex G 50, Pharmacia; in eine Pasteur-Pipette gefüllt) mit TE-Puffer abgetrennt. Fraktionen von je 3 Tropfen wurden aufgefangen und mit einem Geigerzähler auf ihren radioaktiven Inhalt hin gemessen. Die ersten DNA-enthaltenden, radioaktiven Fraktionen wurden zusammenpipettiert, das Volumen gemessen und 2 µl in 5 ml Szintillator-Flüssigkeit in einem Szintillationszähler (Hewlett-Packard) quantifiziert. Eine spezifische Aktivität von 2 x 10⁸ cpm/µg DNA wurde erreicht. Die radioaktiv markierte DNA kann für ca. 4 Tage bei -20°C aufbewahrt werden.

Vorhybridisierung und Hybridisierung der Filter

Die Filterhybridisierung erfolgte nach der vom Hersteller der Filtermembran beschriebenen Methode (DuPont; NEN, 1985). Dabei wurde die Hybridisierungsbedingung unter Verwendung von Formamid, 10%-igem Dextransulfat (Pharmacia) und einer Hybridisierungstemperatur von 42°C verwendet.

Die Hybridisierungen der Filter erfolgten unter zwei verschiedenen Stringenzien, die sich im Formamidgehalt der Hybridisierungs-Lösungen unterschieden. Die nicht stringente Bedingung wurde mit 43% Formamid durchgeführt und fand hauptsächlich Anwendung bei Southern-Filtern, bei denen die DNA weniger als 100% Homologie zu der Sonde hatte. Dies trat zu bei der Hybridisierung von *Xiphophorus*-DNA mit den homöobox-enthaltenden Sonden *Antp* und *ftz* aus *Drosophila*, sowie in den Evolutionsstudien. Die stringente Bedingung mit 50% Formamid im Hybridisierungsmix wurde für Sonden mit 100%-igen Homologien zur DNA oder RNA angewandt. Die Expressionsstudien wurden sowohl unter stringenten als auch unter nicht-stringenten Hybridisierungsbedingungen durchgeführt.

Die Filter wurden in Folienschläuche (Melitta) eingeschweißt. Die Vorhybridisierungs-Lösung wurde eingefüllt (0,1 ml pro cm² Filteroberfläche) und für 1-3 Stunden bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Die radioaktiv-markierte Probe (2-5x10⁵ cpm/ml Vorhybridisierungs-Lösung) und gescherte Kalbsthymus-DNA (200 µg/ml Vorhybridisierungs-Lösung) wurden nach einer Denaturierung bei 90-100°C für 10 Minuten und anschließender Abkühlung auf Eis zu den Filtern zugesetzt, gut vermischt und für 16-24 Stunden im Wasserbad bei 42°C weiterinkubiert.

Waschen der Filter und Autoradiographie

Auch bei der Entfernung von ungebundener radioaktiv markierter Sonde wurde mit zwei verschiedenen Stringenzien verfahren. Die Filter, die unter nicht-stringenten Bedingungen hybridisiert worden waren (43% Formamid), wurden in einer Waschlösung mit 2xSSC und 0,5% SDS bei 50°C gewaschen. Die Filter, die unter stringenten Bedingungen hybridisiert worden waren (50% Formamid), wurden in einer Lösung mit 1xSSC und 0,5% SDS bei 60 °C gewaschen.

Die Hybridisierung-Lösungen wurden aus den Folientüten entfernt und die Filter in 2 x 0,5 Liter Waschlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Ein Waschvorgang mit 2 x 1 Liter der Waschlösung folgte unter gutem Schütteln für je 20-30 Minuten bei 50 bzw. 60°C im Wasserbad. Eine Inkubation für 10 Minuten in 1 Liter 0,2xSSC bei Raumtemperatur entfernte SDS-Reste von den Filtern.

Die hybridisierten Filter wurden vorsichtig mit Handtuchpapier (Kleenex) getrocknet, mit einer Folie (Melitta) bedeckt und mit einem Röntgenfilm (Kodak, XAR 5) in eine Kassette mit 2 Intensifier-Screens (Dupont) gelegt. Nach einer Exposition bei -70°C für 1 Stunde bis zu 10 Tagen wurde der Röntgenfilm entwickelt (siehe S. 58).

Entfernung der hybridisierten DNA-Sonden ("Stripping")

Für bestimmte Fragestellungen wurden die hybridisierten Gensonden von den Southern und Northern Filtern entfernt, damit neue Hybridisierungen durchgeführt werden konnten. Der hybridisierte, noch feuchte Filter wurde in eine "Stripping"-Lösung gelegt und für 20 Minuten bei 65°C vorsichtig geschwenkt. Die "Stripping"-Lösung wurde von dem Filter durch einen Waschvorgang mit drei Bädern 0,1xSSC für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur entfernt. Anschließend wurde der Filter luftgetrocknet.

ZELLKULTUR-VERFAHREN

Die Zellkultur DRLI wurde für die Anwendung in dieser Arbeit gezüchtet. Das Nährmedium wurde zum Teil entweder mit Streptomycin (100 µg/ml)/Penicillin (100 U/ml; Boehringer) oder mit Gentamycin (1000 µg/ml; Beecham-Wülfing) gegen Wachstum von Bakterien und Mycoplasmen versetzt. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Die Kulturflaschen (Nunc) hatten Bodenflächen von 25 oder 80 cm², und die Zellen wurden mit 5 bzw. 15 ml Nährmedium gezüchtet. Die Temperatur im Brutschrank betrug 29°C. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Umkehrmikroskops (Zeiss) morphologisch beurteilt.

Die Passagierung der Zellen erfolgte durch die Entfernung des Mediums, eine Spülung der Zellen mit 5 ml sterilem PBS (Boehringer) und eine Inkubation der Zellen mit 5 ml einer Trypsinlösung (0,02% Trypsin mit 0,05% EDTA in PBS; Boehringer) für 30 Sekunden. Anschließend erfolgte für ca. 5-10 Minuten eine Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur, bis die Zellen sich vom Boden abgelöst hatten. Die Zellen wurden in 10 ml Nährmedium aufgenommen, in 2-4 neue Kulturflaschen verteilt und mit frischem Nährmedium aufgefüllt. Anschließend wurden die Flaschen mit einem Luft/Gas-Gemisch mit 5% CO₂ begast.

Die Zellen wurden durch eine Behandlung mit Retinsäure (Serva) zur Differenzierung induziert. Die Konzentration der Retinsäure betrug 10 µM und sie wurde mit dem Nährmedium beim Wechsel appliziert. Die Behandlung fand für 2-5 Wochen statt.

Für genauere Studien des Zelltyps in dieser Zellkultur wurden die Zellen auf Objektträger (Nunc) gezüchtet. Zellen von einer dicht bewachsenen, großen Kulturflasche wurden auf die jeweils 4 Kämmerchen von 4 Objektträgern verteilt, und kurz vor dem Eindeckeln mit CO₂ begast. Die Objektträger wurden in sterile Petrischalen (Greiner) gelegt und diese in einem Exsikkator in den Brutschrank gestellt. Die Inkubation erfolgte für 3-5 Tage. Anschließend wurde das Medium und die Kämmerchen von den Objektträgern entfernt, die Zellen vorsichtig mit PBS (Boehringer) gespült und für die immunocytoologische Färbung, die vom Herrn Prof. Dr. M. Altmannsberger im Pathologischen Institut, Gießen, durchgeführt wurde, in absolutem Methanol bei -20°C für 10 Minuten fixiert. Für die Untersuchungen zur Tyrosinase-Aktivität, die in Zusammenarbeit mit dem Herrn Prof. Dr. H. Schmidt aus Halle durchgeführt wurden (Schmidt, H., 1988; Schmidt, H & Anders, 1989), wurden die Zellen entweder in Methanol oder 4% Formaldehyd fixiert.

METHODEN

Für die Erstellung einer Wachstumskurve wurde 5×10^5 Zellen in kleine Kulturflaschen verteilt und jeden zweiten oder dritten Tag das Nährmedium gewechselt. Jeden zweiten Tag wurden 2 Flaschen geerntet und die Lebend-Zellzahl durch eine Vitalfärbung mit Trypanblau (Boehringer) bestimmt. Dazu wurden die Zellen zuerst mit Trypsin behandelt (siehe S. 63), abzentrifugiert (1000g, 20°C, 10 Minuten) und in 1 ml PBS pro Flasche gelöst. Eine Verdünnung der Zellen auf 1:1 oder 1:10 wurde mit PBS durchgeführt und die Zellen mit 0,18% Trypanblau in PBS versetzt. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurden die farblosen Zellen mit Hilfe einer Zählkammer (Fuchs Rosenthal) gezählt.

4. ERGEBNISSE

A-1) NACHWEIS VON HOMÖOBOXEN IM GENOM VON *XIPHOPHORUS*

Homöobox-enthaltende Fragmente aus dem homöotischen Gen *Antennapedia* (*Antp*) und dem Segmentierungsgen *fushi tarazu* (*ftz*) von *Drosophila* wurden aus den rekombinanten Plasmiden p903G bzw. pFS2 isoliert und als DNA-Sonden für die Analysen der Homöoboxen im Genom von *Xiphophorus* eingesetzt. Positive Hybridisierungssignale der beiden Gensonden in Southern Analysen, entweder durch die Verwendung von zwei parallelen Filtern oder nach Entfernung der ersten hybridisierten Probe und Rehybridisierung mit der anderen, ergab einen Hinweis auf das Vorkommen von Homöoboxen im Genom von *Xiphophorus*; die Homöobox ist die einzige homologe Region der beiden Genabschnitte.

Southern Analysen genomischer DNA, die mit dem Restriktionsenzym **EcoRI** geschnitten worden war, zeigen insgesamt 9 Banden, die mit den beiden Hybridisierungsproben *ftz* und *Antp* Homologien aufweisen (siehe Abb. 5, S. 67): 5 Banden sind *X. helleri* und *X. maculatus* gemeinsam (15, 7,0, 5,2, 4,4 und 3,0 kb). *X. helleri* zeigt zusätzlich ein Fragment von 3,4 kb, das bei *X. maculatus* nicht beobachtet werden kann. In den Bastarden der beiden Arten kann dieses Fragment auftreten oder fehlen; vermutlich entspricht bei *X. helleri* das Fragment einem Allel eines Gens mit einer alternativen Restriktionsfragmentlänge. *X. variatus* (nicht gezeigt) hat ein *EcoRI*-Fragment von 5,8 kb, das bei *X. maculatus* und *X. helleri* nicht beobachtet werden kann. Das Fragment von 3,0 kb ist dagegen bei dieser Art nicht anwesend (siehe auch S. 221). Ein RFLP besteht für ein *EcoRI*-Fragment von 2,2 kb bei *X. maculatus* und von 2,5 kb bei *X. helleri*. In den F₁-Bastarden sind beide Fragmente im Genom anwesend. In Rückkreuzungsbastarden mit *X. helleri* (siehe Abb. 8, S. 70) ist das 2,5 kb Fragment, das von dieser Art stammt, bei allen Tieren vorhanden. Das 2,2 kb Fragment von *X. maculatus* ist in den Rückkreuzungsbastarden, die das Pigmentzellmuster *DrSd* bzw. *BrNi* geerbt haben, immer deutlich anwesend. Bei den Rückkreuzungsbastarden, die das platyspezifische Pigmentzellmuster nicht geerbt haben, ist in Fischen von Kreuzungen mit dem Pigmentzellmuster *BrNi* das Fragment abwesend (siehe Abb. 8, S. 70), von Kreuzungen mit dem Pigmentzellmuster *DrSd* sehr schwach zu beobachten (nicht gezeigt). Es besteht die Möglichkeit, dass das 2,2 kb homöobox-enthaltende Fragment von *X. maculatus* parallel mit den platyspezifischen Pigmentzellmustern bzw. mit dem *Tu*-Komplex vererbt wird und damit auf dem Geschlechtschromosom X (für *DrSd*) bzw. Z (für *BrNi*) von *X. maculatus* lokalisiert ist.

Genomische DNA, geschnitten mit **HindIII**, ergibt bei den Southern Analysen mit denselben Genotypen (Vgl. Abb. 5 und 6) 11 Banden (siehe Abb. 6, S. 68; 11,5, 9,5, 8,5, 5,2, 4,5, 3,6, 3,2, 2,6, 1,9, 1,0 und 0,4 kb). *X. helleri*, *X. variatus* und verschiedene Populationen von *X. maculatus* (mit den platyspezifischen Pigmentzellmustern *DrSd*, *DySp*, *BrNi* und *BrNi^e*) scheinen *HindIII*-Fragmente gleicher Länge zu besitzen.

BamHI-verdaute DNA zeigt für *X. helleri* 8 Banden (siehe Abb. 7, S. 69; 25, 16, 9,4, 7,1, 2,9, 2,7, 2,1 und 1,8 kb). Tumortragende Rückkreuzungsbastarde in Kreuzungen von *DrSd*-Tieren, aber nicht die tumorfreen Geschwister, zeigen zusätzlich zu den Banden von *X. helleri* eine Bande von ca. 2,3 kb. Das parallele Auftreten des 2,3 kb Fragments mit den Pigmentzellloci *DrSd* spricht für eine mögliche Kopplung dieser Homöobox mit den Pigmentzellloci auf dem X-Chromosom von *X. maculatus* (siehe Abb. 9, S. 71). Entweder könnte dieses Fragment von *X. maculatus* zusätzlich zu den homöobox-enthaltenden Fragmenten von *X. helleri* vorhanden sein, oder *X. helleri* besitzt ein entsprechendes Fragment einer anderen Länge. Weitere Analysen haben gezeigt, dass die letzte Möglichkeit zutrifft (siehe S. 109ff. , Abb. 37, S. 124).

Die *X. maculatus*-spezifischen Fragmente von sowohl *EcoRI*-geschnittener (2,2 kb), als auch *BamHI*-geschnittener DNA (2,3 kb), zeigen eine Vererbung, die offensichtlich parallel mit der Vererbung der platyspezifischen Pigmentzellloci auftritt. Diese homöobox-enthaltenden Fragmente von *X. maculatus* könnten dementsprechend an die Pigmentzellloci bzw. an den *Tu*-Komplex auf den Geschlechtschromosomen von *X. maculatus* lokalisiert sein. Durch die mögliche Lokalisation der Homöobox auf dem X-Chromosom von *Xiphophorus maculatus* wurde das entsprechende Gen *Xi-X* genannt.

Der Erfolg dieser Untersuchungen war schwankend. Nur selten wurden so gute Hybridisierungssignale erreicht, dass eine gesamte Auswertung aller Homöoboxen möglich war. Besonders zeigte die Homöobox *Xi-X*, die wegen einer eventuellen Kopplung an die platyspezifischen Pigmentzellloci bzw. den *Tu*-Komplex interessant war, nur eine schwache Bande, die in vielen Hybridisierungsvorgängen nicht sichtbar wurde. Es war deswegen in Southern Analysen unter Verwendung von Homöoboxen aus *Drosophila* als Sonden schwierig, reproduzierbare Studien über den Vergleich der Bandenmuster im Genom von *Xiphophorus* verschiedener Arten und Populationen durchzuführen. Ich habe mich daher entschlossen, die xiphophorinen Homöoboxen zu isolieren, und die weiteren Analysen direkt mit einer Auswahl dieser Homöoboxen durchzuführen.

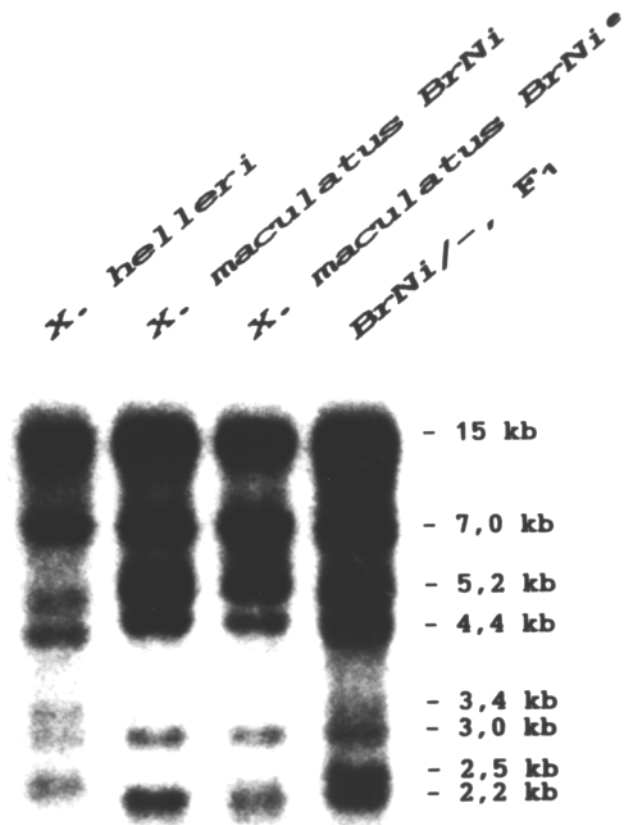


Abb. 5

Southern Analyse *Eco*RI-geschnittener DNA.

Der Southern Filter wurde mit der Sonde aus dem Gen *Antp* von *Drosophila* unter nicht-stringenten Bedingungen hybridisiert.

Die Bezeichnung *BrNi*-, F₁ bezieht sich auf ein F₁-Bastard von *X. maculatus BrNi* und *X. helleri*, der das Pigmentzellmuster *BrNi* trägt.

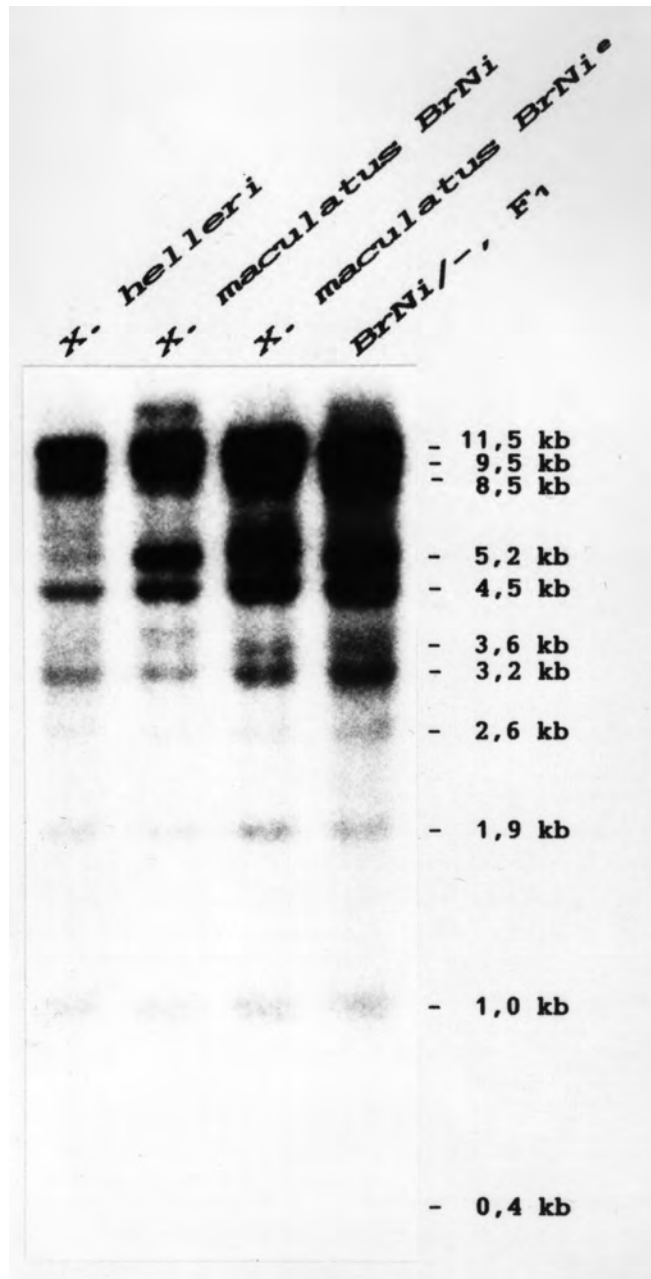


Abb. 6

Southern Analyse *Hind*III-geschnittener DNA.

Der Southern Filter wurde mit der Sonde aus dem Gen *Antp* von *Drosophila* unter nicht-stringenten Bedingungen hybridisiert.

Die Bezeichnung *BrNi/-, F₁* bezieht sich auf ein F₁-Bastard von *X. maculatus BrNi* und *X. helleri*, der das Pigmentzellmuster *BrNi* trägt.

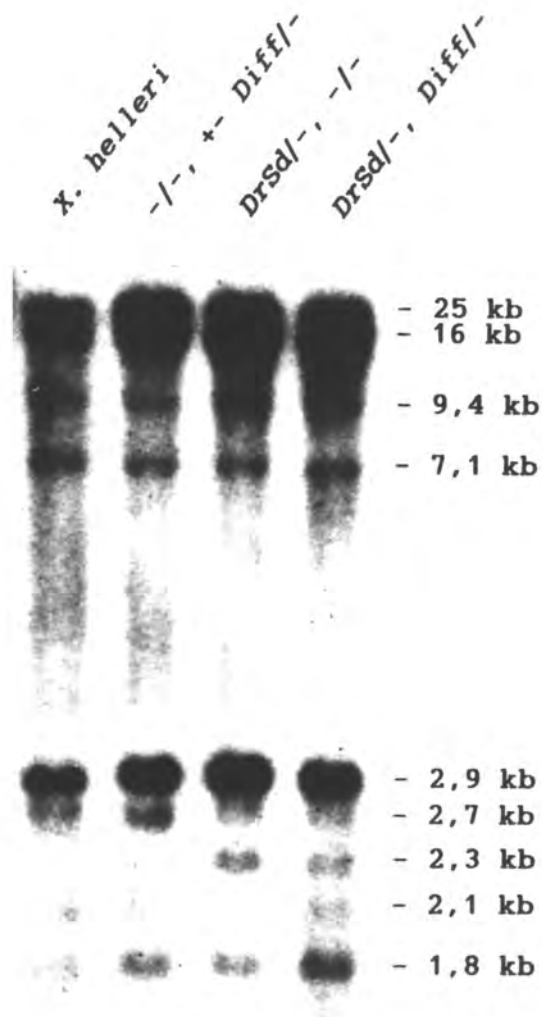


Abb. 7

Southern Analyse *Bam*HI-geschnittener DNA.

Der Southern Filter wurde mit der Sonde aus dem Gen *Antp* von *Drosophila* unter nicht-stringenten Bedingungen hybridisiert.

DrSd und *R_{Diff}* bezeichnen die Anwesenheit (+) bzw. die Abwesenheit (-) der entsprechenden Loci in Rückkreuzungsbastarden von *X. maculatus DrSd* mit *X. helleri*.

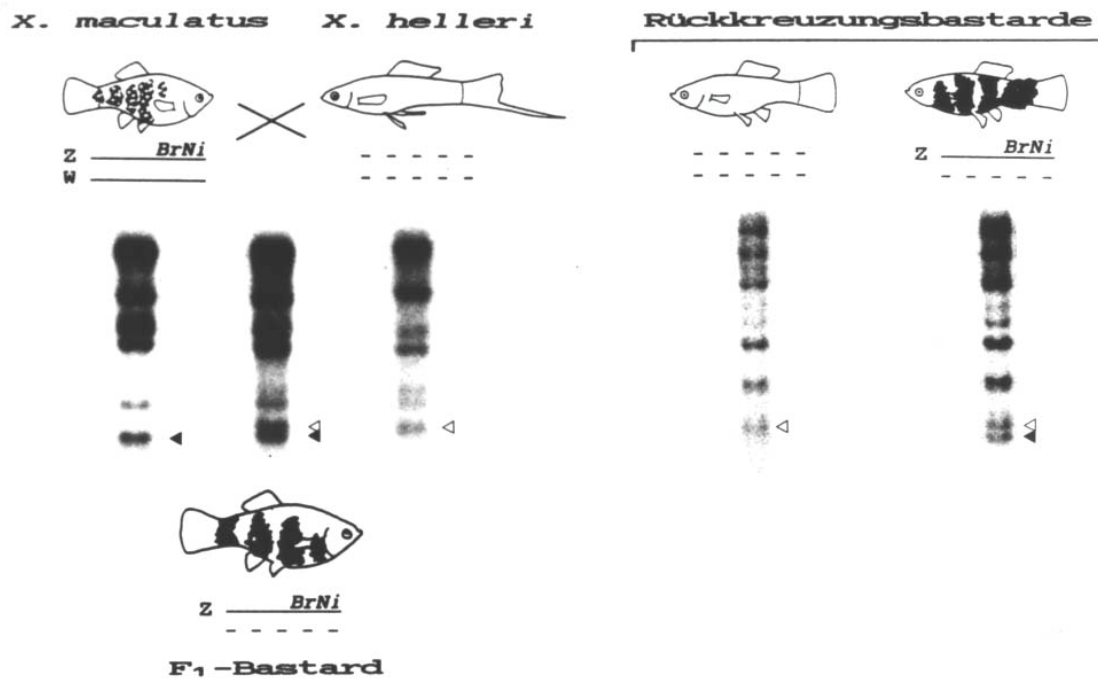


Abb. 8

Southern Analyse *EcoRI*-geschnittener DNA isoliert aus *X. helleri*, *X. maculatus BrNi* und aus F₁-Bastarden bzw. Rückkreuzungsbastarden von *X. maculatus BrNi* mit *X. helleri*.

Die geschlossenen Linien stellen die *BrNi*-tragenden Z-Chromosomen bzw. das W-Chromosom von *X. maculatus*, die gestrichelten Linien die entsprechenden, homologen Chromosomen von *X. helleri* dar. Die DNA wurde für die parentalen Arten sowie für die F₁-Bastarde mit der Gensonde *Antp*, die DNA aus den Rückkreuzungsbastarden mit der Gensonde *ftz*, unter nicht-stringenten Bedingungen, hybridisiert.

Die dunklen Pfeile geben die *X. maculatus*-spezifischen Fragmente von 2,2 kb, die offenen Pfeile die *X. helleri*-spezifischen Fragmente von 2,5 kb, an.

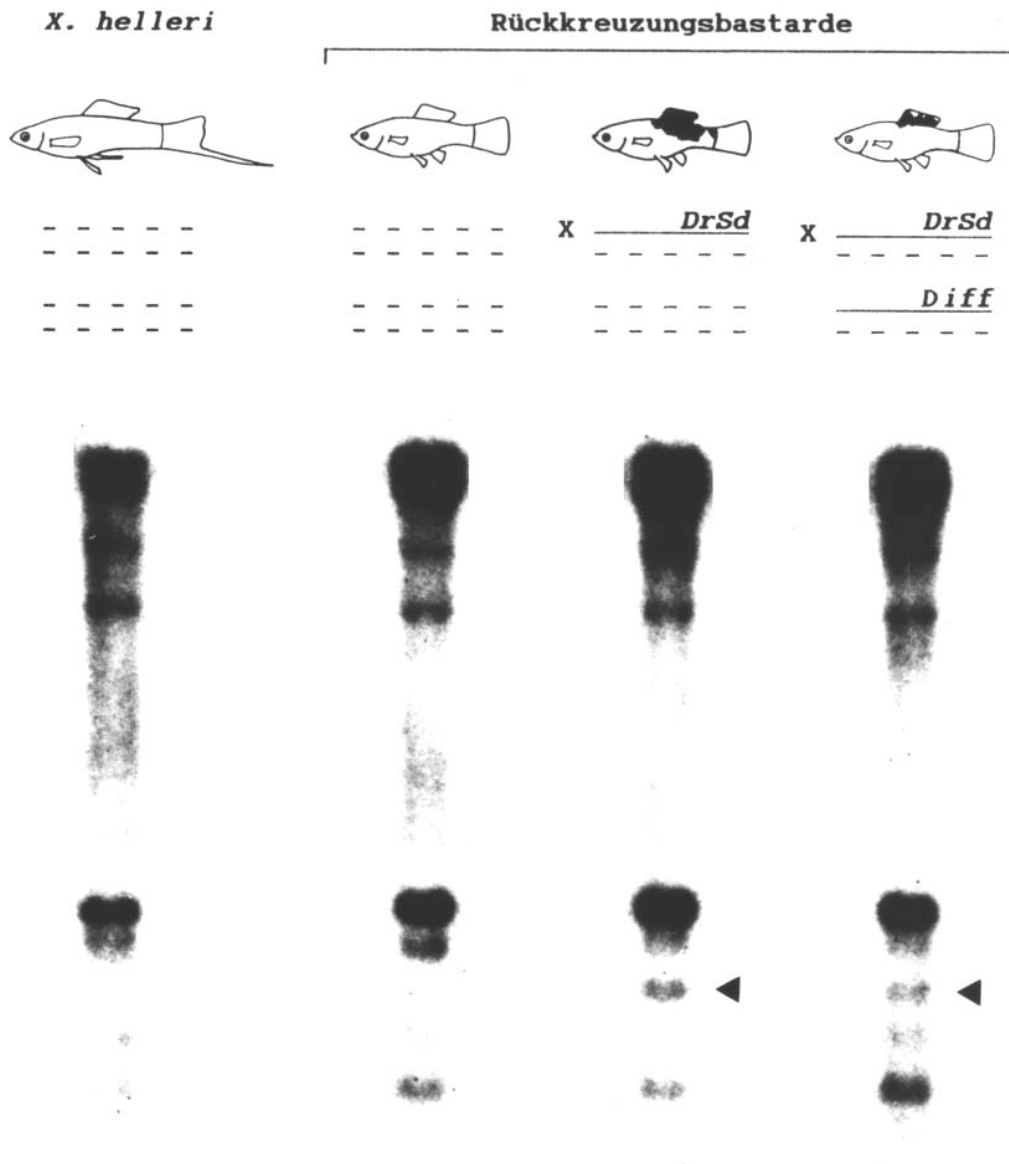


Abb. 9

Southern Analyse *Bam*HI-geschnittener DNA isoliert aus *X. helleri* und Rückkreuzungsbastarden von *X. maculatus* *DrSd* mit *X. helleri*.

Die geschlossenen Linien stellen die *DrSd*- bzw. *R_{Diff}*-tragenden Chromosomen von *X. maculatus*, die gestrichelten Linien die entsprechenden, homologen Chromosomen von *X. helleri* dar. Die DNA wurde mit der Gensonde *Antp* unter nicht-stringenten Bedingungen hybridisiert. Die Pfeile geben die vermutlich *X. maculatus*-spezifischen Fragmente von 2,3 kb an.

B-1) CHARAKTERISIERUNG DES GENS XI-X

C-1) ISOLIERUNG DES HOMÖOBOX-ENTHALTENDEN XI-X-FRAGMENTES

Ein homöobox-enhaltendes, 2,2 kb *EcoRI*-Fragment, *Xi-X* genannt, das vermutlich mit den Pigmentzellloci *DrSd* bzw. *BrNi* auf den Geschlechtschromosomen von *X. maculatus* gekoppelt ist (siehe S. 65ff.), sollte isoliert und kloniert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde eine Teil-Genbibliothek *EcoRI*-geschnittener DNA im Fragmentlängenbereich von ca. 2,2 kb im Phagenvektor λ -gt10 angelegt und die Genbibliothek auf das erwünschte homöobox-enhaltende Genfragment durchmustert.

Herstellung einer Xi-X-enhaltenden Teil-Genbibliothek

100 μ g genomischer DNA von *X. maculatus DrSd/DrSd* wurde mit *EcoRI* verdaut und die somit produzierten *EcoRI*-Fragmente in einem 0,8%-igen LMP-Agarosegel elektrophoretisch nach der Größe aufgetrennt. Ein Gelstreifen im Bereich von 2,2 kb wurde aus dem Gel herausgeschnitten und die darin enthaltende DNA aus der Agarose mittels einer Ionenaustauschsäule getrennt und konzentriert. Die isolierten DNA-Fragmente waren von 2,1-2,6 kb Länge und damit im erwünschten Größenbereich (siehe Abb. 10, S. 73). Quantitativ ergab der Isolationsvorgang ca. 10% der eingesetzten DNA-Menge. Durch die Ligation von ca. 1 μ g der isolierten DNA mit 1 μ g DNA vom Vektor λ -gt10, dessen Phagenarme *EcoRI*-geschnitten und mit einer Phosphatase behandelt waren, und die Verpackung der rekombinanten DNA in Phagenköpfe mittels Proteinextrakten war es möglich, eine Teil-Genbibliothek in λ -gt10 zu erstellen.

Die Teil-Genbibliothek ergab bei Ausplattierung mit dem Bakterienstamm C600Hfl, $3,9 \times 10^5$ *pfu*/ μ g Vektor DNA. Auf den Phagenplatten, ausplattiert mit dem Bakterienstamm C600, hatten 16,8% der *pfu* eine trübe Erscheinung, d.h. von der angelegten Genbibliothek waren vermutlich ca. ein Sechstel der Phagen von der Wildtypkonfiguration ohne Insertionen. Merkwürdigerweise war die gesamte Phagenzahl von $3,2 \times 10^5$ *pfu*/ μ g Vektor-DNA mit dem Wirt C600, bei dem Phagen sowohl mit rekombinanter als auch Wildtypkonfiguration wachsen sollten, vergleichbar mit der Phagenzahl, die mit dem Wirt C600Hfl erreicht wurde, bei dem aber nur rekombinante Phagen sich vermehren sollten. Diese Daten müssen die Fähigkeit des Wirts C600Hfl zu einer selektiven Vermehrung der rekombinanten Phagen in Frage stellen. Ein Durchschnitt der beiden Werte ergibt $3,5 \times 10^5$ *pfu*/ μ g Vektor-DNA, also eine spezifische Phagenzahl, die gut innerhalb des Bereichs von 10^5 - 10^6 *pfu*/ μ g Vektor-DNA, die die Hersteller der Verpackungsextrakte (Amersham) angeben, liegt. Entsprechend betrug die Gesamtzahl der Phagen in der Genbibliothek $3,5 \times 10^5$.

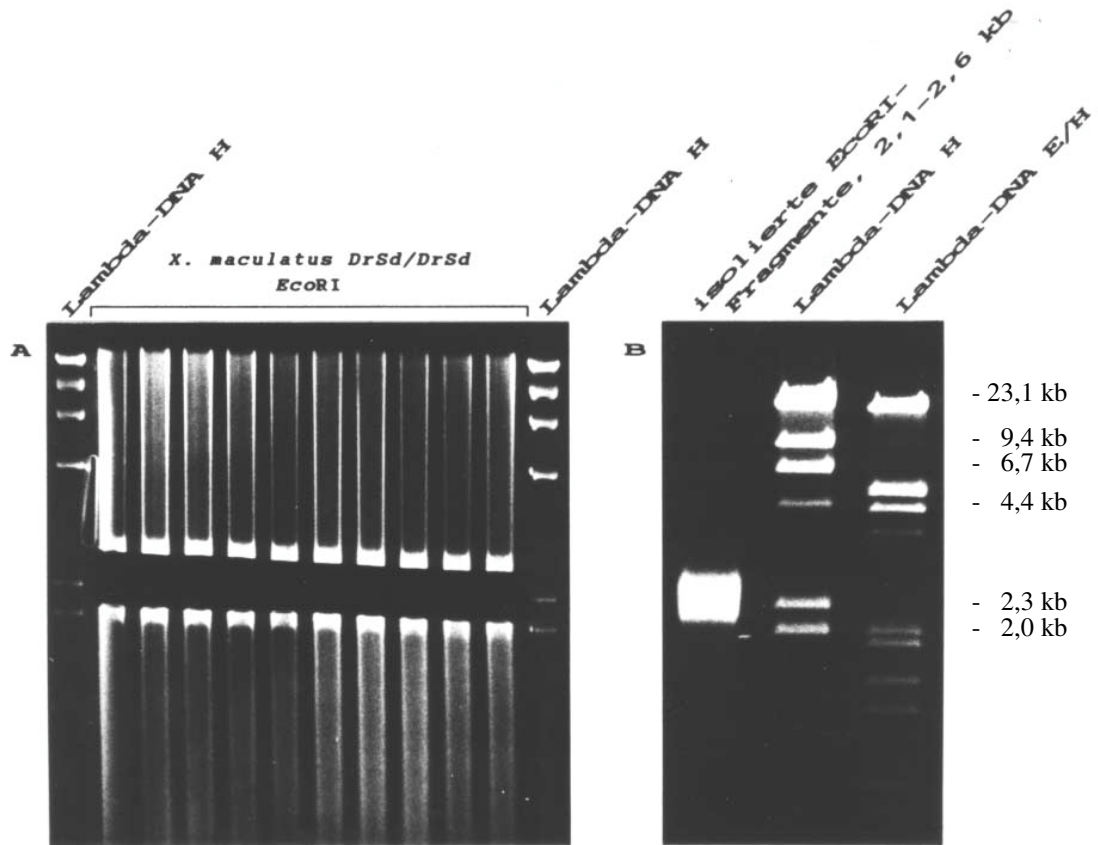


Abb. 10

Die Isolierung der 2,1-2,6 kb *EcoRI*-Fragmente aus dem Genom von *X. maculatus DrSd/DrSd*, die für die Herstellung der Teil-Genbibliothek eingesetzt wurden.

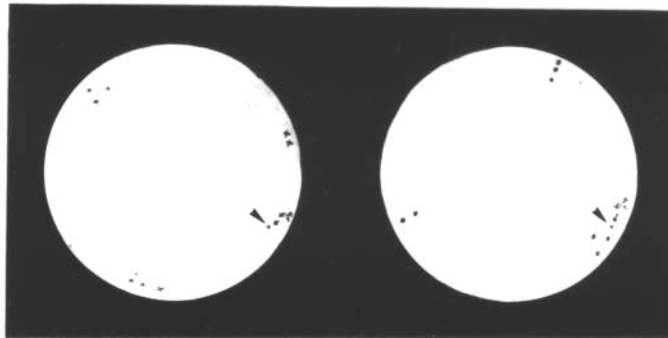
A) Der DNA-Bereich, der aus dem Agarosegel nach dem *EcoRI*-Verdau und nachfolgender Elektrophorese herausgeschnitten wurde. B) Ein Aliquot (ca. 2 µg) der aus dem LMP-Gel gereinigten DNA.

Durchmusterung der Teil-Genbibliothek auf das Xi-X-Fragment

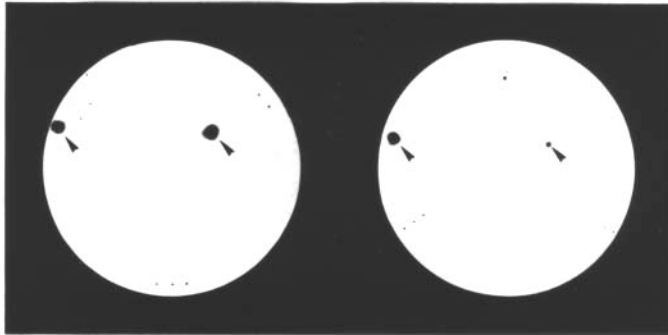
Für die Durchmusterung der Teil-Genbibliothek auf homöobox-enhaltende Klone wurde der Bakterienstamm C600Hfl verwendet, wobei dieser Wirt nur das Wachstum von rekombinanten Phagen erlauben sollte (siehe Abb. 11, S. 75). In der ersten Durchmusterung wurden 3 Platten von je ca. 750 *pfu* eingesetzt und die Filterduplikate mit der Gensonde *Antp* hybridisiert. Von 2281 *pfu* hybridisierte in der ersten Durchmusterung nur eine *pfu* mit der *Antp*-Sonde, d.h. 0,04% der untersuchten Klone. Mit dem *Antp*-positiven Phagen aus der ersten Durchmusterung wurde eine zweite Durchmusterung vorgenommen. Etwa 600 Phagen wurden auf zwei Petrischalen ausplattiert. Doppelte Filterabdrücke wurden angefertigt und diese mit der Probe *Antp* hybridisiert. Hier erwiesen sich 9 *pfu* auf beiden Filterduplikaten als sicher positiv, d.h. 1,5% der Klone. Vier dieser Klone wurden isoliert, vermehrt und ihre DNA isoliert. Ein Verdau mit *EcoRI* ergab, dass alle diese vier Klone ein *EcoRI*-Fragment von 2,2 kb beherbergten. Eine Hybridisierung des entsprechenden Southern Blots mit der Sonde *ftz* bestätigte, dass alle Klone eine Homöobox besitzen (nicht gezeigt). Von einem der positiven *pfu* wurde eine neue Phagen-Gewinnung und eine dritte Durchmusterung durchgeführt. Diesmal wurden insgesamt 188 *pfu* auf zwei Petrischalen ausplattiert, und die Filterduplikate mit der Gensonde *ftz* hybridisiert. In der dritten Durchmusterung erwiesen sich alle *pfu* als *ftz*-positiv.

Hiermit war ein rekombinanter λ -gt10-Phage hergestellt und isoliert worden, der ein homöobox-enhaltendes Fragment besaß, wobei der rekombinante Phage sowohl mit der Gensonde *Antp* als auch mit der Gensonde *ftz* ein positives Hybridisierungssignal hervorrief; die Homöobox ist die einzige gemeinsame homologe Region der beiden Gensonden.

**1. Durchmusterung
mit *Antp***



**2. Durchmusterung
mit *Antp***



**3. Durchmusterung
mit *ftz***

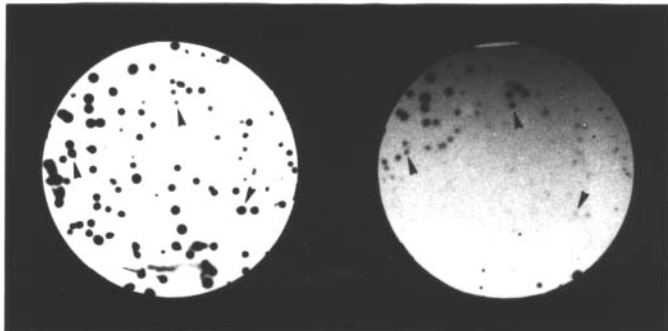


Abb. 11

Die Durchmusterung der angelegten Teil-Genbibliothek von *X. maculatus DrSd/DrSd* mit den homöobox-enthaltenden Gensonden *Antp* und *ftz*. Die Pfeile geben Beispiele der positiven Klone an.

C-2) UMKLONIERUNG, SUBKLONIERUNG UND EINE ERSTE, STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG DES ISOLIERTEN GENFRAGMENTES XI-X

Umklonierung, Subklonierung und Grobkartierung von Xi-X

Für die weiteren Analysen der isolierten Homöobox wurde das isolierte Genfragment *Xi-X*, das im Phagen λ -gt10 kloniert war, in den Plasmid-Vektor pUC 18 umkloniert. Der Vorgang entsprach der Methodik, die für die Subklonierung beschrieben wurde. Für diese Absicht wurde der Vector pUC 18 samt der isolierten, rekombinanten Phagen-DNA mit *EcoRI* geschnitten, die entstandenen DNA-Fragmente ligiert und kompetente Bakterien mit der DNA transformiert. Eine Durchmusterung der entstandenen Klone mittels Plasmidisolierung im Mikroansatz von ausgewählten Bakterienkolonien und anschließender *EcoRI*-Verdau und elektrophoretischer Analyse der Restriktionsfragmente konnte einen Bakterienklon mit dem 2,2 kb Fragment *Xi-X* in pUC 18 ausfindig machen.

Durch das Schneiden des *Xi-X*-enthaltenden pUC-Plasmids mit verschiedenen Restriktionsenzymen und einer sich anschließenden elektrophoretischen Analyse der entstandenen Restriktionsfragmentlängen konnte eine Restriktionskarte von *Xi-X* erstellt werden. Eine Überführung der Restriktionsfragmente auf eine Membran und eine anschließende Hybridisierung der Membran mit den homöobox-enthaltenden Gensonden *Antp* bzw. *ftz* vermittelte die Lokalisation der Homöobox im Genfragment *Xi-X*; Abb. 12 (siehe S. 77) zeigt ein Beispiel der durchgeführten Analysen.

Eine *PvuII* Schnittstelle begrenzt eine Region von ca. 1 kb an einem Ende der Insertion. Zur Erleichterung der Restriktionskartierung wurden die *EcoRI-PvuII*- (ca. 1 kb) und *PvuII-EcoRI*-Fragmente (ca. 1,2 kb) in pUC 18 subkloniert. Der Vektor beinhaltet keine *PvuII*-Schnittstelle in dem Polylinker. Deswegen wurde der Vektor mit *EcoRI* und *SmaI* geschnitten; *SmaI* und *PvuII* produzieren beide keine überhängenden Enden, sondern "blunt ends", und diese Enden können somit miteinander ligiert werden. Diese *EcoRI/PvuII*- bzw. *PvuII/EcoRI*-Subklone wurden für die weitere Restriktionskartierung eingesetzt.

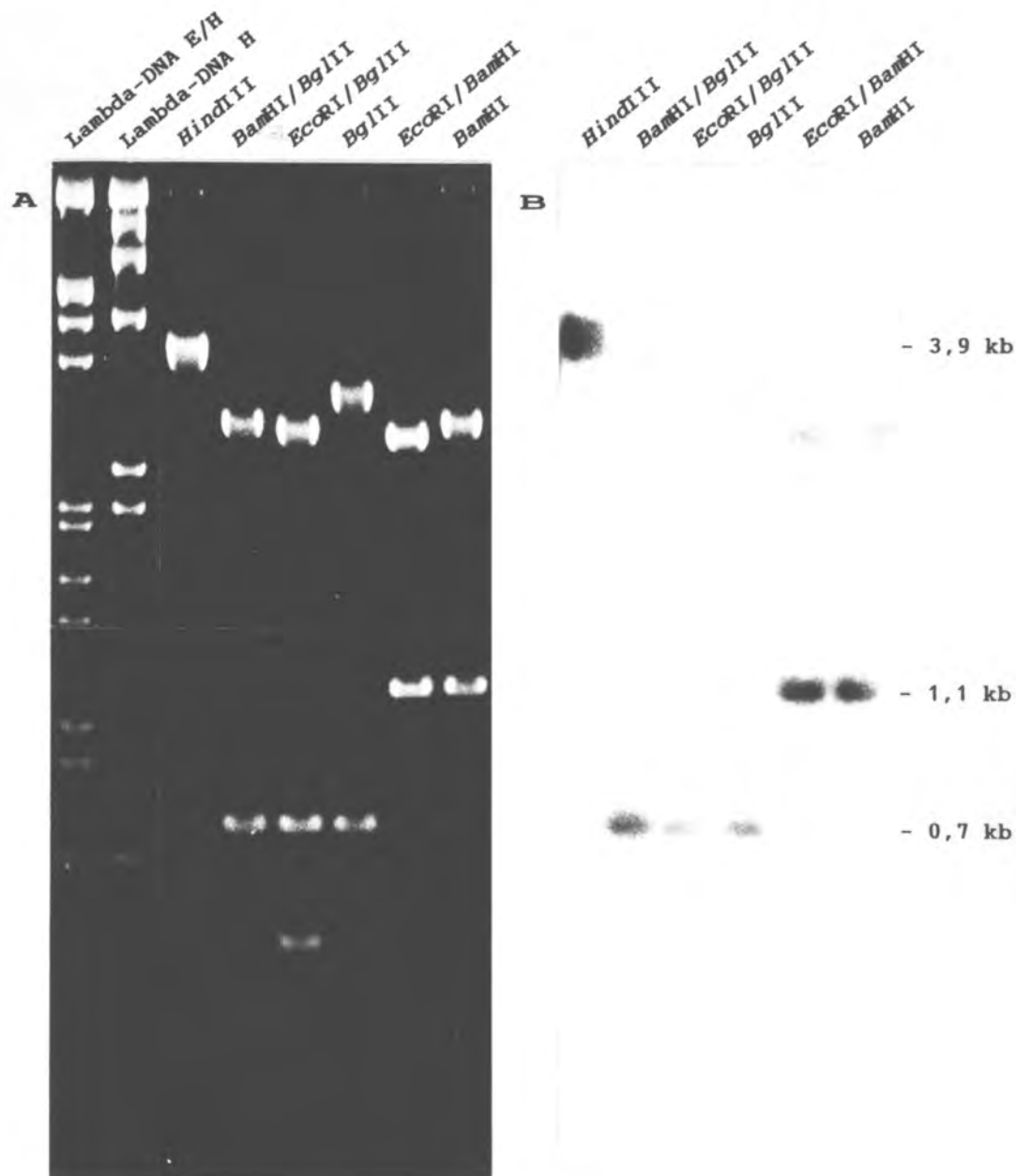


Abb. 12

Ein Beispiel für die Analysen der Restriktionsenzymkartierung von *Xi-X* (vom *PvuII-EcoRI* Fragment in pUC 18).

A) Die elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmente in einem 1,2%-igen Agarose-Gel und B) das entsprechende Autoradiogramm nach der Hybridisierung mit der Gensonde *Antp*.

Eine Restriktionskarte wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *BamHI*, *PvuII*, *BglIII*, *XhoI* und *SalI* vom isolierten Genabschnitt *Xi-X* entworfen (siehe Abb. 13, S. 78). Diese Restriktionskarte stellte zunächst eine orientierende Karte dar, die als Grundlage für die weiteren Klonierungsarbeiten diente. Die später durchgeführte Sequenzierung des gesamten Fragments ergab eine genaue Lokalisation aller Restriktionsenzym-

Schnittstellen und konnte außerdem ein weiteres, kleines *Bgl*III-*Bgl*III Fragment auffindig machen (siehe S. 86-87). Abb. 18A (siehe S. 87) zeigt eine korrekte Restriktionskarte des Klons *Xi-X*, erstellt aufgrund der bekannten Nucleotidsequenz.

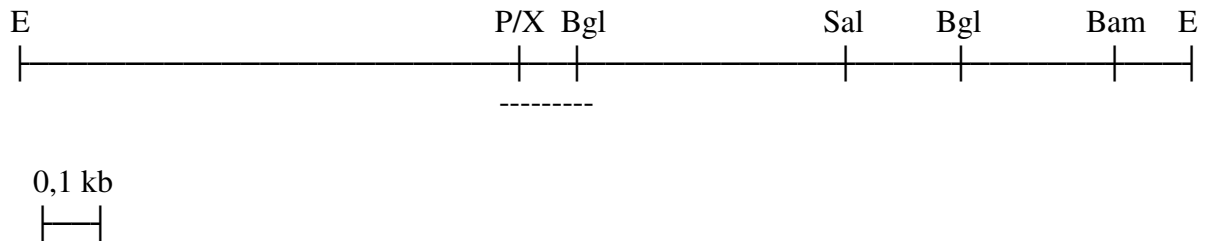


Abb. 13

Eine Grobkarte des isolierten Genabschnitts *Xi-X*.

Die gestrichelte Linie bezeichnet die Position der Homöobox.

E, *Eco*RI; P, *Pvu*II; X, *Xho*I; Bgl, *Bgl*III; Sal, *Sal*I; Bam, *Bam*HI

Southern* Analysen des isolierten Genabschnitts *Xi-X

Die Insertion, das 2,2 kb *Xi-X* Fragment, wurde aus dem rekombinanten pUC 18-Plasmid isoliert und in *Southern* Analysen mit genomischer DNA eingesetzt. Ich erwartete, dass diese zelluläre Sonde, mit 100% Homologie zu der genomischen DNA, im Vergleich zu den Gensonden von *Drosophila* eine gute Hybridisierungsqualität besäße, was eindeutige Aussagen über die strukturelle Organisation von *Xi-X* in verschiedenen Arten, Rassen und Populationen von *Xiphophorus* ermöglichen sollte. *Xi-X* beinhaltet aber eine repetitive Sequenz, die über die gesamten Gelspuren hybridisiert und es unmöglich macht, Aussagen über die Organisation des isolierten Genfragments selbst zu treffen. Das isolierte Genfragment *Xi-X* wurde deshalb in kleinere Stücke unterteilt und die einzelnen Stücke in *Southern* Analysen eingesetzt. Die *Bgl*III Schnittstellen wurden für diesen Zweck verwendet (siehe Abb. 13, siehe oben). Das rekombinante Plasmid wurde mit *Eco*RI und *Bgl*III geschnitten und die so entstandenden, drei Fragmente von ca. 1, 0,7 und 0,4 kb elektrophoretisch getrennt, aus dem LMP-Gel herausgeschnitten, über eine Ionenaustauschsäule isoliert (siehe Abb. 14, S. 79) und als Sonden in den Hybridisierungsanalysen eingesetzt. Die Fragmente wurden *Xi-X_A*, *Xi-X_B* bzw. *Xi-X_C* genannt. Abb. 17 A (siehe S. 85) zeigt eine Übersicht über die Position der drei Fragmente im Genabschnitt *Xi-X*.

Die *Southern* Analysen mit den drei Subfragmenten von *Xi-X* zeigen (siehe Abb. 36, S. 121), dass das Fragment *Xi-X_B* die repetitive Sequenz beherbergt. Das Fragment *Xi-X_C* liegt als Einzelkopie im Genom vor und wurde vorwiegend für die weiteren Studien der strukturellen Organisation von *Xi-X* verschiedener Arten, Rassen und Populationen von *Xiphophorus* eingesetzt (siehe S. 109ff.). Das Fragment *Xi-X_A* zeigt ebenfalls eine einzige, deutliche Bande, besitzt aber eine gewisse Homologie zu anderen Sequenzen, was eine schwache Hintergrundfärbung der Gelspuren verursacht. Alle

ERGEBNISSE

Fragmente wurden in Analysen zur Struktur (siehe S. 109ff.), Expression (siehe S. 159ff.) und evolutionsmäßigen Konservierung (siehe S. 156ff.) eingesetzt.

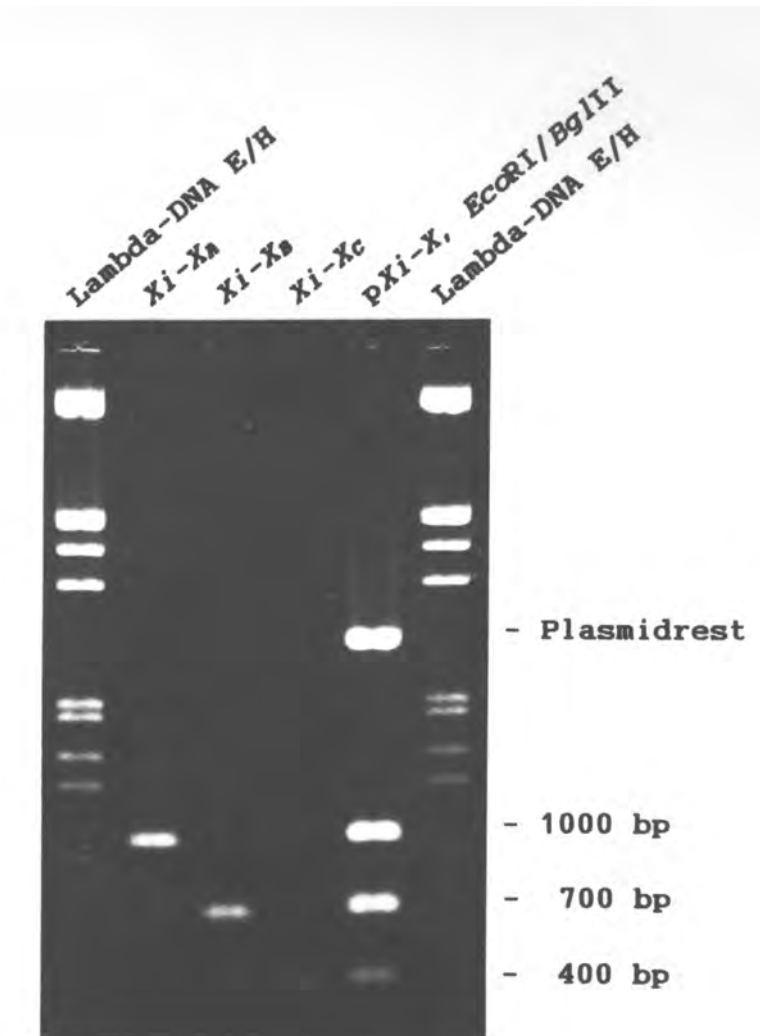


Abb. 14

Das Fragment *Xi-X* in pUC 18, p*Xi-X*, mit *EcoRI* und *BglIII* geschnitten, und die drei entsprechend isolierten Subfragmente A, B und C von *Xi-X*, die als Sonden in den Southern und Northern Analysen eingesetzt wurden.

Die Herstellung und Subklonierung von kleineren DNA-Fragmenten

Für die Sequenzierungs- und Transkriptionsanalysen war es erforderlich, das isolierte Fragment *Xi-X* in kleinere Stücke zu zerlegen. Einerseits erfolgte die Subklonierung unter Verwendung von Restriktionsenzymen, die geeignete Schnittstellen aufwiesen, andererseits war es durch das Fehlen von geeigneten Schnittstellen erforderlich, das DNA-Fragment *Xi-X_A* durch das Einsetzen der Enzyme Exonuclease III und Nuclease S1 von dem einen Ende her sukzessive zu verkürzen. Alle Klonierungsprodukte von *Xi-X* in den Plasmiden pUC 18 und 19 werden in der Tab. 4 aufgelistet (siehe S. 84). Abb. 17 (siehe S. 85) zeigt eine Übersicht über die Lokalisation und die Namensnennung von in späteren Analysen häufig verwendeten Subfragmenten von *Xi-X*. In der Abb. 16 (siehe S. 83) wird eine Auswahl der hergestellten, rekombinanten Plasmide nach einer elektrophoretischen Auftrennung nach Laufgeschwindigkeit in einem Agarosegel gezeigt.

Subklonierung von spezifischen *Xi-X* Restriktionsfragmenten

Die schon beschriebenen Subfragmente *Xi-X_A* (Position 1-1042), *Xi-X_B* (Position 1043-1737) und *Xi-X_C* (Position 1803-2220) von *Xi-X*, hergestellt durch das Schneiden des rekombinanten Vektors mit *EcoRI* und *BglII*, wurden in pUC 18 und pUC 19 kloniert. *BglII* hat keine Schnittstelle in dem Polylinker des Vektors, aber die *BamHI*-Schnittstelle kann als Einklonierungsstelle für *BglII* benutzt werden; die Enzyme *BamHI* und *BglII* sind kompetitiv. Die Vektoren wurden mit *EcoRI* und *BamHI*, für die Restriktionsfragmente mit *EcoRI*- und *BglII*-Enden, bzw. nur mit *BamHI*, für das Fragment mit zwei *BglII*-Enden, geschnitten.

Bedingt durch die Anwesenheit von einem Teil der Homöobox sowie der hoch repetitiven Sequenz in dem *Xi-X_B*-Fragment, war es erforderlich, dieses Fragment in kleinere Stücke zu unterteilen, um u.a. spezifische Sonden für die Expressionsanalysen zu gewinnen. Zuerst wurde das *BglII-SalI* Fragment (Position 1043-1524) durch das Schneiden der Vektoren pUC 18 und pUC 19 mit *BamHI* und *SalI* subkloniert. Die Insertion, gewonnen aus diesem Subklon, wurde in drei kleinere Stücke durch das Schneiden mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* unterteilt. Hiermit wurden drei verschiedene Subfragmente der Region *Xi-X_B* gewonnen: Das eine Fragment enthält einen gut konservierten Bereich der Homöobox und wird *Xi-X_B-Hom* genannt. Ein anderes Fragment enthält die repetitive Region und wurde deshalb mit *Xi-X_B-Rep* bezeichnet. Das Fragment, das zwischen den beiden Regionen gelegen ist, enthält keine repetitiven Elemente und wird mit *Xi-X_B-Spez1* bezeichnet. Aufgrund der geringen Größe dieser Fragmente, ca. 100-200 bp, war es notwendig, die elektrophoretische Trennung der Fragmente mit Hilfe eines Polyacrylamidgels durchzuführen, und die DNA anschließend aus dem Polyacrylamidgel zu eluieren. Die Schnittstellen des Enzyms *Sau3A* konnten mit den kompetitiven Schnittstellen von *BamHI* in den Vektoren verknüpft werden. Die definitiven Subklone konnten durch eine Sequenzierung erkannt werden. Die Region *SalI-BglII* (Position 1525-1737) von *Xi-X_B*, die nicht in dem *BglII-SalI* Klon (Position 1043-1524) enthalten ist, ist auch spezifisch für *Xi-X_B* und wurde mit *Xi-X_B-Spez2* bezeichnet. Diese Region wurde nicht kloniert, sondern aus dem Fragment *Xi-X_B* isoliert und direkt verwendet. Die Position der vier Subfragmente von *Xi-X_B* werden in der Abb. 17B (siehe S. 85) dargestellt.

Zusätzlich wurden für die Sequenzanalysen Klone benötigt, die die überlappenden Regionen der Subfragmente $Xi-X_A$, $Xi-X_B$ und $Xi-X_C$ beinhalten, um sicher zu stellen, dass keine kleinen Fragmente bei den Klonierungsarbeiten verloren gegangen sind. Die Überlappung der Klone $Xi-X_A$ und $Xi-X_B$ in Position 1042/1043 wurde durch den früher hergestellten *PvuII-EcoRI*-Klon (Position 940-2220) kontrolliert. Für die Überlappung der beiden Fragmente $Xi-X_B$ und $Xi-X_C$ wurde der Subklon *Sall-BamHI* (Position 1525-2082) hergestellt. Dieser Klon konnte ein kleines, zusätzliches *BgIII-BgIII*-Fragment von 65 bp (Position 1738-1802) zwischen den $Xi-X_B$ und $Xi-X_C$ Fragmenten ausfindig machen (siehe S. 86-87).

Verkürzung des $Xi-X$ Subfragments $Xi-X_A$ mit Exonuclease III und Nuclease S1

In dem ca. 1 kb langen $Xi-X_A$ -Fragment wurden keine Restriktionsenzym-Schnittstellen, die für die Subklonierung in den pUC-Vektoren geeignet waren, gefunden. Aus diesem Grund war es erforderlich, das Fragment durch Exonuclease-Verdau zu verkürzen.

Für die Herstellung eines 3'-überhängenden Endes, das für den Exonuclease III-Angriff geschützt ist, wurde das gesamte rekombinante Plasmid, $Xi-X_A$ enthaltend, mit *SphI* geschnitten. Die *SphI*-Schnittstelle kommt in diesem Plasmid ausschließlich im Polylinker vor. Das 5'-überhängende Ende, das für die Exonuclease III ein Substrat ist, wurde mit dem Restriktionsenzym *XhoI* erzeugt. Die *XhoI*-Schnittstelle liegt in der Insertion selbst, 91 bp von der Einklonierungstelle entfernt, gerechnet von der Mitte der *BgIII*-Erkennungssequenz.

Abb. 15 (siehe S. 82) zeigt die DNA nach den Exonuclease III- und Nuclease S1-Verdauen mit anschließender Reinigung. Die Verdauzeiten der Exonuclease III von 30, 60 und 90 Sekunden zeigen einen deutlichen sukzessiven Abbau der DNA. Eine dünne Bande unverdauter Plasmide bei allen Inkubationszeiten spricht für einen unvollständigen Verdau mit *XhoI*, also dafür, dass das angreifbare 5'-Ende in einer geringen Prozentzahl der Plasmide nicht zugänglich war. Die Kontrolle bei der Zeit 0 zeigt zudem ein zusätzliches Fragment kürzerer Länge, das wahrscheinlich ein Abbau-Produkt darstellt. Dieses Fragment ist erst durch die Reinigung über eine Sephadex-Säule nach den Verdauen mit *SphI* und *XhoI* entstanden und geht nach den Nuclease-Verdauen wieder verloren. Wahrscheinlich hat dieses Fragment für die Exonuclease III zusätzliche, angreifbare Enden, die zu einem vollständigen Abbau der Plasmide führten. Weil dieses kürzere Fragment nach den Nuclease-Verdauen verschwindet, stört es die weiteren Untersuchungen nicht.

Die Kontrolle bei Zeit 0 zeigte eine Plasmidlänge von 3,6 kb, dem theoretischen Wert für diesen Klon entsprechend. Eine Verdauzeit von 30 Sekunden zeigt einen durchschnittlichen Verlust von 300 bp Insertions-DNA. Die weiteren Verdau zeigen verkürzte Plasmide mit Durchschnittswerten von 200 bp pro zusätzlicher, 30-sekundiger Verdauzeit. Die Fragmente bei Verdauzeiten von 30 und 60 Sekunden schienen für die Sequenzierung die gewünschten Längen zu haben und wurden mit einer DNA-Polymerase aufgefüllt und ligiert. Anschließend wurden kompetente Bakterien mit diesen Plasmiden transformiert.

Es wurden je 5 Bakterienklone der Exonuclease III Verdauzeiten von 30 und 60 Sekunden entnommen, die Plasmide isoliert, die DNA mit *EcoRI* geschnitten und die

ERGEBNISSE

linearisierten Plasmide elektrophoretisch analysiert. Plasmide mit Insertionlängen von 675, 612 und 504 bp des 30-sekundigen Verdaus und von 331 und 250 bp des 60-sekundigen Verdaus fanden für die Sequenzanalysen eine Anwendung.

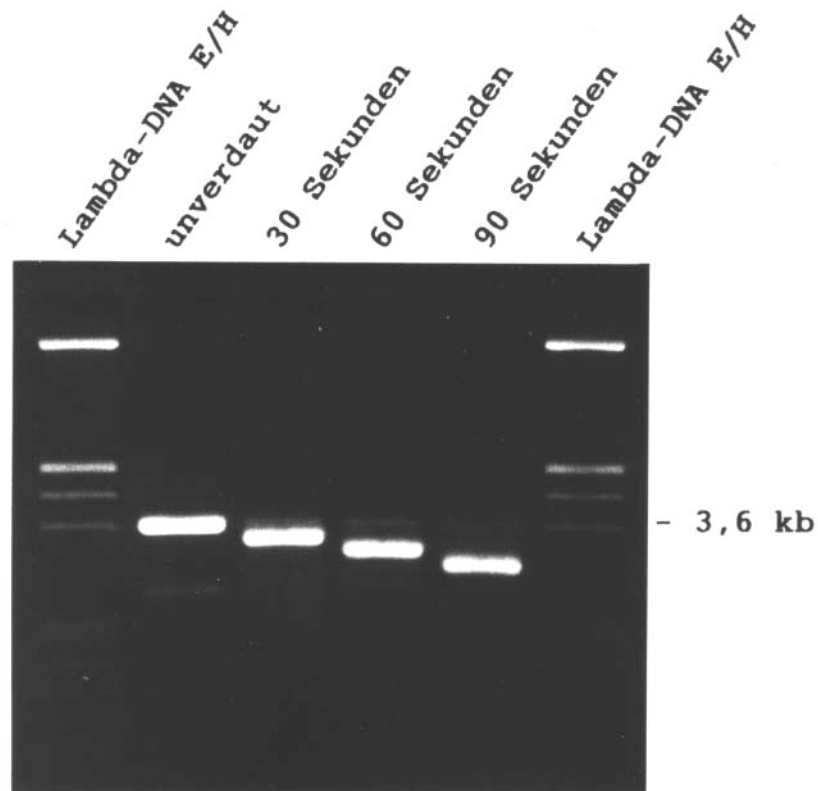


Abb. 15

Die sukzessive Verkürzung des Subklons *Xi-X_A* (*EcoRI-BglIII*, Position 1-1042) durch Exonuclease III und Nuclease S1.

Die DNA wurde mit Exonuclease III für 30, 60 bzw. 90 Sekunden verdaut und anschließend mit Nuclease S1 verkürzt.

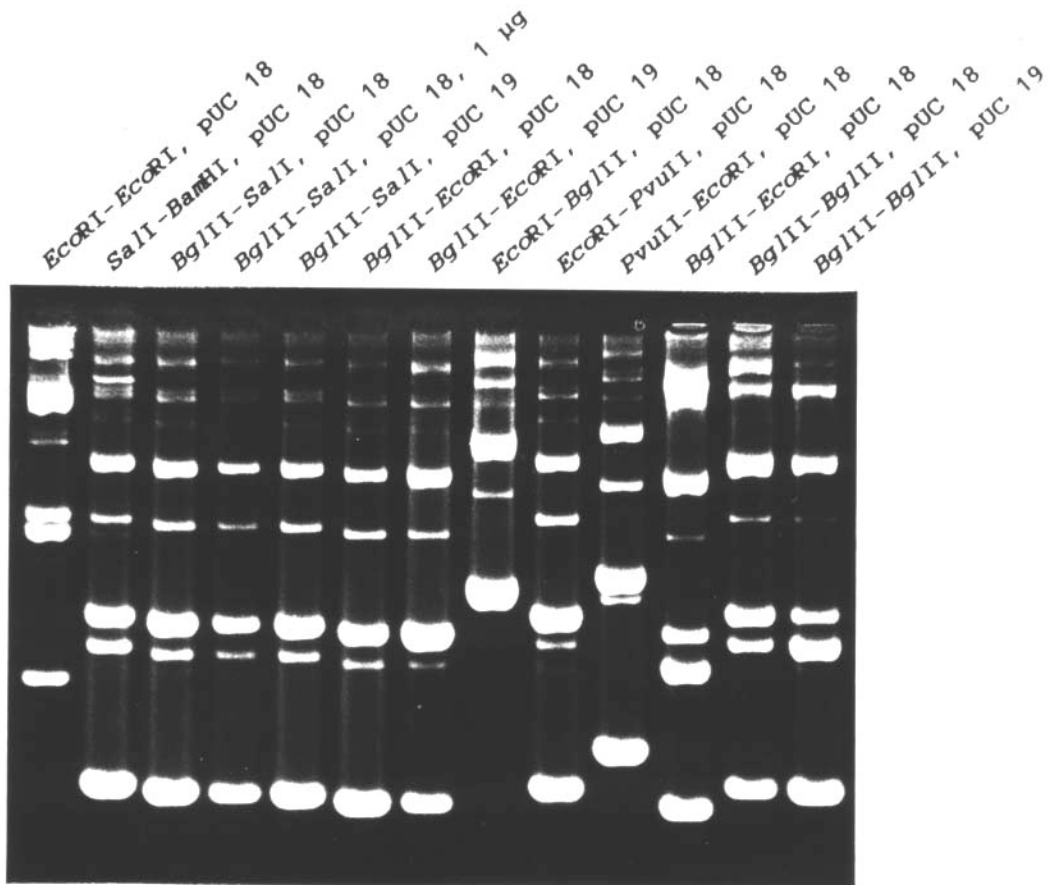


Abb. 16

Eine Auswahl der hergestellten, rekombinanten Plasmide.

Die Mengen entsprechen denen (ca. 2 µg), die in der Sequenzierung mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I verwendet wurden.

Tab. 4

Gesamte Klonierungsprodukte von *Xi-X* in pUC-Vektoren.

Die Klone wurden entweder durch die Subklonierung spezifischer Restriktionsfragmente oder durch einen sukzessiven Exonuclease III-Verdau mit anschließendem Nuclease S1-Verdau des Subklons *Xi-X_A* (*EcoRI-BglII*, Position 1-1042) hergestellt.

Die genauen Längen und Positionen der Fragmente von *Xi-X* in den insgesamt 20 Klonen wurden durch die Sequenzierung ermittelt. Die Positionen der Schnittstellen beziehen sich auf die Mitte der Erkennungssequenzen, ausgenommen sind die flankierenden *EcoRI*-Schnittstellen, dessen Erkennungssequenz von 6 Nukleotiden mitgerechnet wurde.

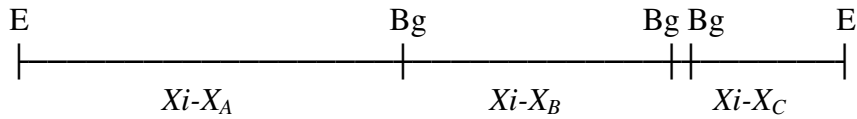
Spezifische Restriktionsfragmente

| Restriktionsfragment | Vektor | Position in <i>Xi-X</i> | Gesamtlänge der Insertion |
|----------------------|-----------|-------------------------|---------------------------|
| <i>EcoRI-EcoRI</i> | pUC 18 | 1-2220 | 2220 bp |
| <i>EcoRI-PvuII</i> | pUC 18 | 1- 939 | 939 bp |
| <i>PvuII-EcoRI</i> | pUC 18 | 940-2220 | 1281 bp |
| <i>EcoRI-BglII</i> | pUC 18/19 | 1-1042 | 1042 bp |
| <i>BglII-BglII</i> | pUC 18/19 | 1043-1737 | 695 bp |
| <i>BglII-EcoRI</i> | pUC 18/19 | 1803-2220 | 418 bp |
| <i>BglII-SalI</i> | pUC 18/19 | 1043-1524 | 482 bp |
| <i>SalI-BamHI</i> | pUC 18 | 1525-2082 | 558 bp |
| <i>BglII-Sau3A</i> | pUC 18 | 1043-1142 | 100 bp |
| <i>Sau3A-Sau3A</i> | pUC 18 | 1143-1367 | 225 bp |
| <i>Sau3A-SalI</i> | pUC 18 | 1368-1524 | 157 bp |

Exonuclease III/Nuclease S1-verkürzte Fragmente

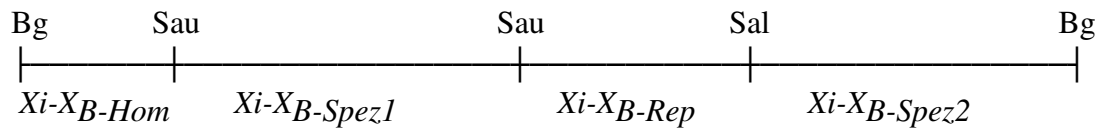
| Klon | Vektor | Position in <i>Xi-X</i> | Gesamtlänge der Insertion |
|---------|--------|-------------------------|---------------------------|
| Klon 31 | pUC 18 | 1-675 | 675 bp |
| Klon 33 | pUC 18 | 1-612 | 612 bp |
| Klon 32 | pUC 18 | 1-504 | 504 bp |
| Klon 61 | pUC 18 | 1-331 | 331 bp |
| Klon 64 | pUC 18 | 1-250 | 250 bp |

A)



—| 0,1kb

B)



—| 0,1 kb

Abb. 17

Ein Übersicht über die Lokalisation und die Benennung von in Analysen häufig verwendeten Subfragmenten von *Xi-X*.

E, *EcoRI*; Bg, *BglIII*; Sau, *Sau3A*; Sal, *SalI*

A) Einteilung von *Xi-X* nach den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BglIII*:

Xi-X_A: *EcoRI-BglIII* (Position 1-1042, 1042 bp)

Xi-X_B: *BglIII-BglIII* (Position 1043-1737, 695 bp)

Xi-X_C: *BglIII-EcoRI* (Position 1803-2220, 418 bp)

B) Untereinteilung von *Xi-X_B* nach den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *BglIII*, *Sau3A* und *SalI*:

Xi-X_{B-Hom}: *BglIII-Sau3A* (Position 1043-1142, 100 bp)
enthält einen Teil der Homöobox

Xi-X_{B-Spez1}: *Sau3A-Sau3A* (Position 1143-1367, 225 bp)
enthält keine repetitiven Elemente

Xi-X_{B-Rep}: *Sau3A-SalI* (Position 1368-1524, 157 bp)
enthält die repetitive Sequenz Poly(GTCT)

Xi-X_{B-Spez2}: *SalI-BglIII* (Position 1525-1737, 213 bp)
enthält keine repetitiven Elemente

C-3) SEQUENZANALYSEN DES ISOLIERTEN GENFRAGMENTES *XI-X*

Die Sequenz von Xi-X

Das Sequenzieren beruhte auf dem Didesoxyverfahren, beschrieben von Sanger *et al.* (1977). Es wurden zwei verschiedene methodische Ansätze verfolgt: Bei der zuerst angewandten Methode wurden alle benutzten Lösungen angesetzt und das Klenow-Fragment der DNA Polymerase I von *E. coli* (Boehringer) verwendet. Dieses Verfahren zeigte den Nachteil, dass maximal 200 bp von jeder Seite sequenziert werden konnte. Hauptsächlich beruhte dieses auf einem zu kurzen Ablesen der dCTP-Nukleotide. Eine Verschiebung des Verhältnisses Didesoxy-CTP zu Desoxy-CTP ergab keine entscheidende Verbesserung. Gute Bedingungen wurden oft geändert durch eine neue Charge radioaktiv markierter Nukleotide. Diese Methode ergab auch häufig durchgehende Banden über alle 4 Gelspuren (A, C, G, T), besonders in G/C-reichen Regionen, was zusätzlich zu dem Ablesen der Sequenz in diesem Bereich sehr erschwerte, oft das Ablesen der folgenden Sequenz unmöglich machte. Diese Probleme ließen sich nicht, trotz intensiver Optimierungsversuche, lösen: Frische Lösungen wurden immer angesetzt und die Plasmide waren von höchster Reinheit, indem sie zum Teil bis zu zwei Mal über einen CsCl-Gradienten gereinigt waren - auch ohne den erwarteten Erfolg.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde das Sequenzierungs-Kit "Sequenase^R, Version 2.0" von der Firma USB verwendet. Bei diesem Kit waren die verwendeten Lösungen, und die gentechnologisch hergestellte, veränderte DNA Polymerase vom Phagen T7, die Sequenase, Bestandteile des Kits. Die Sequenase arbeitet im Gegensatz zu dem Klenow-Fragment ohne die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Mit diesem Kit konnte über 400 bp in einer Richtung abgelesen werden, und ein Ablesen der G/C-reichen Regionen wurde erreicht. Ein weiterer Vorteil ist die geringere Einsatzmenge radioaktiv markierter Nukleotide, 5 µCi [α -³⁵S]dATP gegenüber 20-30 µCi [α -³⁵S]dCTP des anderen Sequenzverfahrens. Das Sequenzierungs-Kit zeigte aber den Nachteil, dass die Sequenzreaktion nur mit dem "forward" primer stattfand; mit dem "reverse" primer konnte keine Sequenz ermittelt werden.

Für die Sequenzanalysen wurden 20 verschiedene Subklone von *Xi-X* verwendet, diese Klone werden im Abschnitt "Die Herstellung und Subklonierung von kleineren DNA-Fragmenten" (siehe S. 80ff.) und in der Tab. 4 (siehe S. 84) beschrieben. Abb. 16 (siehe S. 83) zeigt eine Auswahl der rekombinanten Plasmide, die für die Sequenzierung eingesetzt wurde. Teilweise wurden die Klone von beiden Richtungen mit Hilfe der "forward" und "reverse" Primer sequenziert, teilweise nur von der einen Seite mittels dem "forward" Primer und die Verwendung der beiden Vektoren pUC 18 und pUC 19, die sich nur in der Richtung der Insertion unterscheiden.

Durch die oben genannten Subklonierungs- und Sequenzierungsstrategien, konnte die gesamte Sequenz vom isolierten homöobox-enthaltenden *EcoRI*-Fragment (2220 bp) von *X. maculatus DrSd/DrSd* erstellt werden, die Sequenz wird in Abb. 19 (siehe S. 88-89) dargestellt. Durch die Anwesenheit der Homöobox kann der kodierende Strang ausfindig gemacht werden. Das Sequenzieren konnte ein extra *BglIII*-*BglIII*-Fragment von 65 bp (Position 1738-1802) ausfindig machen, welches, wegen seiner kurzen Länge und

ERGEBNISSE

dadurch geringe DNA-Konzentration und entsprechendes schwaches Erscheinungsbild in den gelelektrophoretischen Analysen, zunächst übersehen wurde. Das Fragment liegt zwischen dem *Xi-X_B*-Fragment (*Bgl*III-*Bgl*III, Position 1043-1737) und dem *Xi-X_C*-Fragment (*Bgl*III-*Eco*RI, Position 1803-2220), und wurde durch das Sequenzieren des *Sal*I-*Bam*HI Fragments (Position 1525-2082) detektiert.

Aufgrund der bekannten Sequenz konnte eine Restriktionskarte aufgestellt werden, die die Position der Schnittstellen der Restriktionsenzyme, der Homöobox und einer repetitiven Sequenz Poly(GTCT) angeben (siehe Abb. 18 A, siehe unten). Die Sequenzierungsstrategie, d.h. welche Regionen des isolierten Genfragments in welcher Richtung und in welchem Ausmaß sequenziert wurde, wird in Abb. 18 B gezeigt (siehe unten).

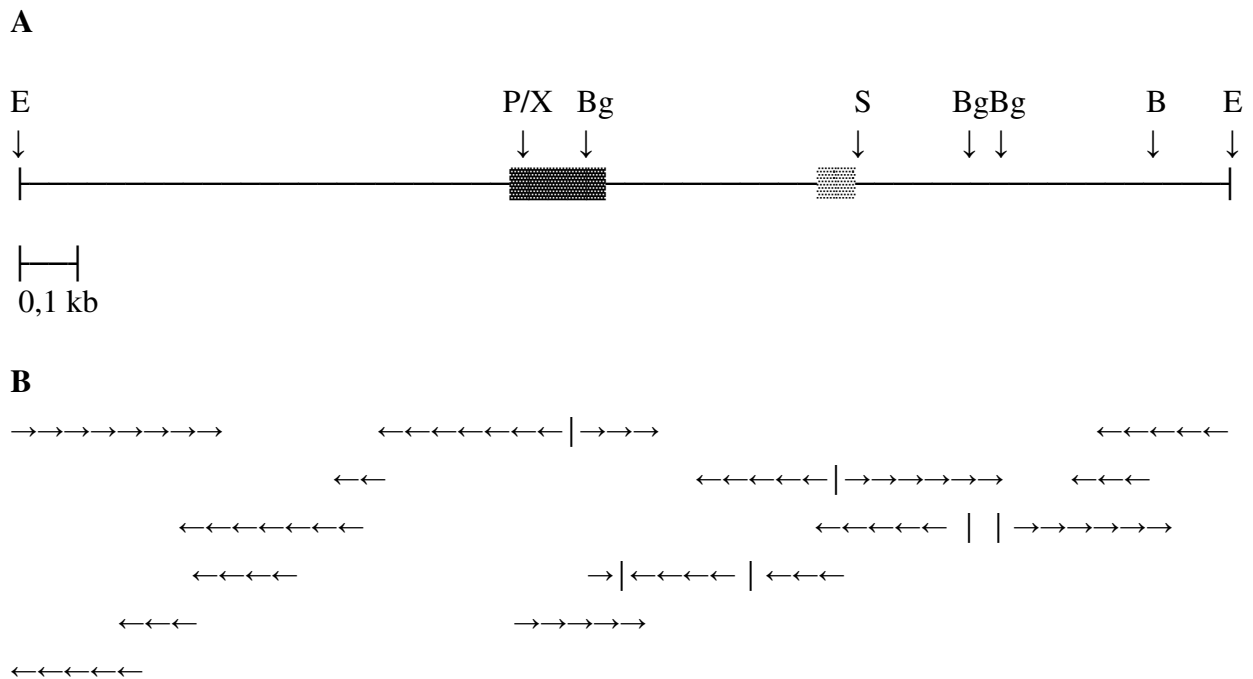


Abb. 18

Die Restriktionskarte (A) und die Sequenzierungsstrategie (B) von *Xi-X*.

Die Restriktionskarte wurde aufgrund der bekannten Sequenz erstellt. Die dunkle Box bezeichnet die Homöobox und die helle Box die repetitive Sequenz Poly(GTCT).

E, *Eco*RI; P, *Pvu*II; X, *Xho*I; Bg, *Bgl*III; S, *Sal*I; B, *Bam*HI.

Das Restriktionsenzym *Hind*III hat keine Schnittstellen in *Xi-X*.

ERGEBNISSE

| | | Sau3A | | | |
|--------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <u>GAATTC</u> ACTG | TATTTGGAAC | AAAAGATCAG | CGCTTGCTAT | TGTGCCACAA | CTTGATACTG |
| 61 | | | | | |
| CAGCGCATAG | ATTCTGAAAC | TTAAACCTGT | AGCAAACTA | TAACCTATGA | GGAAATTATA |
| 121 | | | | | |
| CCCATTAATA | AATATAAATA | GATTATTAAT | GCGGTGTGTA | TTCTTTAAGC | TGACATATAT |
| 181 | | | | | |
| TTATTTAATC | AACTTAAGTA | TGGGTAGTTT | GTAAGTTTGA | TTAAACAGAA | AAAAATACAC |
| 241 | | | | | |
| AGTTTCTGTA | TATATATATA | TATATATATA | TATATAACA | TGATACATTT | GTAAAGTTTT |
| 301 | | | | | |
| TTAATATATA | TTAGCAGAAA | TTGTGCATTT | TCTTCTGTTT | AATCAAACGT | ACAACTACC |
| 361 | | | | | |
| CATACTTAAG | ATGATTATAT | AAATGCACGT | TTGATTGCTT | AGTTCTTAAC | AATAACTTTG |
| 421 | | | | | |
| GTTTGCATAA | AATATATTTT | CACTTACTGG | TTATGAGAAT | CAAATCGAGC | AGCAAAAGTG |
| 481 | | | | | |
| CTTTTTACAT | AGAAACAGGA | GCGCAAAAAA | TTAAGCAAAA | AAACCCATAA | ATTGCTAAAC |
| 541 | | | | | |
| GACTAAATAA | TCACCTTTTT | AGGTTAGTAA | AATTAATAA | ACTGAACTAA | AAAAACATTA |
| 601 | | | | | |
| ACTTAAATTA | TCAAGATGTC | ACCATTTTCA | GTTAAACCAG | TTTTGAATAA | ATCAGATGTT |
| 661 | | | | | |
| ATTTGGCCTT | GACATAAATA | ATACATTTAT | TGTTTTGTTT | CTGTTGCATG | ACCAACTTGT |
| 721 | | | | | |
| TTCTGATTTT | ATCATCAGTT | ATTTGGCTCT | GCTCTAAGTT | TTACCACAAT | CCCAATAAAA |
| 781 | | | | | |
| AAAAAGTTTT | ATTAAGTGT | ATGAAAGTGT | CTTAAACAAT | AAATAACAGA | ATTACATTAT |
| 841 | | | * | | |
| ATACAAGACT | CGGAATCCCG | ATTTTGTTTT | <u>CCAGGGTCTT</u> | ACGTGATGAC | CGAGGCAGAG |
| 901 | | | PvuII | | XhoI |
| GAAAACAAGC | GCACGCGGAC | CGCGTACACG | CGCGCC<u>CAGC</u> | <u>TGCTGGAGCT</u> | <u>CGAGAAGGAG</u> |
| 961 | | | | | |
| TTCTCTTCA | ACCGCTACAT | CTCGAGGCCG | CGGCGCGTGG | AGCTGGCACT | GACCCTGAGC |
| 1021 | | BglII | | | |
| CTCACCGAGC | GCCACATCAA | <u>GATCTGGTTC</u> | CAGAACCGGC | GCATGAAGTG | GAAGAAGGAG |
| 1081 | | | | | |
| GAGGACCGGA | GAAGGGCCAG | GGGGTCTGAG | CCGACCAGG | ACTCTTCAT | CACCTCTGGG |
| Sau3A | | | | | |
| <u>GATC</u> AGGGAG | AGACTGCGGG | GGCAGGGGTG | TCTTCCTCGA | ATGGACCTCA | CACCAGCACG |
| 1201 | | | | | |
| CCCCCTGTTT | CCCCACTGCA | TGGCCACACG | TTGTCCGCGT | CGGGGTCCAG | AGAACCAGCA |
| 1261 | | | | | |
| TAGACGTGGA | CAGCACTCGC | TCTTAATTGG | ATTATATAGG | AAATATATAT | ATTTTTGGTG |

ERGEBNISSE

| | | | | Sau3A | |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------------------|
| 1321 | CAGAAAGATA | AAGCTGTTCT | TACAGCAAGT | TAAAGGACCT | GTCGAG <u>GATCC</u> CCTCATGCAT |
| 1381 | TCCAGTTTTT | TTTTTTTTTT | TTTTTTACAT | GGGAAATGTG | GCTCACTGCC GAGGGCGCCA |
| 1441 | TTCATCAGGG | AGCAGAAATC | AGTCTGTCTG | TCTGTCTGTC | TGTCTGTCTG TCTGTCTGTC |
| 1501 | TGTCTGTCTG | TCTGTCTGTC | Sall | TCAATTCAAA | GTTACATTTT AGTAGACAAC |
| 1561 | AGGTTTTACT | ATTGTGTACA | TTCCAGATAT | CAGCATCCAC | CTGTGTATAT ATGTTTAAAT |
| 1621 | CACATGCTTT | ATTAATAACA | CTGTTTAAAA | GTGTATATGC | TAACTTTGA <u>A</u> <u>ATAAAA</u> ACAT |
| 1681 | ATACAAGTAC | TTAAGTATTG | CAGCTCCCTG | TAAATGTGG | TCAAAC TGGA ACAGAG <u>GATCT</u> |
| 1741 | CTAGGCTTTA | TAAC TTGTTT | GTTGCGTCAG | AGAGCGTGAG | ACCTGGAGA CGCAGGCGCA |
| BglIII | <u>GATCT</u> CTTC | ACCTCCGCAA | TGCCGCGCGC | CCTTTCCGCC | GCGCGCTCGT TCCGGCAGCG |
| 1861 | CTCAGAGAGC | TCGCGCAAGA | TGGTCACCTT | GTCATTCATC | CGCGCGCAGA TGACAAACGG |
| 1921 | GAAGCCGAAG | CGCCCCTTGT | ACTCTGCGTT | CAGCCGCGCC | ATCTGCGAGG CTCCGCCGAG |
| 1981 | CTCAGCGCGT | CCATCCGACT | CGGGTCTGCT | CTTCTGGGA | CTCCGGGTC AATGCACCGC |
| 2041 | TGTGGAGATG | CTTGCCCGCG | AGGTCCGGGT | GACACCTGAG | <u>GATCCCCTCC</u> TTACCTGGAC |
| 2101 | ACATCTGGTG | ACTCATTATA | CTGCTCCAG | TATGGATATG | ATA <u>ATA</u> AAAA GTACAAGGTG |
| 2161 | CGTGAAACAC | AGCAAAAATC | CTTTAACCTC | ACCCGACTCT | GGGAGAGCAT CGAT <u>GAA</u> TTCC |

Abb.19

Die Sequenz vom isolierten Genabschnitt Xi-X (1-2220 bp).

Die Homöobox (Position 904-1083) und die simplen repetitiven Sequenzen Poly(TA) (Position 249-276), Poly(T) (Position 1386-1406) und Poly(GTCT) (Position 1462-1524) sind fett gedruckt worden. Die Restriktionsschnittstellen sind markiert und die Erkennungsnukleotide der Restriktionsenzyme unterstrichen. Das eine vermutliche Spleißsignal 3' für die Homöobox ist mit * markiert und das Akzeptorsignal AG unterstrichen (siehe auch Abb. 20, S. 94). Die zwei potentielle Polyadenylierungssignale AATAAA (Position 1670-1675 und 2144-2149) sind doppel unterstrichen worden. *Sau3A*-Schnittstellen befinden sich zusätzlich zu den markierten Positionen auch in den angegebenen *Bam*HI und *Bgl*III-Erkennungssequenzen.

Vergleichende Sequenzanalysen von Xi-X

Die gesamte ermittelte Sequenz vom isolierten *Xi-X*-Bereich wird in der Abb. 19 (siehe S. 88-89) dargestellt. Eine Homöobox konnte zu einer Region ungefähr in der Mitte des Fragments *Xi-X* identifiziert werden (Position 904-1083). Ein Sequenzbereich konnte sowohl durch seinen charakteristischen, repetitiven Charakter, Poly(GTCT), als auch durch Southern Analysen des Subfragments *Xi-X_{B-Rep}* als repetitiv im Genom identifiziert werden (siehe auch S. 151ff.). Die repetitive Sequenz Poly(GTCT) liegt 3' zu der Homöobox (Position 1462-1524). Das isolierte Fragment von *Xi-X* beinhaltet auch zwei andere Regionen mit einfach wiederholten Sequenzen, Poly(TA) und Poly(T). Poly(TA) befindet sich in der 5'-Region vom isolierten *Xi-X*-Fragment (Position 249-276) und Poly(T) zwischen der Homöobox und der Sequenz Poly(GTCT) (Position 1386-1406). Das Polyadenylierungssignal AATAAA ist in der Sequenz von *Xi-X* zwei Mal vorhanden, beide strangabwärts zur Homöobox (Position 1670-1675 und 2144-2149). Ein vermutliches homöobox-enhaltendes Exon von *Xi-X* mit der entsprechenden Aminosäuresequenz wird in der Abb. 20 (siehe S. 94) gezeigt.

Die Sequenz von *Xi-X* wurde mit der Genbank von NCBI verglichen:

Das Homöobox Gen, *Xi-X-HB*

Die Homologie der isolierten *Xi-X* Homöobox zu den Homöoboxen der verwendeten Gensonden *Antp* und *ftz* (Scott & Weiner, 1984) beträgt ca. 72% (130 bzw. 131 von 180 nt) auf der Nukleotidsäureebene (nicht gezeigt).

Eine hohe Homologie der Homöobox von *Xi-X* konnte zu den Homöoboxen der Familie *Xlox* der Homöobox Gene (Bürglin, 1993) gefunden werden. Für die gesamten Homöodomänen der *Xlox*-Familie befindet sich in Position 44, die dritte Position der Helix-III, ein Histidin-Rest statt des Glutamin-Rests, was in keinen bekannten Homöodomänen außerhalb dieser Familie auffindig gemacht worden ist. Dieses trifft auch für *Xi-X* zu.

Gene dieser Familie sind sowohl unter den wirbellosen Tieren, z.B. den Anneliden (Wedeen *et al.*, 1990; Wysocka-Diller *et al.*, 1995; Irvine *et al.*, 1997), als auch unter den Wirbeltieren, wie Fisch (Milewski *et al.*, 1998), Frosch (Wright *et al.*, 1988; vollständige Sequenz unter accession number X16849 bei NCBI), Vogel (Gerrish *et al.*, 2000) und Säuger (Ohlsson *et al.*, 1993) nachgewiesen worden. Für die Säuger wurden verschiedene Gennamen verwendet; *Ipf-1* ("insulin promoter factor 1": Ohlsson *et al.*, 1993), *Stf-1* ("somatostatin transactivating factor 1": Petersen *et al.*, 1994) und *Pdx-1* ("pancreaticoduodenal homeobox factor 1": Offield *et al.*, 1996), alle der Maus, *Idx-1* ("islet duodenum homöobox factor": Miller *et al.*, 1994) und *Stf-1* (Leonard *et al.*, 1993) der Ratte und *IPF-1* (Stoffel *et al.*, 1995) für das human Gen. Für *Ipf-1*, *Stf-1*, *Pdx-1* und *Idx-1* hat es sich herausgestellt, dass es sich um identische bzw. orthologe Gene handelt, jetzt mit *pdx-1* bezeichnet (von: Offield *et al.*, 1996; Peshavaria *et al.*, 1997). Die Bezeichnung *IPF-1* wird aber häufig angewandt, vor allem für das humane Gen. Das Gen *XIHbox 8* des Frosches wurde als das entsprechende, orthologe Gen der Amphibien vorgeschlagen (Peshavaria *et al.*, 1994), und das *pdx-1* Gen des Fisches *Danio rerio* wurde beschrieben (Milewski *et al.*, 1998). Ein *pdx*-Gen des Medaka-Fisches

Oryzias latipes ist in der Genbank von NCBI seit 1999 zugänglich (accession number AB026976).

Aufgrund des unterschiedlichen Expressionsmusters ist es fragwürdig, ob es sich bei *Xiphophorus* für *Xi-X* um das *pdx-1*-Ortholog handelt (siehe Ergebnisse, S. 159ff.).

Nukleinsäure-Ebene

Homologien von *Xi-X* zu anderen *pdx*-Genen sind in der Tab. 5A (siehe S. 102) aufgelistet.

Obwohl die Homologie der Nukleotidsequenz von *Xi-X* zu einem der ersten publizierten *Xlox*-Genen, *Htr-A2* von *Helobdella triseriales* (Wedeen *et al.*, 1990), nur 64% für die Homöoboxen beträgt (nicht gezeigt), liegt die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen auf 85% (siehe Abb. 25, S. 99). Der geringe Homologiegrad auf der Nukleinsäureebene führte zu einem negativen Ergebnis bei der ersten Genbank-Durchmusterung. Dieses ist auf dem degenerativen Code zurückzuführen: Eine unterschiedliche Nukleotidverwendung in der 3. Position der Codons ergibt häufig dieselbe Aminosäure; für *Htr-A2* und *Xi-X* trifft dieses für 30 der 60 Aminosäuren zu. Das Gleiche könnte sich für das *pdx-1* Gen des Hähnchens *Gallus gallus* (Gerrish *et al.*, 2000) gältend machen, denn der Vergleich der Sequenz mit *Xi-X* in dem BLAST-Programm von NCBI kann keine Nukleotid-Homologie feststellen.

Für das Gen *pdx-1* der Ratte beträgt die Homologie zu der *Xi-X*-Homöobox 79% (143 von 180 nt; Abb. 21, S. 95), für das *pdx-1* Gen des Frosches 78% (141 von 180 nt; Abb. 22, S. 96). Die höchste Homologie konnte zu der Homöobox des Zebrafisches mit 85% (153 von 180 nt; Abb. 23, S. 97) gefunden werden. Für Medaka ist die publizierte Sequenz der Homöobox nicht vollständig, aber in dem publizierten Bereich von 121 nt der 3'-Region der Homöobox beträgt die Homologie 94% (114 von 121 nt; Abb. 24, S. 98), höher wie der entsprechende Bereich des Zebrafisches (103 von 121 nt).

Bei sehr vielen homöobox-enthaltenden Genen liegen Spleißakzeptorsignale kurz strangaufwärts zur Homöobox. Auch bei dem isolierten homöobox-enthaltenden Gen *Xi-X* ist dieses wahrscheinlich, denn 29 nt von der Homöobox entfernt befinden sich Nukleotide mit einer hohen Homologie zur Konzensussequenz einer Intron-Exon-Verbindungsstelle (siehe Abb. 20, S. 94).

Einen geringen Homologiegrad kann in den Regionen 5' zu den Homöoboxen zwischen verschiedenen *pdx-1*-Genen und *Xi-X* festgestellt werden. Zu dem Gen des Zebrafisches sind in dieser Region 14 von 18 nt, zu dem Gen des Frosches 11 von 18 nt und zum Gen der Ratte 8 von 12 nt mit *Xi-X* identisch. Für Medaka ist dieser Bereich nicht publiziert worden. Die beschränkte Homologie in dieser Region ist vermutlich durch die angenommene Ende des Exons 29 nt strangaufwärts zur *Xi-X* Homöobox zu erklären.

In den Regionen 3' zu den Homöoboxen ist für das *pdx-1* Gen des Zebrafisches 47 von 61 nt, des Frosches 35 von 60 nt und der Ratte nur 11 von 21 nt mit *Xi-X* identisch. Die Homologie in dieser Region 3' zur Homöobox ist für Medaka am höchsten mit 77% in einer Region von 182 nt (141 von 182 nt).

Auf der Nukleotidsäureebene beträgt die Gesamthomologie vom isolierten *Xi-X*-Bereich zum Gen *pdx-1* vom Zebrafisch 82% in einer Region von 259 nt (214 von 259 nt). Beim Frosch sind 72% von 258 nt (187 von 258 nt) identisch. Für das *pdx-1* Gen der Ratte ist die Homologie 76% in einer Region von 213 nt (162 von 213 nt). Für Medaka beträgt die Homologie 84% in einer Region von 303 nt (255 von 303 nt).

Der Homologiegrad von *Xi-X* zu den *pdx*-Genen anderer Arten entspricht grob dem Verwandtschaftsgrad der Organismen, für Fischsystematik, siehe Abb. 31 (S. 108). Auffallend ist der hohe Homologiegrad von *Xi-X* zum *pdx*-Gen von Medeka, besonders in der Region strangabwärts zur Homöobox. Dieses trifft auch für die entsprechende As-Sequenz zu (siehe Abb. 26B, S. 101). Eine weitere Kennzeichnung dieser beiden Gene von *Xiphophorus* und *Oryzias* ist das Codon 24 (CGC) der Homöobox, für Arginin kodierend (siehe Abb. 24, S. 98, hier das 4. aufgezeichnete Codon), das im Gegensatz zu anderen publizierten Gene dieser Familie (siehe Abb. 21, S. 95, Abb. 22, S. 96, Abb. 23, S. 97) mit dem Codon AAA, kodierend für Lysin, für diese beiden Fischarten identisch sind; ein konservierter As-Austausch, aber mit einem ganz abweichenden Codon (siehe auch Abb. 25, S. 99).

Aminosäure-Ebene

Strukturanalysen haben drei Helix-Regionen der Homöodomänen ausfindig machen können, wobei die Helix-III, die DNA Erkennungssequenz, bei vielen Homöodomänen in Lösung einen Knick macht und in Helix-III und Helix-IV unterteilt werden kann (Zusammenfassung bei Gehring *et al.*, 1994). Während die Helix-III nach Definition die korrekte Struktur einer α -Helix einnimmt, ist die Sekundärstruktur von Helix-IV mehr flexibel. Die globale Struktur der Homöodomänen ist in der Evolution von Hefe bis zu den Vertebraten sehr gut konserviert (Wolberger *et al.*, 1991). Abb. 25A (siehe S. 99) zeigt die aus der Nukleotidsequenz entnommene Aminosäuresequenz der *Xi-X* Homöodomäne und die konservierten Helix-Regionen, und Abb. 25B (siehe S. 99) zeigt die Homologie anderer Homöodomänen zu der Homöodomäne von *Xi-X*. In Tab. 5B (siehe S. 102) ist der Homologiegrad von der entnommenen As-Sequenz von *Xi-X* zu denen anderer Mitglieder dieser Familie aufgelistet worden.

Die Homöodomäne des PDX-1 Faktors vom Zebrafisch ist mit der Ausnahme von einem konservierten Aminosäureaustausch mit der Homöodomäne von *Xi-X* identisch (siehe Abb. 25B, S. 99). Die publizierte Homöodomäne vom Medeka-Fisch ist nicht vollständig, aber die 40 letzten Aminosäuren der Domäne sind gleich mit denen von *Xi-X*. Die Homologie der Homöodomänen kodiert von den *pdx-1*-Genen des Frosches, der Ratte und des Menschen, die identisch sind, zu der *Xi-X* Homöodomäne beträgt 93% (56 von 60 As; Abb. 25B, S. 99). Werden die drei konservierten Aminosäureaustausche berücksichtigt, beträgt die Homologie von *Xi-X* zu dieser Gruppe 98% (59 von 60 As). Die Homologie der aminoterminalen Region und der ersten Helix der Homöodomänen beträgt 100%, eine Region, die häufig zwischen den Homöodomänen die größten Abweichungen aufweisen. Auch die Region Helix-III/IV verantwortlich für die DNA-Erkennung, sind bei diesen Faktoren und *Xi-X* identisch. Für die anderen Mitglieder der *Xlox*-Familie, isoliert aus Blutegel und Amphioxus, sind die Differenzen größer, wobei die abweichenden Aminosäuren in allen Bereichen der Homöodomänen verteilt sind (siehe Abb. 25B, S. 99).

Die Homologie der Genprodukte von *Xi-X* zu denen der *pdx-1* Gene von Ratte, Frosch, Zebrafisch (siehe Abb. 26A, S. 100) und dem Medaka-Fisch (siehe Abb. 26B, S. 101) erstreckt sich in die N- und C-terminalen Regionen zu den Homöodomänen hinein: In den N-terminalen Positionen zu den Homöodomänen von *Xi-X* und der Ratte breitet sich die Homologie 4 Aminosäuren hinaus, wobei 3 der 4 Aminosäurereste identisch

sind; alle ein Glutaminsäurerest. Diese 3 Glutaminsäurereste sind auch beim Frosch und Fisch konserviert. Für den Frosch, mit einer Lücke in der Froschsequenz, sind 6 von 9 As identisch, dazu kommt ein konservierter Austausch. Beim Zebrafisch sind 5 von 6 Aminosäuren identisch.

Zwischen Frosch und *Xi-X* sind 11 von 20 As der ersten Aminosäuren C-terminal zur Homöodomäne identisch, werden die konservierten Aminosäureaustausche mitberechnet sind es 17 von 20 As. Wird eine Lücke von 10 As in die xiphophorine Sequenz eingebaut ergibt sich eine zusätzliche Homologie nach dieser Lücke; in der C-terminalen Region sind dann 19 As identisch und 27 As positiv (identische und konservierte As) von insgesamt 54 As. Auch bei den anderen Organismen kann mit Lücken in der C-terminalen Region erweiterte Homologien festgestellt werden. Wird bei *Xi-X* eine Lücke von 8 eingebaut befindet sich im Vergleich zum Gen *pdx-1* der Ratte Homologien innerhalb von 29 As, davon sind 10 identisch und dazu kommt 7 konservierte Austausche. Für den Zebrafisch ist die Homologie im C-terminalen Bereich größer. Eine Lücke von 6 As wird in der Zebrafisch-Sequenz benötigt, um 25 identische und 32 positive As von insgesamt 51 zu erreichen. Die höchste Homologie ist für den nah verwandten Medekafisch *Oryzias latipes* vorhanden. In den Sequenzen in der C-terminalen Region zur Homöodomäne sind 49 von 59 As identisch, in *Oryzias latipes* fehlt in dieser Region eine Aminosäure. Werden die konservierten Unterschiede berücksichtigt sind 52 von 59 As homolog.

Auf der Aminosäureebene befindet sich zwischen den beiden piscinen Genen *Xi-X* und *pdx-1* des Zebrafisches (89 bzw. 97 As von 117) insgesamt 76% identische bzw. 82% positive As in einer Region von 117 Aminosäuren. Zwischen *Xi-X* und dem *pdx-1* Gen des Frosches sind 65% identische bzw. 75% positive As in einer Region von 123 As (81 bzw. 93 von 123 As). Die Homologie von *Xi-X* zu dem Gen *pdx-1* der Ratte beträgt 74% bzw. 84% in 93 As (69 bzw. 79 von 93 As). Für den Medekafisch und *Xiphophorus* beträgt für die gesamte Region von 99 As die Homologie 89 % bzw. 92 % (89 bzw. 92 von 99 As).

ERGEBNISSE

*

```

    AG  GG TCT TAC GTG ATG ACC GAG GCA GAG GAA
         Ser Tyr Val Met Thr Glu Ala Glu Glu

AAC AAG CGC ACG CGG ACC GCG TAC ACG CGC GCC CAG CTG CTG GAG
Asn Lys Arg Thr Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Ala Gln Leu Leu Glu

CTC GAG AAG GAG TTC CTC TTC AAC CGC TAC ATC TCG AGG CCG CGG
Leu Glu Lys Glu Phe Leu Phe Asn Arg Tyr Ile Ser Arg Pro Arg

CGC GTG GAG CTG GCA CTG ACC CTG AGC CTC ACC GAG CGC CAC ATC
Arg Val Glu Leu Ala Leu Thr Leu Ser Leu Thr Glu Arg His Ile

AAG ATC TGG TTC CAG AAC CGG CGC ATG AAG TGG AAG AAG GAG GAG
Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Glu Glu

GAC CGG AGA AGG GCC AGG GGG TCT GAG CCG GAC CAG GAC TCT TCC
Asp Arg Arg Arg Ala Arg Gly Ser Glu Pro Asp Gln Asp Ser Ser

ATC ACC TCT GGG GAT CAG GGA GAG ACT GCG GGG GCA GGG GTG TCT
Ile Thr Ser Gly Asp Gln Gly Glu Thr Ala Gly Ala Gly Val Ser

TCC TCG AAT GGA CCT CAC ACC AGC ACG CCC CCT GTT TCC CCA CTG
Ser Ser Asn Gly Pro His Thr Ser Thr Pro Pro Val Ser Pro Leu

CAT GGC CAC ACG TTG TCC GCG TCG GGG TCC AGA GAA CCA GCA TAG
His Gly His Thr Leu Ser Ala Ser Gly Ser Arg Glu Pro Ala

ACGTGGACAGCACTCGCTCTTAATTGGATTATATAGGAAATATATATATATTTTTGGTGCA

GAAAGATAAAGCTGTTCTTACAGCAAGTTAAAGGACCTGTCGAGATCCCCTCATGCATT

CCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACATGGGAAATGTGGCTCACTGCCGAGGGCGCCA

TTCATCAGGGAGCAGAAATCGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGT

CTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCGACAAGTCAATTCAAAGTTACATTTCAGTAGACA

ACAGTTTTTACTATTGTGTACATTCCAGATATCAGCATCCACCTGTGTATATATGTTTA

AATCACATGCTTTATTAATAACACTGTTTAAAAGTGTATATGCTAACTTTGAAAAA

```

Abb. 20

Die Nukleotid- und entsprechende Aminosäuresequenz eines angenommenen, homöobox-enhaltenden Exons von Xi-X.

Die Position eines vermutlichen Spleißakzeptorsignals (siehe unten) in der 5'-Region ist mit * angezeigt, das Spleißakzeptor-Signal AG und das Stop-Codon TAG unterstrichen und das Polyadenylierungs-Signal AATAAA doppel unterstrichen. Die Homöobox und die repetitive Sequenz Poly(GTCT) sind fett gedruckt worden.

Die Konzensussequenz eines Spleißakzeptorsignals ist (C/T)_{>10}N(C/T)AGG, bei Xi-X sind die Nukleotide 5' zum aufgezeichneten Exon TCCCGATTTTGTTTTCCAG*G.

Dieses Exon könnte einem Teil des LeberB-Transkriptes entsprechen (siehe S. 165ff.).

ERGEBNISSE

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----|
| | | | | | | * | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | | | | | <u>AG</u> | GG | TCT | TAC | GTG | ATG | ACC | GAG | GCA | GAG | GAA | |
| | | | | | | * | * | | | | * | ** | * | *** | ** | |
| <i>pdx</i> | | | | | | GA | GGT | GCA | TAC | GCA | GCA | GAA | CCG | GAG | GAG | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | AAC | AAG | CGC | ACG | CGG | ACC | GCG | TAC | ACG | CGC | GCC | CAG | CTG | CTG | GAG | |
| | ** | *** | * | ** | ** | ** | ** | *** | ** | ** | *** | *** | *** | *** | *** | ** |
| <i>pdx</i> | AAT | AAG | AGG | ACC | CGT | ACA | GCC | TAC | ACT | CGG | GCC | CAG | CTG | CTG | GAG | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | CTC | GAG | AAG | GAG | TTC | CTC | TTC | AAC | CGC | TAC | ATC | TCG | AGG | CCG | CGG | |
| | ** | *** | *** | ** | *** | * | ** | *** | | *** | *** | ** | ** | ** | ** | ** |
| <i>pdx</i> | CTG | GAG | AAG | GAA | TTC | TTA | TTT | AAC | AAA | TAC | ATC | TCC | CGG | CCT | CGC | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | CGC | GTG | GAG | CTG | GCA | CTG | ACC | CTG | AGC | CTC | ACC | GAG | CGC | CAC | ATC | |
| | ** | *** | *** | *** | *** | ** | * | ** | * * | * | ** | *** | * | *** | *** | ** |
| <i>pdx</i> | CGG | GTG | GAG | CTG | GCA | GTG | ATG | CTC | AAC | TTG | ACT | GAG | AGA | CAC | ATC | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | AAG | ATC | TGG | TTC | CAG | AAC | CGG | CGC | ATG | AAG | TGG | AAG | AAG | GAG | GAG | |
| | ** | *** | *** | *** | ** | *** | ** | *** | *** | *** | *** | *** | ** | *** | ** | ** |
| <i>pdx</i> | AAA | ATC | TGG | TTC | CAA | AAC | CGT | CGC | ATG | AAG | TGG | AAG | AAA | GAG | GAA | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | GAC | CGG | AGA | AGG | GCC | AGG | GGG | TCT | GAG | CCG | GAC | CAG | GAC | TCT | TCC | |
| | ** | * | * * | * | | ** | *** | * | * | | * | | * | | * | |
| <i>pdx</i> | GAT | AAG | AAA | CGT | AGT | AGC | GGG | ACA | ACG | AGC | GGG | GGC | GGT | GGG | GGC | |

Abb. 21

Nukleotidsequenz-Vergleich der Homöobox mit 5'- und 3'-liegenden Sequenzen vom Gen *pdx-1* der Ratte, *Rattus norvegicus* (Leonard *et al.*, 1993), mit den entsprechenden Sequenzen von *Xi-X*.

Die gestrichelten Linien grenzen die Homöobox ein, im Bereich der fett gedruckten Sequenzen sind die Homologien ausgerechnet worden.

Die Homologie beträgt 79% zu der Homöobox (143 von 180 nt) und 8 von 12 nt strangaufwärts und 11 von 21 nt strangabwärts zur Homöobox sind identisch; insgesamt eine Homologie von 76% in einer Region von 213 nt (162 von 213 nt).

ERGEBNISSE

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--|
| | | | | | * | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | | | | <u>AG</u> | GG | TCT | TAC | GTG | ATG | ACC | GAG | GCA | GAG | GAA | | |
| | | | | | | | * | | ** | * | ** | * | *** | ** | | |
| <i>pdx</i> | | | | AT | GGA | TCA | TAC | ATA | ATG | GAA | CAA | GAG | GAG | | | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | AAC | AAG | CGC | ACG | CGG | ACC | GCG | TAC | ACG | CGC | GCC | CAG | CTG | CTG | GAG | |
| | *** | ** | * | ** | ** | ** | ** | *** | ** | * | *** | *** | *** | *** | ** | |
| <i>pdx</i> | AAC | AAA | AGA | ACA | AGG | ACA | GCC | TAC | ACA | AGA | GCC | CAG | CTG | CTG | GAA | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | CTC | GAG | AAG | GAG | TTC | CTC | TTC | AAC | CGC | TAC | ATC | TCG | AGG | CCG | CGG | |
| | ** | *** | *** | ** | *** | *** | *** | *** | | *** | *** | ** | * | ** | ** | |
| <i>pdx</i> | CTA | GAG | AAG | GAA | TTC | CTC | TTC | AAC | AAA | TAC | ATC | TCT | CGA | CCA | AGG | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | CGC | GTG | GAG | CTG | GCA | CTG | ACC | CTG | AGC | CTC | ACC | GAG | CGC | CAC | ATC | |
| | * | ** | *** | *** | *** | * | * | *** | * * | ** | ** | *** | * | *** | ** | |
| <i>pdx</i> | AGA | GTA | GAG | CTG | GCA | GTC | ATG | CTG | AAC | CTG | ACA | GAG | AGA | CAC | ATA | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | AAG | ATC | TGG | TTC | CAG | AAC | CGG | CGC | ATG | AAG | TGG | AAG | AAG | GAG | GAG | |
| | ** | *** | *** | *** | *** | ** | *** | * | *** | *** | *** | *** | *** | *** | ** | |
| <i>pdx</i> | AAA | ATC | TGG | TTC | CAG | AAT | CGG | AGA | ATG | AAG | TGG | AAG | AAG | GAG | GAA | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | GAC | CGG | AGA | AGG | GCC | AGG | GGG | TCT | GAG | CCG | GAC | CAG | GAC | TCT | TCC | |
| | ** | | * | ** | * | ** | ** | * | ** | ** | ** | ** | *** | *** | | |
| <i>pdx</i> | GAT | AAA | AAG | AGA | GGA | AGA | GGC | AGT | GAC | CCA | GAA | CAA | GAC | TCT | GTT | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | ATC | ACC | TCT | GGG | GAT | CAG | GGA | GAG | ACT | GCG | GGG | GCA | GGG | GTG | TCT | |
| | * | ** | *** | * | *** | * | * | * | * | * | * | * | * | * | * | |
| <i>pdx</i> | GTG | TCC | TCT | GCA | GAT | GTG | CTA | AAA | GAT | GAG | CCT | CAA | TGT | CTT | GGA | |

Abb. 22

Nukleotidsequenz-Vergleich der Homöobox mit 5'- und 3'-liegenden Sequenzen vom Gen *pdx-1* des Frosches, *Xenopus laevis* (Wright *et al.*, 1988; NCBI accession number X16849), mit den entsprechenden Sequenzen von *Xi-X*.

Die gestrichelten Linien grenzen die Homöobox ein, im Bereich der fett gedruckten Sequenzen sind die Homologien ausgerechnet worden.

Die Homologie beträgt 78% zu der Homöobox (141 von 180 nt) und 11 von 18 nt strangaufwärts und 35 von 60 nt strangabwärts zur Homöobox sind identisch; insgesamt 72% in einer Region von 258 nt (187 von 258 nt).

ERGEBNISSE

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|--|--|
| | | | | | | * | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | | | | | | <u>AG</u> | GG | TCT | TAC | GTG | ATG | ACC | GAG | GCA | GAG | GAA | | |
| | | | | | | | | | | | *** | * | *** | ** | *** | ** | | |
| <i>pdx</i> | | | | | | | CA | GGC | CCT | TAT | ATG | GTC | GAG | GCC | GAG | GAG | | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | AAC | AAG | CGC | ACG | CGG | ACC | GCG | TAC | ACG | CGC | GCC | CAG | CTG | CTG | GAG | | | |
| | *** | *** | *** | *** | ** | ** | ** | *** | ** | * | ** | *** | *** | ** | *** | | | |
| <i>pdx</i> | AAC | AAG | CGC | ACG | CGC | ACA | GCT | TAC | ACC | AGA | GCG | CAG | CTG | CTC | GAG | | | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | CTC | GAG | AAG | GAG | TTC | CTC | TTC | AAC | CGC | TAC | ATC | TCG | AGG | CCG | CGG | | | |
| | *** | *** | ** | *** | ** | *** | *** | *** | | *** | *** | *** | * | *** | ** | | | |
| <i>pdx</i> | CTC | GAG | AAA | GAG | TTT | CTC | TTC | AAC | AAA | TAC | ATC | TCG | CGC | CCG | CGC | | | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | CGC | GTG | GAG | CTG | GCA | CTG | ACC | CTG | AGC | CTC | ACC | GAG | CGC | CAC | ATC | | | |
| | *** | ** | ** | ** | *** | ** | *** | ** | *** | *** | *** | *** | * | *** | *** | | | |
| <i>pdx</i> | CGC | GTT | GAA | CTC | GCA | CTC | ACC | CTC | AGC | CTC | ACC | GAG | AGA | CAC | ATC | | | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | AAG | ATC | TGG | TTC | CAG | AAC | CGG | CGC | ATG | AAG | TGG | AAG | AAG | GAG | GAG | | | |
| | *** | *** | *** | ** | *** | *** | ** | *** | *** | *** | *** | ** | ** | *** | *** | | | |
| <i>pdx</i> | AAG | ATC | TGG | TTT | CAG | AAC | CGA | CGC | ATG | AAG | TGG | AAA | AAA | GAG | GAG | | | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | GAC | CGG | AGA | AGG | GCC | AGG | GGG | TCT | GAG | CCG | GAC | CAG | GAC | TCT | TCC | | | |
| | *** | * | ** | ** | *** | *** | ** | | ** | ** | ** | *** | *** | ** | *** | | | |
| <i>pdx</i> | GAC | AAG | AGG | AGA | GCC | AGG | GGA | GTG | GAT | CCC | GAA | CAG | GAC | TCC | TCC | | | |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | ATC | ACC | TCT | GGG | GAT | CAG | GGA | GAG | ACT | GCG | GGG | GCA | GGG | GTG | TCT | | | |
| | *** | ** | ** | *** | *** | * | | ** | * | * | * | * | ** | * | * | | | |
| <i>pdx</i> | ATC | ACG | TCC | GGG | GAT | CTT | AAG | GAT | GAA | TCT | TGC | GTC | GGC | ACG | GCA | | | |

Abb. 23

Nukleotidsequenz-Vergleich der Homöobox mit 5'- und 3'-liegenden Sequenzen vom Gen *pdx-1* des Zebrafisches, *Danio rerio* (Milewski *et al.*, 1998), mit den entsprechenden Sequenzen von *Xi-X*.

Die gestrichelten Linien grenzen die Homöobox ein, im Bereich der fett gedruckten Sequenzen sind die Homologien ausgerechnet worden.

Die Homologie beträgt 85% zu der Homöobox (153 von 180 nt) und 14 von 18 nt strangaufwärts und 47 von 61 nt strangabwärts zur Homöobox sind identisch; insgesamt 82% Homologie in einer Region von 259 nt (214 von 259 nt).

ERGEBNISSE

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>Xi-X</i> | | C | CTC | TTC | AAC | CGC | TAC | ATC | TCG | AGG | CCG | CGG | | | |
| | | ** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | ** | *** | *** | *** | | | |
| <i>pdx</i> | | T | CTG | TTC | AAC | CGC | TAC | ATC | TCC | AGG | CCG | CGG | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | CGC | GTG | GAG | CTG | GCA | CTG | ACC | CTG | AGC | CTC | ACC | GAG | CGC | CAC | ATC |
| | *** | ** | *** | *** | ** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | ** | *** | *** |
| <i>pdx</i> | CGC | GTC | GAG | CTG | GCG | CTG | ACC | CTG | AGC | CTC | ACC | GAG | CGT | CAC | ATC |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | AAG | ATC | TGG | TTC | CAG | AAC | CGG | CGC | ATG | AAG | TGG | AAG | AAG | GAG | GAG |
| | *** | *** | *** | ** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |
| <i>pdx</i> | AAG | ATC | TGG | TTT | CAG | AAC | CGG | CGC | ATG | AAG | TGG | AAG | AAG | GAG | GAG |
| ----- | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | GAC | CGG | AGA | AGG | GCC | AGG | GGG | TCT | GAG | CCG | GAC | CAG | GAC | TCT | TCC |
| | *** | *** | ** | *** | ** | *** | ** | | ** | *** | ** | ** | *** | ** | *** |
| <i>pdx</i> | GAC | CGG | AGG | AGG | GCG | AGG | GGA | GCC | GAT | CCG | GAT | CAA | GAC | TCC | TCC |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | ATC | ACC | TCT | GGG | GAT | CAG | GGA | GAG | ACT | GCG | GGG | GCA | GGG | GTG | TCT |
| | *** | *** | *** | ** | ** | *** | *** | *** | *** | ** | ** | | ** | *** | ** |
| <i>pdx</i> | ATC | ACC | TCT | GGA | GAC | CAG | GGA | GAG | ACT | GCA | GGT | --- | GGA | GTG | TCC |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | TCC | TCG | AAT | GGA | CCT | CAC | ACC | AGC | ACG | CCC | CCT | GTT | TCC | CCA | CTG |
| | *** | ** | ** | *** | ** | *** | ** | * | ** | *** | ** | *** | *** | ** | ** |
| <i>pdx</i> | TCC | ACG | AAC | GGA | TCT | CAC | ACT | TCC | ACA | CCC | CCA | GTT | TCC | CCG | CTT |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | CAT | GGC | CAC | ACG | TTG | TCC | GCG | TCG | GGG | TCC | AGA | GAA | CCA | GCA | TAG |
| | *** | ** | * | ** | ** | ** | * | ** | * * | * | *** | *** | *** | *** | *** |
| <i>pdx</i> | CAT | GGT | TGC | ACT | TTC | TCG | CCA | TCT | GTG | ACA | AGA | GAA | CCA | GCA | TAG |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Xi-X</i> | AC | | | | | | | | | | | | | | |
| | ** | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>pdx</i> | AC | | | | | | | | | | | | | | |

Abb. 24

Nukleotidsequenz-Vergleich eines Teils der Homöobox mit 3'-liegenden Sequenzen von einem Gen *pdx* des Medeka-Fisches *Oryzias latipes* mit den entsprechenden Sequenzen von *Xi-X*.

Nur eine 3'-Region der Homöobox (121 nt) mit 3'-liegenden Sequenzen (290 nt) ist in der NCBI-Genbank publiziert worden (Accession number AB026976).

Die gestrichelte Linie begrenzt die Homöobox von weiteren strangabwärts-liegenden Sequenzen ab. Die Homologie wurde für den gesamten Bereich ausgerechnet.

In der publizierten Region der Homöobox beträgt die Homologie 94% (114 von 121 nt) und strangabwärts zur Homöobox 77% (141 von 182 nt). Das Gen *pdx* von *Oryzias latipes* hat eine Lücke von 3 nt. Insgesamt beträgt die Homologie 84% in einer Region von 303 nt (255 von 303 nt).

Diese Region ist vermutlich kodierend (siehe entsprechende As-Sequenz in der Abb. 26B, S. 101), die Homologie hört hiermit auf und wird von Stop-Codons beider Arten gefolgt.

ERGEBNISSE

| | | Helix-I | | Helix-II | | Helix-III | Helix-IV | |
|-------------------|-----------|--------------|--------|-------------|-----|----------------------|-----------|-------------|
| A) Xi-X | NKRTRTAYT | RAQLLELEKEFL | FNRYIS | RPRRVELALTL | SLT | ER <u>H</u> IKIWFQNR | RMKWKKE | E |
| | + | + + + | | | + | + ** * | * + + | |
| B) Xlox | | | | | | | | |
| <i>Oryzias</i> | | | - | | | | | - |
| <i>Danio</i> | | | -K- | | | | | - |
| <i>Xenopus</i> | | | -K- | -VM- | N- | | | - |
| <i>Rattus</i> | | | -K- | -VM- | N- | | | - |
| <i>Homo</i> | | | -K- | -VM- | N- | | | - |
| <i>Branchios.</i> | | -G- | -H | -K- | -I- | -AM- | N- | Q |
| <i>Helobdella</i> | -S | -S- | -H | -DK- | | -SS- | N- | -M |
| <i>Hirudo 3A</i> | -S | | -H | YDK- | -L- | -AS- | N- | -L |
| <i>Hirudo 3B</i> | -S | | -H | YDK- | | -AS- | N- | -C- -E-F |
| <i>Hirudo 3C</i> | -S | | -H | YDK- | -L- | -AS- | N- | -C- -E-F |

Abb. 25

Die Aminosäuresequenz der Homöodomäne von Xi-X (A) und die Homologien zu den Homöodomänen anderer Mitglieder der Familie Xlox (B).

A) Die konservierten Helix-Regionen sind angegeben worden. Die Aminosäuren, die mit * markiert sind, sind in fast allen Homöoboxen identisch. Die Aminosäuren, die mit + markiert sind, sind hoch konserviert. Der Histidin-Rest in Pos. 44 in der Helix-III, der die Xlox-Familie charakterisiert, ist unterstrichen worden.

B) Die Organismen entsprechen dem Fisch Medeka (*Oryzias latipes*; NCBI accession number AB026976), Zebrafisch (*Danio rerio*; Milewski *et al.*, 1998), Frosch (*Xenopus laevis*; Wright *et al.*, 1988; NCBI accession number X16849), Ratte (*Rattus norvegicus*; Leonard *et al.*, 1993), Mensch (*Homo sapiens*; Stoffel *et al.*, 1995), Amphioxus (*Branchiostoma floridae*; Brooke *et al.*, 1998) und Blutegel (*Helobdella triserialis*; Wedeen *et al.*, 1990 und *Hirudo medicinalis* mit den Genen *Lox3A*, *Lox3B* und *Lox3C*; Wysocka-Diller *et al.*, 1995), sortiert nach dem Homologiegrad.

ERGEBNISSE

A) *Rattus norvegicus*

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-----------|----------------|--------------|-------------|-------|
| Xi-X | 'SYVMTEAEE | NKRTRTAYT | RAQLLELEKEFL | FNRYIS | RPRRVELALT | SLT |
| | * ** | ***** | ***** | **k** | *****k | * k** |
| pdx | GAYTAEPEE | NKRTRTAYT | RAQLLELEKEFL | FNKYIS | RPRRVELAVML | NLT |
| Xi-X | ERHIKIWFQNR | RMKWKKE E | DRRR----- | ARGSEPDQDSS | SITSGDQ | |
| | ***** | ***** * | *kk* | * **k** | kk***kk | |
| pdx | ERHIKIWFQNR | RMKWKKE E | DKKRSSGTPSGGGG | GEEPEQDCAVTS | GEE | |

B) *Xenopus laevis*

| | | | | | | |
|-------------|-----------------|-----------|-----------------|---------------|-------------|-------|
| Xi-X | 'SYVMTEAEE | NKRTRTAYT | RAQLLELEKEFL | FNRYIS | RPRRVELALT | SLT |
| | **k* * ** | ***** | ***** | **k** | *****k | * k** |
| pdx | SYIM-EQEE | NKRTRTAYT | RAQLLELEKEFL | FNKYIS | RPRRVELAVML | NLT |
| Xi-X | ERHIKIWFQNR | RMKWKKE E | DRRRARGSEPDQDSS | SITSGD----- | QGETA | |
| | ***** | ***** * | *kk* **k*k** | kk* * | k | |
| pdx | ERHIKIWFQNR | RMKWKKE E | DKKRGRGSDPEQDS | VVSSADVLKDEPQ | CLGNSQKT | |
| Xi-X | GAGVSSSNGPHTST | PPVSP | | | | |
| | * * ** * k* * * | | | | | |
| pdx | GDLVLSPLPTSSQ | PNQVP | | | | |

C) *Danio rerio*

| | | | | | | |
|-------------|------------------|-----------|------------------|---------------|------------|-----|
| Xi-X | 'SYVMTEAEE | NKRTRTAYT | RAQLLELEKEFL | FNRYIS | RPRRVELALT | SLT |
| | * **** | ***** | ***** | **k** | ***** | ** |
| pdx | GPYMVEAEE | NKRTRTAYT | RAQLLELEKEFL | FNKYIS | RPRRVELALT | SLT |
| Xi-X | ERHIKIWFQNR | RMKWKKE E | DRRRARGSEPDQDSS | SITSGDQGETAG | AGVSSSNGP | |
| | ***** | ***** * | *k***** k*k***** | kk | * kk ** | |
| pdx | ERHIKIWFQNR | RMKWKKE E | DKRRARGVDPEQDSS | SITSGDLKDESCV | GATLAPG | |
| Xi-X | HTSTPPVSPLHGHTLS | | | | | |
| | **** * * | | | | | |
| pdx | P----- | SPLHPHAPS | | | | |

Abb. 26A

Die homologen Bereiche vom vermuteten *Xi-X*-Genprodukt und dem Transkriptionsfaktor PDX-1

A) der Ratte (Leonard *et al.*, 1993)

B) des Frosches (Wright *et al.*, 1988; NCBI accession number X16849)

C) des Zebrafisches (Milewski *et al.*, 1998).

*gibt identische, k die konservierten Aminosäuren an.

Die eingerahmte Sequenz entspricht die Homöodomäne. ' markiert die N-terminale Position eines vermutlichen Exons in *Xi-X*.

Ein Vergleich der As-Sequenz von *Xiphophorus* und *Oryzias latipes* wird in der Abb. 26B gezeigt (siehe S. 101).

ERGEBNISSE

| | | | | | | | |
|--------------------|---|-----------------|--------------|---|---------------------|------------|-------|
| <i>Xi-X</i> | 'SYVMTEAEE | NKRTRTAYT | RAQLLELEKEFL | FNRYIS | RPRRVELALT | LTL | SLT |
| | | | | * * * * * | * * * * * * * * * * | | * * * |
| <i>pdx</i> | | | | L | FNRYIS | RPRRVELALT | LTL |
| <i>Xi-X</i> | ERHIKIWFQNR | RMKWKKE | E | DRRRRARGSEPDQDSSITSGDQGETAGAGVSSSNGP | | | |
| | * * * * * * * * * * | * * * * * * * * | * | * | * * * * * | * * * | |
| <i>pdx</i> | ERHIKIWFQNR | RMKWKKE | E | DRRRRARGGDPDQDSSITSGDQGETAG-GVSSTNGS | | | |
| <i>Xi-X</i> | HTSTPPVSPLHGHTLSASGSREPA | | | | | | |
| | * | | | | | | |
| <i>pdx</i> | HTSTPPVSPLHGCTFSPSVTREPA | | | | | | |

Abb. 26B

Die homologen Bereiche vom angenommenen *Xi-X*-Genprodukt und dem Transkriptionsfaktor PDX von *Oryzias latipes* (AB026976).

* gibt identische, k die konservierten Aminosäuren an.

Die eingerahmte Sequenz entspricht die Homöodomäne. ' markiert die N-terminale Position eines vermutlichen Exons in *Xi-X*.

Für *Oryzias latipes* sind weitere Sequenzen in die N-terminale Richtung nicht bekannt. Die Homologie werden für beide Fischarten mit einem Stopcodon gefolgt.

ERGEBNISSE

Tab. 5

Homologiegrad von Xi-X zu pdx-Genen anderer Organismen,

A) auf Nukleinsäure-Ebene,

B) auf Aminosäure-Ebene: Die identischen As sind berücksichtigt. Wenn die konservierten As-Austausche mitgerechnet sind, werden die Homologien in Klammern erwähnt.

Die Regionen „5“ und „3“ zu den Homöoboxen und die „Homöoboxen“ selbst, sowie „N-Terminal“ und „C-Terminal“ zu den Homöodomänen und die „Homöodomänen“ selbst, werden in der Tabelle auch getrennt aufgezeichnet. Für nt- und As-Sequenzen, sowie Referenzen, siehe Abb. 21-26, S. 95-101.

A

| Art | 5' | Homöobox | 3' | Gesamt |
|--------------------------|-----------|--------------------|--|--------------------|
| <i>Rattus norvegicus</i> | 8 von 12 | 143 von 180 79% | 11 von 21 | 162 von 213 76% |
| <i>Xenopus laevis</i> | 11 von 18 | 141 von 180 78% | 35 von 60 | 187 von 258 72% |
| <i>Danio rerio</i> | 14 von 18 | 153 von 180 85% | 47 von 61 | 214 von 259 82% |
| <i>Oryzias latipes</i> | | 114 von 121 94% | 141 von 182 77% <i>Oryzias</i> 1 Lücke von 3 nt | 255 von 303 84% |

B

| Art | N-Terminal | Homöodomäne | C-Terminal | Gesamt |
|--|--------------------------------------|------------------------------|--|-----------------------------|
| <i>Rattus norvegicus</i> | 3 (3) von 4 | 56 (59) von 60 93 (98)% | 10 (17) von 29 <i>Xiph.</i> Lücke v. 8 | 69 (79) von 93 74 (84)% |
| <i>Xenopus laevis</i> | 6 (7) von 9 <i>Xenop.</i> 1 Lücke | 56 (59) von 60 93 (98)% | 19 (27) von 54 <i>Xiph.</i> Lücke v. 10 | 81 (93) von 123 65 (75)% |
| <i>Danio rerio</i> | 5 (5) von 6 | 59 (60) von 60 98 (100)% | 25 (32) von 51 <i>Dan.</i> Lücke v. 6 | 89 (97) von 117 76 (82)% |
| <i>Oryzias latipes</i> | | 40 von 40 100% | 49 (52) von 59 83 (88)% <i>Oryzias</i> 1 Lücke | 89 (92) von 99 89 (92)% |
| <i>Branchiostoma floridae</i> | | 52 von 60 86% | | |
| <i>Helobdella triserialis</i> | | 51 von 60 85% | | |
| <i>Hirudo medicinalis</i> (Lox3A/3B/3C) | | 50/49/48 von 60 83/81/80% | | |

Gen unbekannter Motive, *Xi-X-LC*

Die Expressionsanalysen (siehe S. 159ff.) haben ein Transkript in der *Xi-X_C*-Region, die 3'-Region vom isolierten *Xi-X*-Abschnitt, ausfindig machen können. Es wird in der Leber exprimiert, LeberC Transkript genannt und quantitativ Reziprok zu dem homöobox-enthaltenden Transkript LeberB (siehe Abb. 20, S. 94) bei Hunger bzw. Alimentationsvorgängen exprimiert.

EST-Analysen von *Oncorhynchus mykiss* (Regenbogenforelle) haben Sequenzen aufdecken können (accession number BX076399 und BX076400 bei NCBI), die zu der *Xi-X_C*-Region homolog sind. Die beiden publizierten Transkripte sind mit Ausnahme von wenigen Nukleotiden an den 5'- und 3'-Enden identisch, werden aber in entgegengesetzte Richtungen abgelesen. Die Richtung für das Ablesen des einen Gens (BX076400) ist verkehrt im Vergleich zu der vermutete Richtung für das Ablesen des *Xi-X*-Homöobox Gens (siehe Abb. 27, S. 104), besitzt aber ein Polyadenylierungssignal und ein PolyA-Schwanz; *Xi-X* wird daher mit diesem Transkript verglichen. Die Homologie beträgt 73% in einer Region von 353 nt (260 von 353 nt, siehe Abb. 29, S. 106). *Xiphophorus* besitzt 3 Lücken. Die cDNA der Regenbogenforelle wurde aus einer Mischung verschiedener Organe, u.a. Leber, hergestellt. Die Länge von 808 nt entspricht die Länge des Transkripts von ca. 0,8 kb, die für das LeberC-Transkript von *Xi-X* gefunden wurde (siehe Expression, S. 159ff.). Die Sequenzhomologie beschränkt sich auf die mittlere Region des Forellen-Transkripts, und das LeberC-Transkript müsste vermutlich mit mindestens sowohl einem Exon weiter 5' als auch weiter 3' zum dargestellten Homologie-Bereich gespleißt werden.

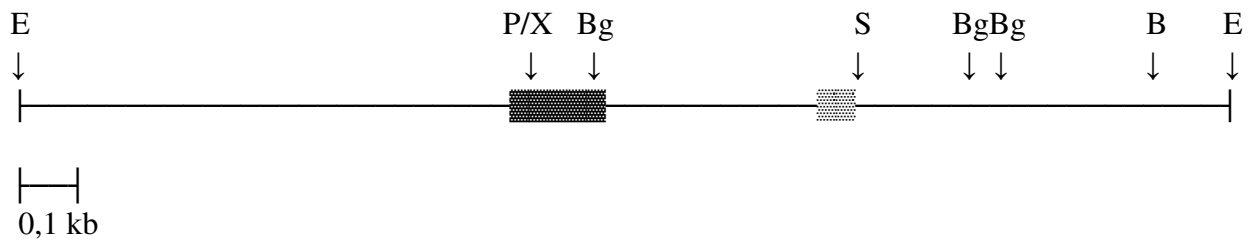
Auch für *Danio rerio* sind homologe Sequenzen von EST-Analysen beschrieben worden (accession number AL910293 und AL910294 bei NCBI). Die Homologie beschränkt sich auf 199 nt, fängt 5' mit der gemeinsamen Region von *Xiphophorus* und *Oncorhynchus* an und beträgt 73% (147 von 199 nt, siehe Abb. 30, S. 107). *Xiphophorus* besitzt 2 Lücken, *Danio* eine Lücke. Außerhalb der dargestellten Region gibt es keine Homologien. Keine der beschriebenen Transkripte enthalten ein Polyadenylierungssignal oder ein PolyA-Schwanz. *Danio rerio* ist in der Verwandtschaft weiter entfernt von *Xiphophorus* als *Xiphophorus* von *Oncorhynchus mykiss* (siehe Fischsystematik, Abb. 31, S. 108) und entsprechend geringer fällt vermutlich die Homologie aus.

Abb. 28 (siehe S. 105) zeigt die 3'-Hälfte vom isolierten *Xi-X*-Region, die transkriptionell aktiv ist. Für das vermutete LeberB Transkript entspricht der kodierende Strang der dargestellten Sequenz. Dieses Transkript enthält vermutlich die Homöobox und die simplen repetitiven Sequenzen Poly(T) und Poly(GTCT). Für das LeberC Transkript ist der komplementäre Strang vermutlich kodierend. Die Ablesungsrichtung ist im Vergleich zum LeberB Transkript entgegengesetzt. Nur 72 nt trennen die beiden Leber-Transkripte, berechnet vom Polyadenylierungssignal im LeberB Transkript zum homologen Bereich mit der Regenbogenforelle im LeberC Transkript.

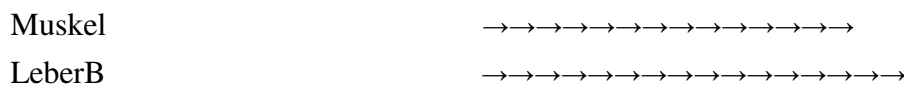
Keine bekannte Motive sind für dieses Gen auffindbar.

ERGEBNISSE

A



B



C



Abb. 27

Die vermutete Ablesungsrichtung der beiden Gene im Xi-X-Bereich.

A) Die Restriktionskarte von *Xi-X* mit eingezeichneter Homöobox (dunkle Markierung) und die Position von Poly(GTCT/GACA) (helle Markierung), von Abb. 18A (siehe S. 87).

B) Die Position und Ablesungsrichtung von zwei vermuteten homöobox-enthaltenden Transkript-Bereichen in der Muskulatur bzw. Leber (das LeberB-Transkript).

C) Die Position von einem „Gen unbekannter Motive“. Das Gen wird vermutlich in der Leber in entgegengesetzte Richtung im Vergleich zu den homöobox-enthaltenden Transkripten transkribiert (das LeberC-Transkript).

*

AGGGTCTTACGTGATGACCGAGGCAGAGGAA**AACAAGCGCACGCGGACCGGTACACGC**
GCGCCCAGCTGCTGGAGCTCGAGAAGGAGTTCCTCTTCAACCGCTACATCTCGAGGCCG
CGGCGCGTGGAGCTGGCACTGACCCTGAGCCTCACCGAGCGCCACATCAAGATCTGGTT
CCAGAACCGGCGCATGAAGTGGAAGAAGGAGGAGGACCGGAGAAGGGCCAGGGGGTCTG
AGCCGGACCAGGACTCTTCCATCACCTCTGGGGATCAGGGAGAGACTGCGGGGGCAGGG
GTGTCTTCCCTCGAATGGACCTCACACCAGCACGCCCCCTGTTTCCCCACTGCATGGCCA
CACGTTGTCCGCGTCGGGGTCCAGAGAACCAGCATAGACGTGGACAGCACTCGCTCTTA
ATTGGATTATATAGGAAATATATATATATTTTTGGTGCAGAAAGATAAAGCTGTTCTTACA
GCAAGTTAAAGGACCTGTCGAGATCCCCTCATGCATTCCAG**TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT**
TTTACATGGGAAATGTGGCTCACTGCCGAGGGCGCCATTTCATCAGGGAGCAGAAATCAG
TCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCT
GTCGACAAGTCAATTCAAAGTTACATTTTCAGTAGACAACAGGTTTTACTATTGTGTACA
TTCCAGATATCAGCATCCACCTGTGTATATATGTTTAAATCACATGCTTTATTAATAAC
ACTGTTTAAAAGTGTATATGCTAACTTTGAAATAAAAACATATAACAAGTACTTAAGTAT
TGCAGCTCCCTGTTAAATGTGGTCAAACCTGGAACAGAGATCTCTAGGCT**TTATAACTTG**
TTTGTTGCGTCAGAGAGCGTGAGACCTTGGAGACGCAGGCGCAGATCTTCTTCACCTCC
GCAATGCCGCGCGCCCTTCCGCGCGCGCTCGTTCGGCAGCGCTCAGAGAGCTCGCG
CAAGATGGTCACCTTGTCAATTCATCCGCGCGCAGATGACAAACGGGAAGCCGAAGCGCC
CCTTGTACTCTGCGTTCAGCCGCGCCATCTGCGAGGCTCCGCGAGCTCAGCGCGTCCA
TCCGACTCGGGTCTGCTCTTCTGGGACTCCCGGGTCAATGCACCGCTGTGGAGATGCT
TGCCGCGAGGTCCGGGTGACACCTGAGGATCCCCTCCTTACCTGGACACATCTGGTGA
CTCATTATACTGCTCCCAGTATGGATATGATAAATAAAAAGTACAAGGTGCGTGAAACAC
AGCAAAAATCCTTTAACCTCACCCGACTCTGGGAGAGCATCGATGAATTC

Abb. 28

Teil der Sequenz vom isolierten Genabschnitt *Xi-X*, der vermutlich in mRNA-Transkripten vorhanden ist.

Die Homöobox im 5'-Bereich, die simplen Sequenzen Poly(T) und Poly(GTCT) (siehe Abb. 20, S. 94) sowie der Teil vom 3'-Bereich, der vermutlich in LeberC-Transkripten vorhanden ist und Homologien mit anderen piscinen EST-Sequenzen aufweist (siehe Abb. 29, S. 106 und Abb. 30, S. 107), sind fett gedruckt worden.

Im LeberB-Transkript ist vermutlich der 5'-Bereich vom Spleißakzeptorsequenz bis zum Polyadenylierungssignal AATAAA (unterstrichen), mit der Homöobox und den simplen Sequenzen, präsent. Der kodierende Strang wird dargestellt. Der Bereich vom Spleißakzeptorsignal bis zum Stop-Codon TAG (unterstrichen) wird vermutlich translatiert.

Im LeberC-Transkript ist möglicherweise der andere Strang kodierend, so dass das Gen in der entgegengesetzten Richtung abgelesen wird und komplementär zur abgebildeten Sequenz ist. Die Homöobox und die simplen Sequenzen fehlen vermutlich in diesem Transkript (siehe S. 166 und Diskussion S. 236).

ERGEBNISSE

On TCGAGCCAGATTCGGCTCGAGATTATCTCCCTTATGAGGAATTTGTGGATGTTTTCGGTA
 On ACGTGGTGGAGAAATGTCCACTCATAACGGCCGAGTATGGTCCCGCCGTCCCTTCTCGA
 On GCCTTGCTGACCTGGAGGCCAGTATAAATGACTTCATCGATGCCCTCCCCGAAT**CAGGTA**

 Xi **CAGGTA**

 On **AAGAGGGAATCCTCAGAGTTCACCCCGACCTCACGGGTAGAGACCTCCAGAGCGGGACTC**
* ***** ***** ***** ***** * * ***** ** ** *
 Xi **AGGAGGGGATCCTCAGGTGTCACCCGGACCTCGCGGGCAAGCATCTCCACAGCGGTGCAT**

 On **TGACCCGGGAGTCGCGAGAGGAACAGGTCCAGGCCGTTTGGACACGCTGACCACCGCGG**
***** ***** * ** * ** ** * * ** * ** * ***** * * *****
 Xi **TGACCCGGGAGTCCAGGAAGAGCAGACCCGAGTCGGAT-GGACGCGCTGAGCTCGGCGG**

 On **AGGTCTCTCGCATGGCCCGGCTGAATACGGAATACAAGGACCACTTCGGTTTCCCCTTCG**
** *** * ***** ***** * ** ***** * ***** ***** ** *
 Xi **AGC-CTCGCAGATGGCGCGGCTGAACGCAGAGTACAAGGGGCGCTTCGGCTTCCGTTTG**

 On **TGATCTGCGCGGGATGAACAACAAGGCGACCATCCTGCGGCAGCTAGAGGAGCGGCTCC**
* ***** ***** ***** ***** ***** ***** *
 Xi **TCATCTGCGCGGGATGAATGACAAGGTGACCATCTTGCGCGAGCTCTCTGAGCGCTGCC**

 On **GGAACGAGCGCACCATTTGAGAGGGCGTGCGCCATCGATGAAGTGAAGAAGATCTGTCACC**
***** * ** ***** ** * ** ***** ***** *
 Xi **GGAACGAGCGCGGGCGGAAAGGGCGCGGCATTGCGGAGGTGAAGAAGATCTG-CGCC**

 On TCCGTCTGCAGGGGCTCGTGGTCCCGGAGACGTCCAACAAGCTATAACTGACTGACGGGA
* ***** ** * ** * ** * ** * ** * ***** *****
 Xi TGCGTCTCCAAGGTCTCACGCTCTCTGACGCAACAACAAGTTATAA

 On TGACATACAGTTTCGTGTGGTCTACCTGATGAGTTGTATGTGTTTGAATAGTGCATCATA
 On ATGGCTGCGTCATTGTTGTGCGTAAAGGAGTAAGTGTGCCTAAATGTGCTTAATTGTACC
 On AAGTGCCAAAATTGAGCAAAAAGTAATTAATAACTGCAGATGTTTCATTGATTTTTATTCT
 On GNATTTCAATATGAACTTTTCAATTTGATAAGTCTGAGATGATAGCTTAATTAATAAAGATT
 On TCAAATATAGTANNAAAAAAAAAAAAAAAA

Abb. 29

Homologie von Xi-X zum publizierten EST-Sequenz von *Oncorhynchus mykiss* (Regenbogenforelle) in der NCBI-Genbank (accession number BX076400).

Die Sequenz von Xi-X ist revers und komplementär im Vergleich zu der ermittelten Xi-X-Sequenz (siehe Abb. 19, S. 88-89). Die Homologie beträgt 74% in einer Region von 301 nt (225 von 301 nt, fett markiert), die in BLAST gefunden wurde. *Xiphophorus* besitzt zwei Lücken. Eine geringere Homologie von 67% (35 von 52 nt) kann für die 52 weiteren nt strangabwärts gefunden werden (keine fette Markierung), in diesem Bereich besitzt *Xiphophorus* eine weitere Lücke. Die Gesamthomologie beträgt somit 73% in 353 nt (260 von 353 nt).

ERGEBNISSE

Xi CAGGTAAGGAGGGGATCCTCAGGTGTCACCCGGACCTCGCGGGCAAGCATCTCCACAGCG
On *****A*****A*****AGT*****C*****A*****T*GAG*C*****G*****
Da *****A*****C**TT*GC*****T**T**TT*G*****CG*G*****G*****

Xi GTGCATTGACCCGGGAGTCCCAGGAAGAGCAGACCCGAGTCGG-ATGGACGCGCTGAGCT
On *GA*TC*****G*GA**G**A**GT**AG*C**T*****A*****C*A
Da *CA*TC*A**A*C*****A*****GT*A**C**T**AC*A*****GAT*

Xi CGGCGGAGCCTC-GCAGATGGCGCGGCTGAACGCAGAGTACAAGGGGCGCTTCGGCTTCC
On *C*****GT**CT*GC*****C*****TA*G**A*****AC*A*****T****
Da *C**A**AT*GT**C**TAC**T**A**T*G*****A*A*****T*****

Xi CGTTTGTTCATCTGCGCGCGGATGAATGACAAGGTGACCATCTTGC GCGAGCTCTCTGAGC
On *C**C**G*****CA*****C*****C**GC**AGAG****
Da *_*****

Xi GCTGCCGGAACGAGCGCGCGGCGGAAAGGGCGCGCGGCATTGCGGAGGTGAAGAAGATCT
On *GCT*****A*CATT**G*****T**C**C*AT**A*****

Xi G-CGCCTGCGTCTCCAAGGTCTCAGCTCTCTGACGCAACAAACAAGTTATAA
On *T*A**C*****G**G**G**GT*G**C**G**GA*GT*C*****C*****

Abb. 30

Die Homologie von den publizierten Sequenzen von *Oncorhyncus mykiss* (BX076400) und *Danio rerio* (AL910293) zu *Xi-X*.

Die Sequenz von *Xi-X* ist revers und komplementär im Vergleich zu der ermittelten *Xi-X*-Sequenz (siehe Abb. 19, S. 88-89). Die Sequenz von *Oncorhyncus mykiss* entspricht die, die in Abb. 29 (siehe S. 106) gezeigt ist.

Xi-X hat in der gemeinsamen homologen Region zu den beiden anderen Fischarten zwei Lücken, die für beide Arten innerhalb von wenigen Basen vorgeschlagen wird. In dieser Abbildung sind die Lücken vorgeschlagen für *Danio rerio* eingezeichnet. Auch *Danio rerio* besitzt eine Lücke. In einer weiteren Region mit Homologie nur zu der Sequenz von *Oncorhyncus mykiss* besitzt *Xiphophorus* eine weitere Lücke.

Die Homologie von *Xi-X* und der Sequenz von *Danio rerio* entspricht 73% in 199 nt (147 von 199 nt), für *Oncorhyncus mykiss* 73% in 353 nt (siehe Abb. 29, S. 106).

Xi: *Xiphophorus maculatus*

On: *Oncorhyncus mykiss*

Da: *Danio rerio*

Elopocephala
 Clupeocephala
 Euteleostei
 Neognathi (*Xiphophorus*, *Oryzias latipes*)
 Protacanthopterygii (*Oncorhynchus mykiss*)
 Otocephala
 Clupeomorpha
 Ostariophysi (*Danio rerio*)
 Elopomorpha
 Albuliformes
 Albuloidei
 Anguilliformes (eels)
 Anguilloidei
 Congroidei
 Muraenoidei
 Saccopharyngoidei
 Elopiformes
 Elopoidei
 Notacanthiformes
 Notacanthoidei
 Osteoglossomorpha
 Osteoglossiformes
 Notopteroidei
 Hiodontoidea
 Mormyroidea
 Notopteroidea
 Osteoglossoidei
 Osteoglossidae (bony tongues)
 Pantodontidae (butterflyfish)
 unclassified Teleostei
 teleost fish

Abb. 31

Systematik der Knochenfische (Teleostei).

Die Abbildung zeigt grob die Verwandtschaft der Fischarten (*Xiphophorus*, *Oryzias latipes*, *Oncorhynchus mykiss*, *Danio rerio*), die Sequenzhomologien zu dem isolierten Xi-X-Bereich von *Xiphophorus* aufweisen.

Die Systematik stammt von NCBI.

Die simplen repetitiven Sequenzen

Simple repetitive Sequenzen, SSRs, sind kleine DNA-Regionen bestehend aus monotonen Wiederholungen von kurzen (1-5 nt) Nukleotidmotiven, die über das gesamte Genom von Eukaryonten aller Organisationsstufen verteilt sind (Tautz & Renz, 1984; Tautz & Schlötterer, 1994).

In *Xi-X* konnten drei einfache, tandem wiederholte Sequenzen ausfindig gemacht werden; (TA)₁₄, (T)₂₁ und (GTCT)₁₅. Während Poly(TA) und Poly(T) keine praktische Bedeutung für die Hybridisierungsanalysen hatten, konnte Poly(GTCT) in den Southern Analysen als repetitiv im Genom erkannt werden. Dieses führte dazu, dass *Xi-X*, wie schon erläutert (siehe S. 78-79) wurde, in kleinere Fragmente unterteilt werden musste, und die einzelnen Subfragmente getrennt bei den Southern und Northern Analysen eingesetzt werden mussten. Die Sequenz Poly(GTCT) ist in der Literatur auch als die homologe Sequenz Poly(GACA) bekannt.

Die simple repetitive Sequenz Poly(GTCT/GACA) wird im Ergebnisteil unter den Abschnitten "Charakterisierung der Sequenz Poly(GTCT/GACA) im Genom von *Xiphophorus*" (siehe S. 151) und unter den Expressionsanalysen (siehe S. 159ff.) genauer beschrieben.

C-4) STRUKTURELLE ORGANISATION VON *XI-X* IN VERSCHIEDENEN ARTEN, RASSEN UND POPULATIONEN VON *XIPHOPHORUS*

Ein Ziel der Analysen der strukturellen Organisation des isolierten homöobox-enthaltenden Genfragments *Xi-X* in verschiedenen Arten, Rassen, Populationen und Rückkreuzungsbastarden von *Xiphophorus* war es, eine eventuell strukturelle Beziehung zwischen *Xi-X* und den bedeutenden, klassisch-genetisch definierten Loci des xiphophorinen Melanomsystems zu erkunden. Vergleiche der Längen von homöobox-enthaltenden Restriktionsfragmenten in Genomen von *X. maculatus* und *X. helleri* und deren Rückkreuzungsbastarden, durch Southern Analysen mit den Gensonden *Antp* und *ftz* von *Drosophila* untersucht, hatten Hinweise auf eine Kopplung der Homöobox *Xi-X* an den spezifischen Pigmentzellloci von *X. maculatus* gegeben (siehe S. 65ff.). Auf dieser Grundlage wurde das Genfragment *Xi-X* isoliert (siehe S. 72ff.) und für die vergleichenden Analysen der strukturellen Organisation eingesetzt.

Schwerpunktmäßig wurde *Bam*HI-verdaute DNA mittels Southern Analysen untersucht. Durch Hybridisierungen mit der Gensonde *Xi-X_C* konnte, bedingt durch die eine *Bam*HI-Schnittstelle in *Xi-X_C* selbst, sowohl das *Bam*HI-Fragment strangaufwärts als auch strangabwärts von dieser *Bam*HI-Schnittstelle mit der Gensonde *Xi-X_C* detektiert werden (siehe Abb. 32, S. 111). Die Ergebnisse werden in der Tab. 6 (siehe S. 119) zusammengefasst.

Southern Analysen mit *Hind*III-verdauter, genomischer DNA ergab für fast alle Fische, unabhängig von Art, Population oder Phänotyp, ein Fragment von ca. 8,5 kb. Im Text werden nur die Tiere, die ein abweichendes Hybridisierungsmuster vorwiesen, diskutiert.

Zuerst wurde die DNA aus mehreren Fischen gemeinsam extrahiert und für die Southern Analysen eingesetzt. Dieses ergab für bestimmte Genome, besonders für die der

Rückkreuzungsbastarde, eine Vielfalt von *Bam*HI-Fragmenten verschiedener Längen (siehe Abb. 38-40, S. 127-129). Viele diese *Bam*HI-Fragmente unterschieden sich in nur wenigen Basenpaaren. Diese fast gleiche Laufgeschwindigkeit der Fragmente erschwerte die Analysen: Die zu vergleichenden Genome mussten direkt nebeneinander in einem Gellauf positioniert sein, und lange Gelläufe waren erforderlich.

Um die Vererbung der platyspezifischen *Xi-X*-Fragmente in den Kreuzungsanalysen zu beurteilen, war zunächst die Klärung der strukturellen Organisation von *Xi-X* in den parental Wildtyp-Genomen wichtig. In dem ersten Hauptabschnitt wird die Anordnung von *Xi-X* in den verschiedenen Wildtyparten von *Xiphophorus* diskutiert. Zusätzlich werden wenige Mutanten der Pigmentzellmuster (*DrSd'*, *ArSr'*, *BrNi^e*) analysiert, die die mutierten Pigmentzellloci im Platygenom besitzen und als Elternstämme für die Kreuzungen mit *X. helleri* eingesetzt wurden. Im nächsten Hauptabschnitt wird durch Studien der Rückkreuzungsbastarde eine eventuelle Kopplung der Homöobox mit den Markern des Melanomsystems und die strukturelle Organisation des Genfragments in phänotypischen Pigmentzellmuster-Mutanten und in Zelllinien beschrieben (siehe S. 123ff.).

Die Organisation von Xi-X im Genom von X. maculatus

Die Organisation von *Xi-X* im Genom von *X. maculatus* wurde für Rassen bzw. Populationen aus den Flüssen Rio Jamapa, Belize River und Rio Usomacinta untersucht. Diesen Tiergruppen war mit der Sonde *Xi-X_C* ein *Bam*HI-Fragment von 7,2 kb gemeinsam. Dieses 7,2 kb Fragment wurde nicht mit der Sonde *Xi-X_A* oder mit Subsonden von *Xi-X_B* detektiert (siehe Abb. 36, S. 121). Dies erklärt sich mit dem Vorkommen einer *Bam*HI-Schnittstelle strangabwärts, ca. 7 kb von *Xi-X* entfernt (siehe Abb. 32, S. 111).

X. maculatus, Rio Jamapa

Es wurden zwei Weibchen und zwei Männchen, sowohl von der Population mit dem Pigmentzellmuster *DrSd*, als auch mit dem Pigmentzellmuster *DySp* untersucht. Weibchen besitzen zwei X-Chromosomen und entsprechend zwei Kopien der beschriebenen Pigmentzellloci (z.B. $X^{DrSd}X^{DrSd}$). Die Männchen besitzen nur eine Kopie des beschriebenen X-chromosom-gebundenen Pigmentzellmusters und zusätzlich die Y-chromosomal liegenden Pigmentzellloci *ArSr* (z.B. $X^{DrSd}Y^{ArSr}$). Zusätzlich zu den Wildtypen wurden zwei Männchen mit dem kompartiments-mutierten Phänotyp *Sd'* und der Expressionsmutation *Sr'*, *DrSd'/ArSr'*, untersucht. Die strukturelle Organisation der 10 untersuchten Einzelindividuen wies keine Unterschiede auf: Sie zeigten mit der Sonde *Xi-X_C* für alle Fische *Bam*HI-Fragmente von 7,2 kb und 2,3 kb (siehe Abb. 33, S. 112). Die Sonde *Xi-X_A* und die Subsonden von *Xi-X_B* detektieren ausschließlich das 2,3 kb *Bam*HI-Fragment (siehe Abb. 36, S. 121), die Lage des 2,3 kb *Bam*HI-Fragments strangaufwärts zu der *Bam*HI-Schnittstelle in *Xi-X* bestätigend. Eine Übersicht über die Positionen der hybridisierten *Bam*HI-Fragmente im Verhältnis zu den Subfragmenten von *Xi-X* wird in der Abb. 36 (siehe S. 121) gegeben.

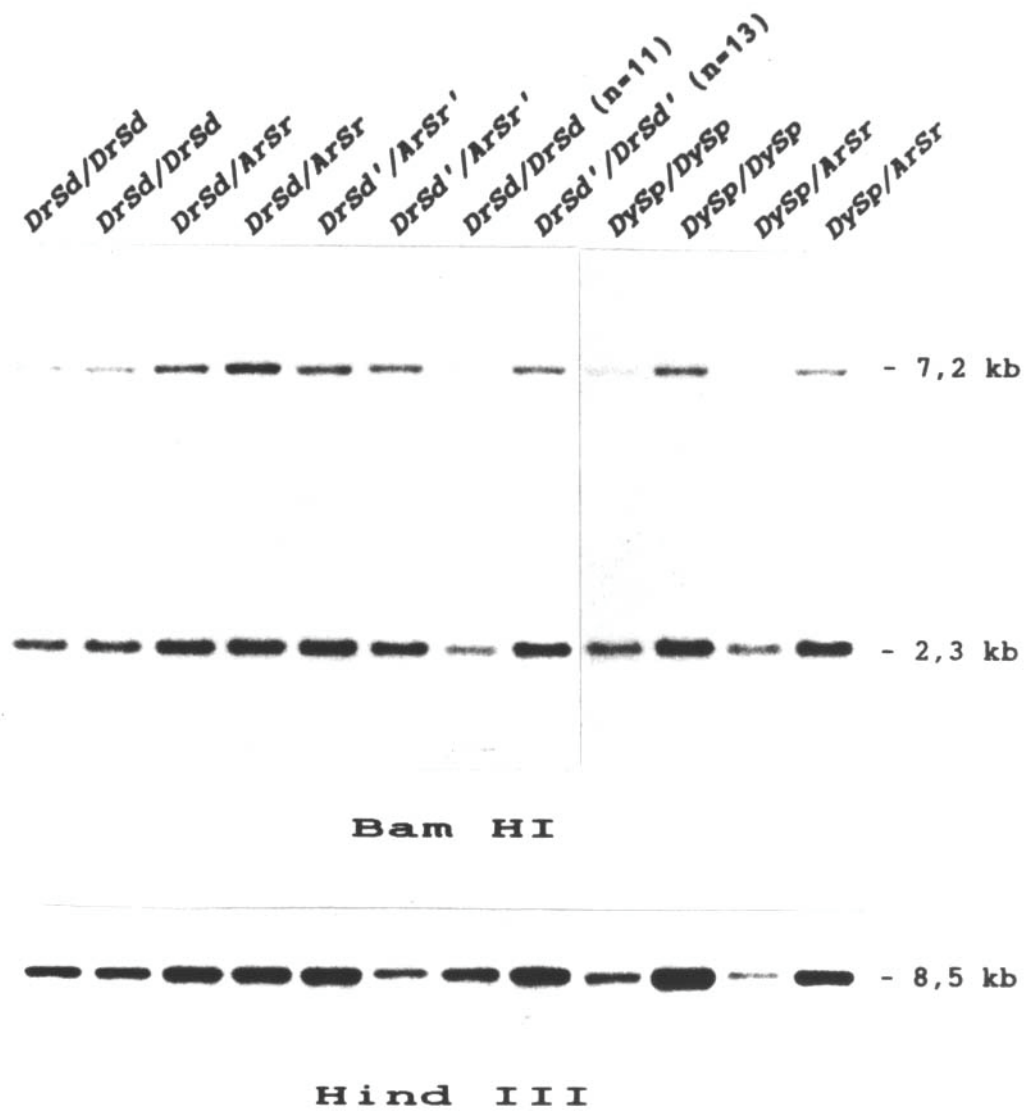


Abb. 33

Die Organisation von *Xi-X* in Populationen von *X. maculatus* aus dem Rio Jamapa mit den Pigmentzellmustern *DrSd*, *DrSd'*, *DySp*, *ArSr* bzw. *ArSr'*.

Die DNA wurde mit *Bam*HI bzw. *Hind*III geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit der Sonde *Xi-X_C* hybridisiert. n gibt die Zahl der untersuchten Fische in Gesamtanalysen von mehreren Fischen an, die anderen Tiere wurden einzeln untersucht.

***X. maculatus*, Belize River**

Bei zwei phänotypisch unterschiedlichen Populationen von *X. maculatus* aus dem Belize River wurden 6 Einzelindividuen mit dem Pigmentzellmuster *BrNi* bzw. 3 mit dem kompartiments-mutierten Pigmentzellmuster *BrNi^e* untersucht. Diese Tiere haben, im Gegensatz zu den XX-XY-geschlechts-bestimmten Rio Jamapa-Populationen, eine WZ-ZZ-Geschlechtsbestimmung. Es wurde für das Pigmentzellmuster *BrNi* 2 Weibchen (WZ*BrNi*), 2 Männchen (Z*BrNi*Z*BrNi*) und 2 Fische ohne besondere Geschlechtsmerkmale untersucht. Für das Pigmentzellmuster *BrNi^e* waren ein Fisch weiblich und 2 männlich.

In *Bam*HI-geschnittener DNA kamen mit der Sonde *Xi-X_C* 2 Fragmente mit den Längen 2,5 und 2,3 kb zusätzlich zu dem 7,2 kb Fragment zum Vorschein. Das Fragment von 2,5 kb war bei allen Fischen vorhanden, das Fragment von 2,3 kb zusätzlich zu dem 2,5 kb Fragment in 2 von 6 Individuen mit dem Pigmentzellmuster *BrNi* (siehe Abb. 34, S. 114 und in 2 von 3 Individuen mit dem Pigmentzellmuster *BrNi^e* (nicht gezeigt). Im Durchschnitt hatten 44% (4/9) der Fische sowohl das 2,5 als auch das 2,3 kb Fragment. Eine DNA-Gesamtisolation aus 5 Männchen mit dem Pigmentzellmuster *BrNi* zeigte zusätzlich zu diesen zwei Fragmenten ein Fragment von ca. 2,65 kb (siehe Abb. 39B, S. 128). Wahrscheinlich entspricht dieses Fragment auch einer Organisation von *Xi-X*, die in der Population aus dem Belize River vorkommt, aber bei den 9 untersuchten Einzelindividuen nicht vertreten war.

In Untersuchungen mit *Hind*III-geschnittener DNA trat in allen untersuchten *X. maculatus*-Individuen aus dem Rio Jamapa und dem Rio Usomacinta ein Fragment von 8,5 kb auf. Bei den Populationen von *X. maculatus* aus dem Belize River zeigte *Hind*III-verdaute DNA aller Individuen ein 5,2 kb Fragment. Die Individuen aus dem Belize River, bei denen das *Bam*HI-Fragment von 2,3 kb zusätzlich zu dem 2,5 kb Fragment vorhanden war, zeigten mit *Hind*III-verdauter DNA das *Hind*III-Fragment von 8,5 kb zusätzlich zu dem Fragment von 5,2 kb (siehe Abb. 34, S. 114). Diese beiden zusätzlichen *Bam*HI- und *Hind*III-Fragmente, die in 44% der Individuen auftraten, entsprachen den Fragmenten, die in den *X. maculatus*-Populationen aus dem Rio Jamapa beobachtet wurden. Das Auftreten von einem zusätzlichen Restriktionsfragment bei einem Teil der Individuen lässt sich nicht mit den Pigmentzellmustern *BrNi* bzw. *BrNi^e* oder mit dem Geschlecht der Fische korrelieren, denn die Fragmente waren in allen Gruppen an- bzw. abwesend.

***X. maculatus*, Rio Usomacinta**

Für die Rasse von *X. maculatus* aus dem Rio Usomacinta, die kein spezifisches Pigmentzellmuster besitzt, wurde die genomische Organisation von *Xi-X* in Einzelindividuen von zwei Weibchen (WZ) und zwei Männchen (ZZ) untersucht. Die Organisation scheint bei allen vier untersuchten Individuen gleich zu sein, *Bam*HI-Fragmente von 2,65 kb und 7,2 kb kamen zum Vorschein (siehe Abb. 35, S. 118). Eine Untersuchung an 4 Männchen, wobei die DNA aus allen Individuen zusammen untersucht wurde, zeigte auch die gleiche *Xi-X*-Organisation (nicht gezeigt), die für Untersuchungen bei Einzelindividuen gefunden wurde.

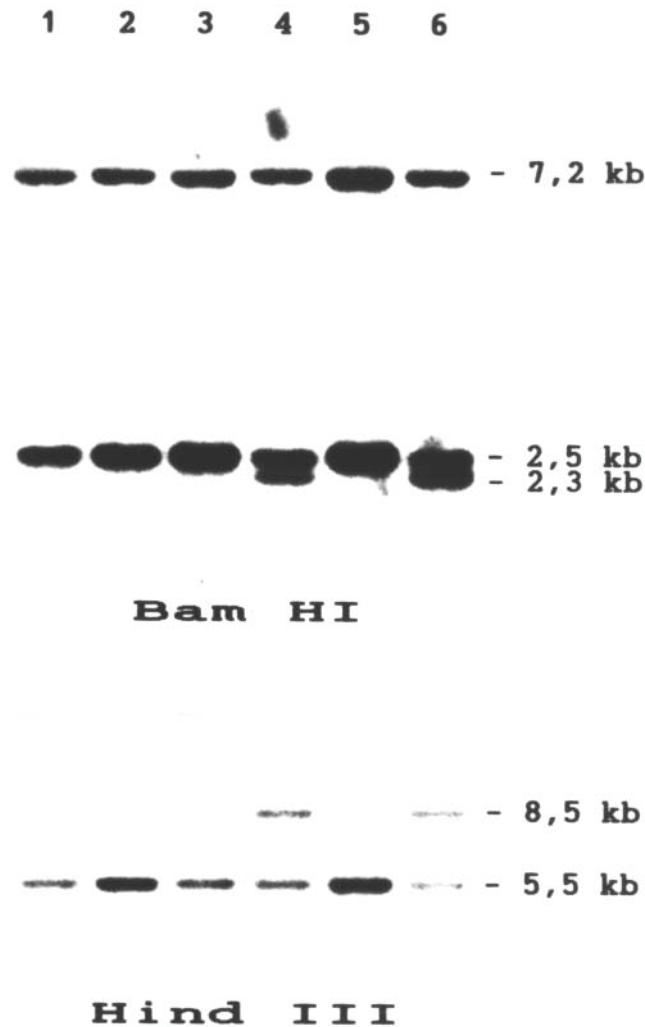


Abb. 34

Die Organisation von *Xi-X* in verschiedenen Einzelindividuen von *X. maculatus* aus dem Belize River mit dem Pigmentzellmuster *BrNi*.

Die DNA wurde mit *Bam*HI bzw. *Hind*III geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit der Sonde *Xi-X_C* hybridisiert. Die Fische der Nummern 2 und 3 waren Weibchen (*Z^{BrNi}W*), Nummer 5 und 6 Männchen (*Z^{BrNi}Z^{BrNi}*) und die verbleibenden Fische (Nummer 1 und 4) waren ohne besondere Geschlechtsmerkmale.

Die Organisation von Xi-X im Genom von X. helleri

X. helleri hat eine polygene Geschlechtsbestimmung und somit keine spezifischen Geschlechtschromosomen. Diese Art besitzt auch keine spezifischen Pigmentzellloci, die mit denen von *X. maculatus* vergleichbar sind. Die Organisation von *Xi-X* im Genom von *X. helleri* wurde für Populationen aus den Flüssen Rio Lancetilla, Rio Jamapa und Belize River untersucht. Gemeinsam für diese Populationen war, mit der Sonde *Xi-X_C* hybridisiert, ein *Bam*HI-Fragment von 0,6 kb. Dieses 0,6 kb Fragment wurde nicht mit den Sonden *Xi-X_A* oder *Xi-X_B* detektiert (siehe Abb. 36, S. 121). Es spiegelt ein *Bam*HI-Fragment in der 3'-Region von *Xi-X* wider.

X. helleri, Rio Lancetilla

DNA von 18 Einzelindividuen von *X. helleri* aus dem Rio Lancetilla wurde untersucht, 15 Männchen und 3 Weibchen. Es wurden zusätzlich zu dem *Bam*HI-Fragment von 0,6 kb, das bei *X. helleri* immer vorhanden war, *Bam*HI-Fragmente der Länge 2,70, 2,65 und 2,60 kb gefunden (siehe Abb. 37, S. 124). Eine Hybridisierung mit der Sonde *Xi-X_A* machte nur die Fragmente von 2,70, 2,65 bzw. 2,60 kb ausfindig (siehe Abb. 36, S. 121), so dass die Zuordnung dieser Fragmente zu einer Position im 5'-Bereich von *Xi-X* naheliegend war.

Wenige Rückkreuzungsbastarde mit *X. helleri* zeigten ein Fragment von 2,8 kb, das auf *X. helleri* zurückgeführt werden konnte (siehe S. 150). Das Fragment konnte nicht in der parentalen Generation von *X. helleri* aus dem Rio Lancetilla nachgewiesen werden, war aber in der Population aus dem Rio Jamapa vorhanden (siehe S. 116).

Die Bande von 2,70 kb war lediglich mit der Ausnahme eines Weibchens, das nur das Fragment von 2,65 kb aufwies, konstant vorhanden. Wenn nur die Bande von 2,70 kb oder 2,65 kb vorkam, wirkte diese Bande stärker, als wenn sie in Kombination mit einer der anderen Banden zur Erscheinung kam. Obwohl von den durchgeführten Untersuchungen keine sicheren quantitativen Aussagen gemacht werden können, spricht diese stärkere Erscheinung der Banden für zwei Kopien dieses Fragments in Individuen, die nur das eine Fragment vorwies. Individuen mit zwei verschiedenen Fragmentenlängen haben entsprechend zwei unterschiedliche Allele im Genom.

Zusätzlich zu den 18 beschriebenen Individuen von *X. helleri* wurden zwei Fische von *X. helleri* aus demselben Fluss Rio Lancetilla, aber mit dem Pigmentzellmuster **Db**, das aus schwarzen Flecken auf den Körperseiten besteht, untersucht (nicht gezeigt). Von den zwei untersuchten Individuen hatte eins, ein Männchen, die Restriktionsfragmente von 2,70 und 2,65 kb, das andere Individuum zeigte keine Geschlechtsmerkmale und besaß ausschließlich das 2,60 kb-Fragment. Beide Fische wiesen zusätzlich die 0,6 kb Fragmente auf.

Das *Bam*HI-Fragment von 2,70 kb ist bei den insgesamt 16 untersuchten *X. helleri*-Männchen aus dem Rio Lancetilla immer vorhanden. In 31% (5/16) dieser Tiere kam nur das 2,70 kb Fragment vor, in 38% (6/16) mit dem 2,65 kb und in 31% (5/16) mit dem 2,60 kb Fragment kombiniert. Eine Gesamtanalyse von DNA aus 13 Männchen ergab eine starke 2,70 kb-Bande und schwache Banden etwas kürzerer Länge zusätzlich zu dem

0,6 kb Fragment (siehe Abb. 39, S. 128; Abb. 40, S. 129). Dieses Erscheinungsbild stimmt mit dem relativen Vorkommen der verschiedenen Fragmente im Genom dieser männlichen *X. helleri*-Population überein, wie für die Einzelindividuen gezeigt werden konnte, wobei das 2,70 kb Fragment mit 65%, das 2,65 kb Fragment mit 19% und das 2,60 kb mit 16% in der Population theoretisch vertreten sein müsste. Von den drei untersuchten Weibchen besaß eines das 2,70 kb Fragment nicht. Von den Fischen mit dem Pigmentzellmuster *Db* wies ein Individuum, das ohne spezifische Geschlechtsmerkmale war, auch nicht das Fragment von 2,70 kb auf. Während alle Männchen (16/16) das 2,70 kb Fragment besaßen, war das Vorkommen dieses Fragments in Weibchen und in Fischen ohne Geschlechtsmerkmale auf die Hälfte (2/4) reduziert. Wenn man annimmt, dass die untersuchte Auswahl von *X. helleri*-Individuen repräsentativ ist, könnten diese Untersuchungen wichtige Mechanismen widerspiegeln, die die Vererbung des 2,70 kb *Bam*HI-Fragments bei den *X. helleri* Männchen sichert (siehe Diskussion S. 245).

In wenigen Analysen von *X. helleri* und von Rückkreuzungsbastarden mit *X. helleri* trat das *X. helleri*-spezifische, 3'-liegende *Bam*HI-Fragment von 0,6 kb zusammen mit einem Fragment von 0,7 kb auf (siehe Abb. 39, S. 128; Abb. 40, S. 129; Abb. 44, S. 136), in zwei einzeln untersuchten Rückkreuzungsbastarden konnte nur das Fragment von 0,7 kb beobachtet werden (siehe Abb. 44, S. 136; Abb. 45, S. 138). Die relative Intensität der beiden Banden in Gesamtanalysen variierte. Diese Ergebnisse sind nicht reproduzierbar, denn die selben DNA-Präparationen ergaben bei verschiedenen Untersuchungen eine unterschiedliche Erscheinung der beiden Banden. Es war nicht möglich das Auftreten der beiden Banden mit den Enzymchargen, Enzymkonzentrationen, Pufferbedingungen oder Verdauzeiten zu korrelieren. Wiederholte Hybridisierungen zeigten, dass die Hybridisierungsbedingungen nicht für das variable Auftreten der beiden Banden verantwortlich war. Meistens trat das 0,7 kb *Bam*HI-Fragment erst in Southern Analysen auf, die über 2 Monate nach dem DNA-Extraktionsdatum angefertigt wurden. In den Southern Blots, die innerhalb von 1-2 Wochen nach der DNA-Extraktion angefertigt wurden, war nur das 0,6 kb Fragment vorhanden.

***X. helleri*, Rio Jamapa**

Es wurden zwei Männchen von *X. helleri* aus dem Rio Jamapa untersucht (nicht gezeigt). Der eine Fisch zeigte *Bam*HI-Fragmente von 2,70, 2,65 und 0,6 kb, der andere Fisch Fragmente von 2,80 kb, 2,60 kb und 0,6 kb. Die Fragmente konnten auch in der Population aus dem Rio Lancetilla beobachtet werden, wobei das Fragment von 2,80 kb nur in Rückkreuzungsgenerationen auffindig war (siehe S. 150).

***X. helleri*, Belize River**

Zwei Männchen von *X. helleri* aus dem Belize River zeigten beide *Bam*HI-Fragmente von 2,60 und 0,6 kb, Fragmente die auch in der Population aus dem Rio Lancetilla nachweisbar waren (nicht gezeigt).

Die Organisation von Xi-X im Genom von X. variatus

Von *X. variatus* aus dem Rio Panuco wurden zwei Weibchen mit dem Pigmentzellmuster ***YeLi*** ($X^{YeLi}X^{YeLi}$) und zwei Männchen mit den Pigmentzellmustern ***YeLi*** und ***OrPu*** ($X^{YeLi}Y^{OrPu}$) als Einzelindividuen untersucht. Die Organisation scheint für die untersuchten Individuen dieser Art gleich zu sein, eine Bande von 2,55 kb und die Bande von 7,2 kb, die auch bei verschiedenen Populationen von *X. maculatus* vorkommt, erscheint bei Southern Analysen mit *Bam*HI-geschnittener DNA (siehe Abb. 35, S. 118; Abb. 43, S. 135; Abb. 44, S. 136).

Die Organisation von Xi-X in den Genomen von X. xiphidium und X. montezumae cortezi

Es wurde jeweils ein Individuum der Arten *X. xiphidium* aus dem Rio Soto la Marina und *X. montezumae cortezi* aus dem Rio Axtla untersucht. Sie zeigten beide keine Geschlechtsmerkmale. Die genomische Organisation von *Xi-X* war für die beiden untersuchten Individuen gleich: Beide wiesen *Bam*HI-Fragmente von 2,40 und 7,2 kb auf (nicht gezeigt).

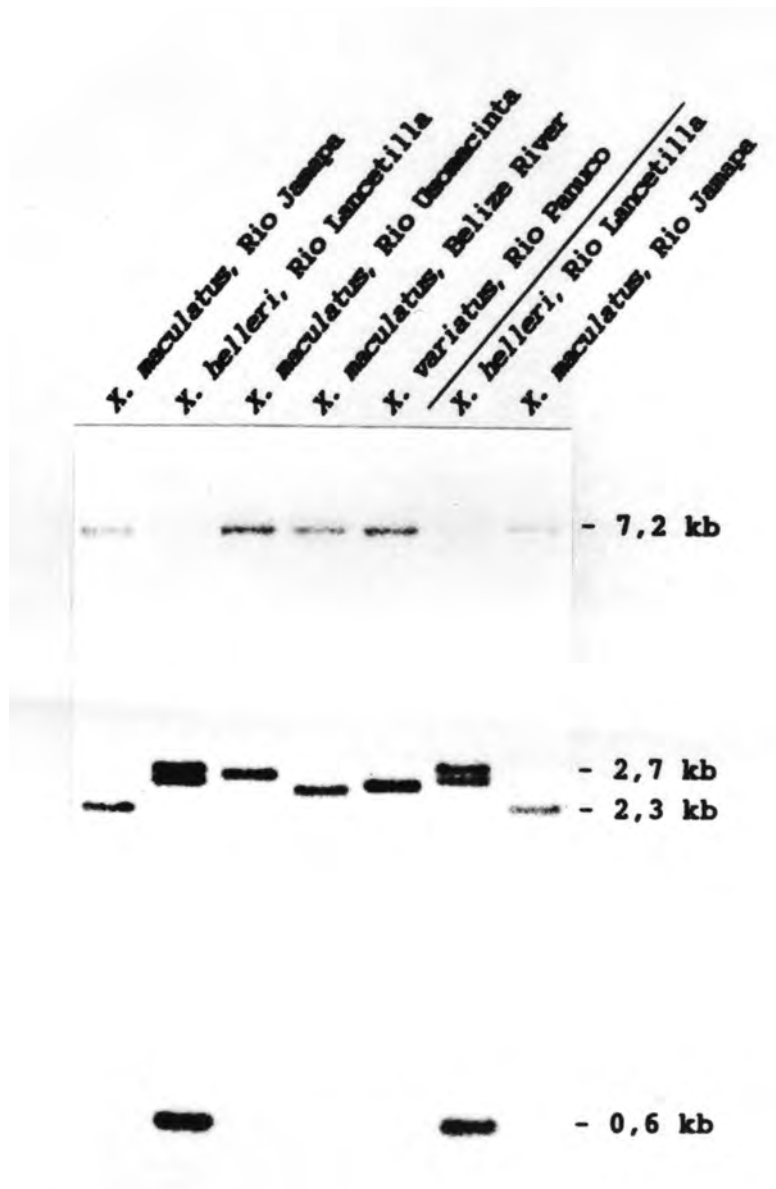


Abb. 35

Die Organisation von *Xi-X* im Genom verschiedener, xiphophoriner Arten und Populationen.

Die DNA wurde mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit der Sonde *Xi-X_C* hybridisiert. Alle Tiere wurden einzeln untersucht.

ERGEBNISSE

Tab. 6

***Bam*HI-Fragmente, gefunden in verschiedenen Arten, Rassen und Populationen von *Xiphophorus*.**

Alle Fische wurden als Einzelindividuen untersucht und mit der Sonde *Xi-X_C* hybridisiert. 5' und 3' bezeichnen die *Bam*HI-Fragmente, die strangaufwärts bzw. strangabwärts zur *Bam*HI-Schnittstelle in *Xi-X* liegen. n gibt die Gesamtzahl der untersuchten Fische und m die Anzahl der Fische, die das entsprechende 5'-Fragment aufwiesen, an. Alle untersuchten Fische wiesen das 3'-liegende *Bam*HI-Fragment auf.

| | 5' | | 3' |
|---------------------|------|-------|-----|
| <i>X. maculatus</i> | kb | m/n | kb |
| Rio Jamapa | 2,30 | 10/10 | 7,2 |
| Belize River | 2,50 | 9/9 | 7,2 |
| | 2,30 | 4/9 | |
| Rio Usomacinta | 2,65 | 4/4 | 7,2 |

X. variatus

| | | | |
|------------|------|-----|-----|
| Rio Panuco | 2,55 | 4/4 | 7,2 |
|------------|------|-----|-----|

X. xiphidium

| | | | |
|--------------------|------|-----|-----|
| Rio Soto la Marina | 2,40 | 1/1 | 7,2 |
|--------------------|------|-----|-----|

X. montezumae cortezi

| | | | |
|-----------|------|-----|-----|
| Rio Axtla | 2,40 | 1/1 | 7,2 |
|-----------|------|-----|-----|

X. helleri

| | | | |
|----------------|------|-------|-----|
| Rio Lancetilla | 2,70 | 18/20 | 0,6 |
| | 2,65 | 8/20 | |
| | 2,60 | 7/20 | |
| Rio Jamapa | 2,80 | 1/2 | 0,6 |
| | 2,70 | 1/2 | |
| | 2,65 | 1/2 | |
| | 2,60 | 1/2 | |
| Belize River | 2,60 | 2/2 | 0,6 |

Vergleiche der Organisation von Xi-X mit flankierenden Regionen in den Genomen von X. maculatus und X. helleri

Vergleiche der Restriktionsfragment-Längen in verschiedenen Arten von *Xiphophorus*, die mit den Subsonden von *Xi-X* hybridisieren, geben Auskünfte über die unterschiedliche Organisation von *Xi-X* mit umliegenden Regionen in den entsprechenden Genomen.

X. maculatus *DrSd/DrSd* aus dem Rio Jamapa und *X. helleri* aus dem Rio Lancetilla, samt einem Rückkreuzungsbastard, wurden mit **BamHI**-verdauter DNA einzeln untersucht (siehe Abb. 36, S. 121). Mit Ausnahme der Sonde *Xi-X_{B-Rep}*, die wegen der repetitiven Sequenz eine Färbung der gesamten Gelspuren verursachte, zeigten alle Subgensonden von *Xi-X* das beschriebene Hybridisierungsmuster der 5'-liegenden *BamHI*-Fragmente; 2,30 kb für *X. maculatus* und 2,70 und 2,60 kb für *X. helleri*. Der Rückkreuzungsbastard besitzt sowohl das 2,30 als auch das 2,70 kb Fragment. Die Gensonden *Xi-X_C* und *Xi-X_{B-Spez2}* verraten größere, strukturelle Unterschiede in den 3'-liegenden Regionen der beiden Arten: Die Sonde *Xi-X_C* detektiert ein *BamHI*-Fragment von 7,2 kb bei *X. maculatus* und ein *BamHI*-Fragment von 0,6 kb bei *X. helleri*, der Rückkreuzungsbastard enthält entsprechend beide Fragmente. Die Gensonde *Xi-X_{B-Spez2}* detektiert bei *X. helleri* und dem Rückkreuzungsbastard zusätzlich zu den beschriebenen 5'-liegenden Fragmenten ein *BamHI*-Fragment von ca. 6,6 kb.

Zwei Haupttypen von Unterschieden der genomischen Organisation von *Xi-X* der beiden Arten können damit durch diese Untersuchungen festgestellt werden: Die strangaufwärts-liegenden *BamHI*-Fragmente unterscheiden sich vor allem in der Länge; die *X. helleri*-Fragmente sind ca. 300-400 nt länger als die entsprechenden Fragmente von *X. maculatus*. In der 3'-Region von *Xi-X* konnten komplexere, strukturelle Unterschiede in den Regionen *B-Spez2* und *C* von *Xi-X* ausfindig gemacht werden (siehe auch S. 121-123).

Die Sonde *Xi-X_{B-Hom}*, die einen gut konservierten Teil der Homöobox besitzt, detektiert unter stringenten Bedingungen, sowohl bei *X. helleri* als auch bei *X. maculatus* und dem Rückkreuzungsbastard, ein zusätzliches *BamHI*-Fragment von ca. 2,9 kb. Das 2,9 kb-Fragment enthält anscheinend eine Genregion, die eine hohe Homologie zu dieser Subregion von *Xi-X* aufweist.

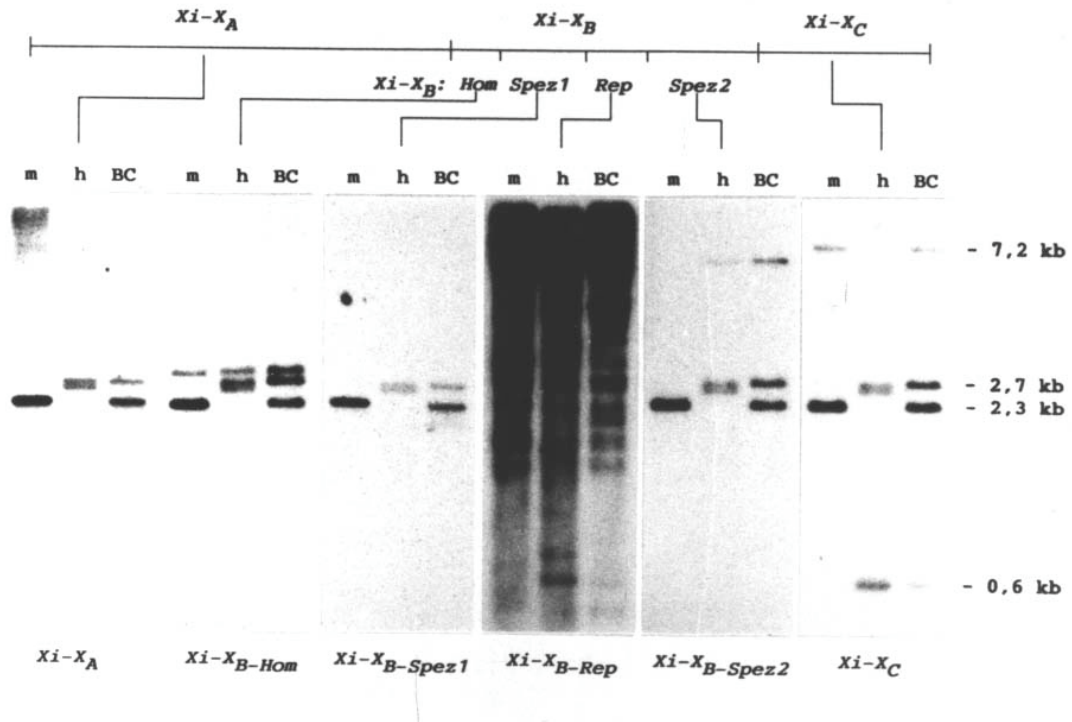


Abb. 36

Southern Analyse *Bam*HI-geschnittener DNA von *X. maculatus* *DrSd/DrSd* aus dem Rio Jamapa (m), *X. helleri* aus dem Rio Lancetilla (h) und deren Rückkreuzungsbastard mit *DrSd* (BC), hybridisiert mit verschiedenen Subsonden von *Xi-X*.

Für die folgenden beschriebenen Enzyme wurden DNA-Gesamtextrakte von *X. maculatus* *DrSd/DrSd* (n=11) und *X. helleri* (n=13) benutzt (siehe Tab. 7, S. 122). Für *Eco*RI wiesen die Genome Fragmente von 2,2 bzw. 2,6 kb, sowohl mit der Sonde *Xi-X_A* als auch mit der Sonde *Xi-X_C* auf. *Hind*III-verdaute DNA ergab mit den Gensonden *Xi-X_A* und *Xi-X_C* für beide Arten ein Fragment von ca. 8,5 kb. Bei einer genauen Betrachtung wird offensichtlich, dass das *Hind*III-Fragment von *X. helleri* etwas länger als das entsprechende Fragment von *X. maculatus* ist. Ein Unterschied von ca. 400 bp, der Längenunterschied der hybridisierten Fragmente, die für *Eco*RI- und *Bam*HI-verdaute DNA beobachtet wurde, würde bei diesen Fragmentenlängen unter den angewandten Elektrophoresebedingungen keine große Unterschiede in den Laufeigenschaften aufweisen. *Xba*I-verdaute DNA ergab Banden von 6,8 kb für *X. helleri* und 6,4 kb für *X. maculatus*.

Die Enzyme *Hind*III und *Xba*I zeigten, dass in den Regionen außerhalb von *Xi-X* weniger große Unterschiede in der Struktur zu vermuten sind. Die Unterschiede der beiden Arten befinden sich hauptsächlich in der *Xi-X*-Region und können bei vielen Restriktionsenzymen als eine zusätzliche Sequenz von ca. 400 bp bei *X. helleri* im Vergleich zu *X. maculatus* manifestiert werden.

Die Analyse *Pvu*II-verdauter DNA ergab weitere Auskünfte: Eine *Pvu*II-Schnittstelle befindet sich etwa in der Mitte von *Xi-X* bei *X. maculatus*. Mit *Xi-X_A*, die eine Region beinhaltet, die sich zum größten Teil strangaufwärts von dieser Schnittstelle befindet, kommen intensive Banden von 4,6 kb bei *X. helleri* und 4,4 kb bei *X. maculatus* zum

ERGEBNISSE

Vorschein. In der 5'-Region von *Xi-X* befindet sich also ein Längenunterschied zwischen den beiden Arten von ca. 200 bp. Mit der Sonde *Xi-X_C*, die eine Region beinhaltet, die sich strangabwärts von dieser Region befindet, hybridisierten Fragmente der Längen 3,45 bzw. 3,50 kb, was auch in der 3'-Region von *Xi-X* einen Längenunterschied verrät. *X. maculatus* besitzt hier ca. 50 bp zusätzliches Material. Die *PvuII*-Fragmente decken eine Region um *Xi-X* herum von ca. 8 kb ab, die Region erstreckt sich über 2-3 kb zu jeder Seite von *Xi-X*. Dieser Befund unterstützt die früheren Schlussfolgerungen, dass die Unterschiede zwischen *X. maculatus* und *X. helleri* hauptsächlich in der isolierten *Xi-X*-Region selbst zu suchen sind.

Auch eine *BglIII*-Schnittstelle befindet sich etwa in der Mitte von *Xi-X* in *X. maculatus*. *BglIII*-verdaute, genomische DNA ergab, mit *Xi-X_A* als Gensonde, Fragmente von 3,95 kb bei *X. helleri* und 3,70 kb bei *X. maculatus*, hier sind wieder Unterschiede von ca. 250 bp, zugunsten von *X. helleri*, in der 5'-Region von *Xi-X* zu sehen. Die Gensonde *Xi-X_C* ergibt ein *BglIII*-Fragment von 1,9 kb für *X. maculatus* und 1,2 kb für *X. helleri*. Hier sind, wie schon mit den Gensonden *Xi-X_C* und *Xi-X_{B-Spez2}* für *BamHI*-verdaute DNA festgestellt wurde, größere Unterschiede im 3'-Bereich zu beobachten.

Tab. 7

Restriktionsfragmente erreicht in Southern Analysen von *X. maculatus* und *X. helleri* unter Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme und Einsatz der Sonden *Xi-X_A* und *Xi-X_C*.

Die Fragmentlängen sind in kb angegeben.

| Enzym | <i>Xi-X_A</i> | | <i>Xi-X_C</i> | |
|----------------|-------------------------|----------------|-------------------------|----------------|
| | <i>maculatus</i> | <i>helleri</i> | <i>maculatus</i> | <i>helleri</i> |
| <i>EcoRI</i> | 2,2 | 2,6 | 2,2 | 2,6 |
| <i>BamHI</i> | 2,3 | 2,7 | 2,3/7,2 | 2,7/0,6 |
| <i>HindIII</i> | 8,5 | 8,5 | 8,5 | 8,5 |
| <i>XbaI</i> | 6,4 | 6,8 | 6,4 | 6,8 |
| <i>PvuII</i> | 4,4 | 4,6 | 3,50 | 3,45 |
| <i>BglIII</i> | 3,70 | 3,95 | 1,9 | 1,2 |

Durch Studien der genomischen Organisation von *Xi-X* bei *X. maculatus* und *X. helleri* konnten, durch das Schneiden der genomischen DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen und durch die Hybridisierung der entsprechenden Southern Blots mit verschiedenen Subgenosen von *Xi-X*, folgende mögliche Schlüsse gezogen werden: In einer Region von über 12 kb um *Xi-X* herum wurden keine großen Unterschiede in der Struktur beobachtet, außer dem Befund, dass *X. helleri* ein aus ca. 300-400 bp bestehendes, zusätzliches genetisches Material besitzt. Die Längenunterschiede befinden sich hauptsächlich (ca. 200-250 bp) im 5'-Bereich von *Xi-X*. Im 3'-Bereich von *Xi-X*

befindet sich größere, strukturelle Unterschiede. *Xi-X_{B-Spez2}* muss bei *X. helleri*, im Vergleich zu *X. maculatus*, entweder gesplittet sein oder in zwei Kopien vorliegen. Ein Teil muss 5' zu einer *Bam*HI-Schnittstelle liegen und detektiert das 2,7 kb *Bam*HI-Fragment. Der andere Teil muss weiter in 3'-Position als jedes andere *Xi-X*-Subfragment lokalisiert sein, und detektiert ein 6,6 kb *Bam*HI-Fragment. *Xi-X_C* detektiert ein internes *Bam*HI-Fragment von 0,6 kb, das sich dadurch in der Mitte von dem *B-Spez2*-Fragment von *X. maculatus* befinden müsste. *Xi-X* von *X. helleri* muss im Vergleich zu *X. maculatus* eine zusätzliche *Bam*HI-Schnittstelle besitzen; mit den verschiedenen Subgen sonden werden insgesamt drei *Bam*HI-Fragmente von 6,6, 2,7 und 0,6 kb detektiert. Auffallend ist, dass die Gesamtlänge der 3'-liegenden *Bam*HI-Fragmente von 0,6 und 6,6 kb bei *X. helleri* 7,2 kb ergibt, die gleiche Länge, die bei *X. maculatus* beobachtet wurde. Dieser Befund bestätigt wiederum, dass die *Xi-X*-flankierenden Sequenzen keine große Unterschiede in der Struktur aufweisen.

C-5) VERERBUNG DER ARTSSPEZIFISCHEN XI-X-FRAGMENTE IN RÜCKKREUZUNGSBASTARDEN DER WILDTYPEN UND DER PIGMENTZELLMUSTER-MUTANTEN

In diesem Hauptabschnitt wird die Vererbung der platyspezifischen (PS) *Xi-X*-Fragmente in Bezug zu der Vererbung der klassisch-genetisch definierten platyspezifischen Pigmentzellloci (PSP-Loci) und des *R_{Diff}*-Gens, in Rückkreuzungsbastarden von *X. maculatus* und *X. variatus* mit *X. helleri* beschrieben. Die Bestimmung der chromosomalen Lokalisation von *Xi-X* wird in zwei Unterabschnitten abgehandelt; im ersten Teil werden die Analysen mit Gesamtextrakten aus mehreren Fischen (siehe S. 125) und im zweiten Teil die Untersuchungen an Einzelindividuen erörtert (siehe S. 131). Eine eventuelle Beteiligung des *Xi-X*-Locus an der Entstehung der mutierten Pigmentzellmuster-Phänotypen wird in einem darauffolgenden Abschnitt analysiert (siehe S. 139). Zum Schluss wird das Auftreten von neuen Restriktionsfragmenten und eine untypische Vererbung der PS- und HS- (hellerispezifischen) Fragmente in Rückkreuzungsbastarden beschrieben (siehe S. 147).

Wie für die Untersuchungen der strukturellen Organisation von *Xi-X* in den Wildtyp-Genomen wurden die Southern Analysen der Rückkreuzungsbastarde hauptsächlich mit *Bam*HI-verdauter, genomischer DNA und die Hybridisierungen der entsprechenden Southern Blots mit der Sonde *Xi-X_C* durchgeführt.

Alle Kreuzungen und Rückkreuzungen von Fischen mit platyspezifischen Pigmentzellmustern (PSPM) wurden mit *X. helleri*, Population Rio Lancetilla, durchgeführt. Aus diesem Grunde besaßen alle entstandenen Bastarde die entsprechenden HS-*Xi-X*-Fragmente (für Ausnahmen, siehe S. 147ff.). Die F₁-Generation besaß erwartungsgemäß immer sowohl HS- als auch PS-*Xi-X*-Fragmente der parentalen Generationen. In den Rückkreuzungsgenerationen ist der Erbgang der PS-*Xi-X*-Fragmente in den PSPM-tragenden Fischen abhängig von einer eventuellen Kosegregation mit den spezifischen Pigmentzellloci.

Für Einzelindividuen der Rückkreuzungsbastarde, die PS-*Xi-X*-Fragmente vorwies, wurde nur eines der drei beobachteten 5'-liegenden *Bam*HI-Fragmente von *X. helleri*, entweder das 2,70, 2,65 oder 2,60 kb Fragment, detektiert (siehe Abb. 37, S. 124). In

ERGEBNISSE

Rückkreuzungsbastarden, die keine PS-*Xi-X*-Fragmente vorwiesen, war eins oder meistens zwei der HS-*Xi-X*-Fragmente vorhanden. Diese Befunde zeigen, dass *Xi-X* auf zwei homologen Chromosomenpaaren der verschiedenen Arten von *Xiphophorus* positioniert ist, und dass pro Chromosom nur eine Kopie des entsprechenden Gens vorhanden ist.

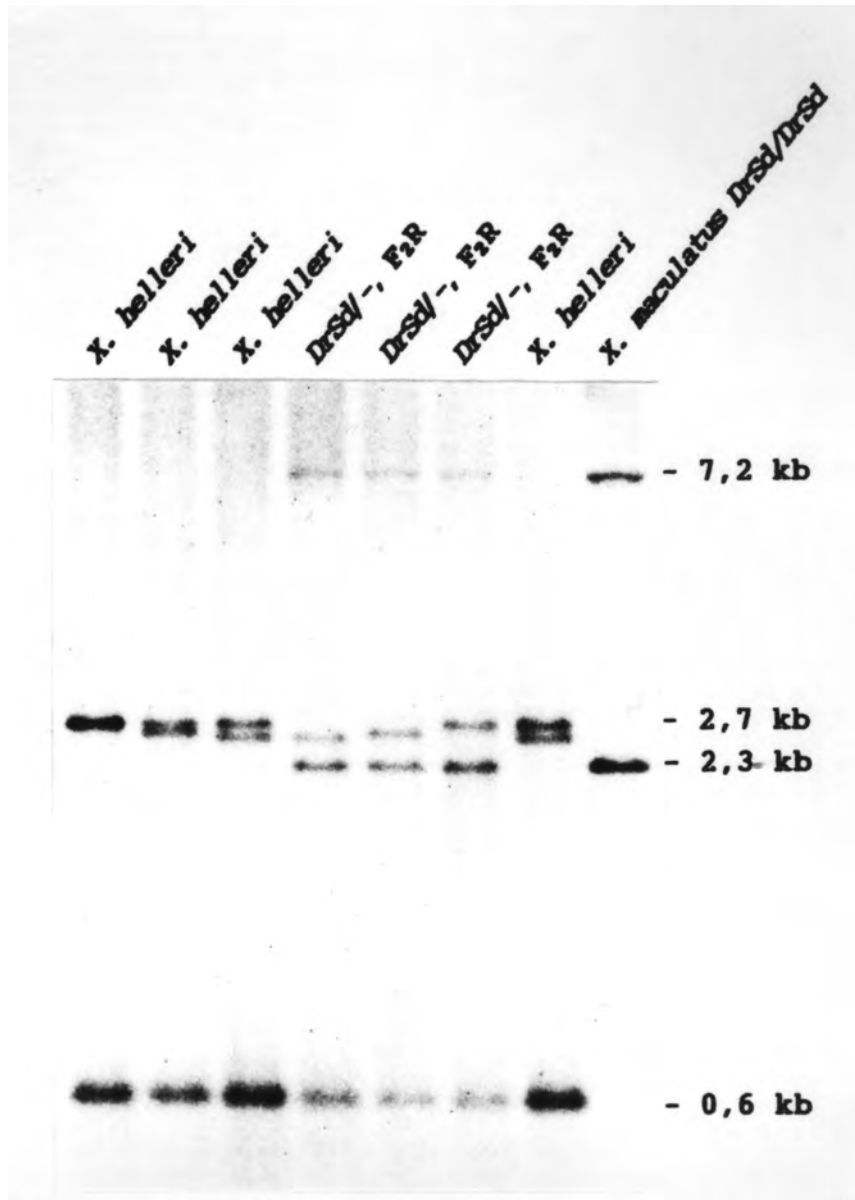


Abb. 37

Die Vererbung der *X. maculatus*- und *X. helleri*-spezifischen *Xi-X*-Fragmente in Einzelindividuen der Rückkreuzungsbastarde mit dem spezifischen Pigmentzellmuster *DrSd*.

Die DNA wurde mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Blot mit der Gensonde *Xi-X_C* hybridisiert.

Chromosomale Lokalisation von Xi-X

Von größtem Interesse war es, festzustellen, ob eine Kopplung des isolierten Genfragments *Xi-X* und der auf den Geschlechtschromosomen lokalisierten, spezifischen Pigmentzellloci von *X. maculatus* und *X. variatus* besteht. Eine Kopplung mit den Pigmentzellloci würde eine mögliche Beziehung zu den Makromelanophoren- oder Pterinophoren-Loci und deren regulatorischen Genen bzw. dem *Tu*-Komplex ermöglichen. Ein anderer, interessanter Marker des Melanomsystems ist das Gen *R_{Diff}*, das auf einem Autosom von *X. maculatus* lokalisiert ist und die Differenzierung der Melanophoren fördert.

Es wurde untersucht, inwieweit eine parallele Vererbung der PS-*Xi-X*-Fragmente und der PSPM bzw. des Gens *R_{Diff}* in den Rückkreuzungsbastarden vorliegt. Zuerst wurden Gesamtsolationen von DNA aus mehreren Fischen durchgeführt; die Ergebnisse sind im folgenden Abschnitt beschrieben. Untersuchungen an Einzelindividuen werden in einem darauffolgenden Abschnitt diskutiert (siehe S. 131).

Gesamtanalysen an DNA, isoliert aus mehreren Fischen

Zuerst wurden Analysen an DNA, isoliert aus mehreren Fischen gemeinsam, unternommen; die Ergebnisse werden in der Tab. 8 (siehe S. 130) zusammengefasst. Es wurde die Vererbung der Wildtyp-Pigmentzellmuster *DrSd*, *DySp*, *ArSr* und *BrNi* untersucht. Zusätzlich wurden die Pigmentzellmuster-Mutanten *BrNi^e* und *DrLi*, die beide die gleiche *Xi-X*-Organisation besitzen, die bei dem Wildtyp-Pigmentzellmuster *BrNi* bzw. *DrSd* beobachtet wurde (siehe S. 139-140), in die Untersuchungen einbezogen. Zu Rückkreuzungsgrad und Anzahl der eingesetzten Fische, siehe Tab. 8 (S. 130).

Rückkreuzungsbastarde, die ein PSPM besaßen, zeigten alle deutlich PS-*Xi-X*-Fragmente. Den gegenüber zeigten die Rückkreuzungsbastarde, die kein PSPM geerbt hatten, entweder keine PS-*Xi-X*-Fragmente, wie dies für *DrSd* (siehe Abb. 38, S. 127), *DySp* (siehe Abb. 39A, S. 128) und *BrNi^e* (siehe Abb. 39B, S. 128) der Fall war, oder die Hybridisierungssignale der PS-*Xi-X*-Signale waren deutlich schwächer als die Signale, die für die HS-*Xi-X*-Fragmente erreicht wurden. Diese letzte Kombinationsmöglichkeit wurde für *BrNi* (siehe Abb. 39B, S. 128) und *DrLi* (siehe Abb. 40, S. 129) beobachtet. Es konnte in bezug auf das Gen *R_{Diff}* keine strukturellen Unterschiede für die *Xi-X*-Region in den Rückkreuzungsbastarden festgestellt werden.

Dieser beobachtete Erbgang der PSP-Loci und der PS-*Xi-X*-Fragmente ermöglichen verschiedene strukturelle Beziehungen der beiden Parameter: Rückkreuzungsbastarde, die kein PSPM besaßen, zeigten trotzdem geringe Mengen PS-*Xi-X*-Fragmente. Dieses würde sich ergeben, wenn *X. helleri* auch diese PS-Fragmente im Genom besitzen würde; die ausführlichen Untersuchungen an vielen Fischen der parentalen Generation, schließt diese Möglichkeit weitgehend aus (siehe S. 115). Die Lokalisation der Homöobox bei *X. maculatus* könnte autosomal sein, und eine Vererbung mit den Pigmentzellmustern entspricht einer zufälligen Verteilung des *Xi-X*-enthaltenden Autosoms in den Rückkreuzungsbastarden. Diese Situation ist besonders bei den niedrigen Rückkreuzungen, bei der viele *X. maculatus*-spezifische Chromosomen in den Fischen noch vorhanden sind, gegeben. Bei dieser Erklärung müssten die PSPM-freien

und PSPM-tragenden Bastarde die gleiche Vererbung der PS-*Xi-X* Fragmente vorweisen. Die Ergebnisse an DNA, isoliert aus mehreren Fischen, zeigten aber, auch in niedrigen Rückkreuzungsgenerationen, eine deutliche Tendenz für eine Vererbung parallel mit den Pigmentzellmustern. Eine andere Erklärung wäre darin zu suchen, dass somatische Rekombinationsereignisse verschiedene *Xi-X*-Organisationen in einem Individuum produzieren könnten. Die plausibelste Erklärung ist vielleicht darin zu suchen, dass die Homöobox zwar an die PSP-Loci gekoppelt ist, aber mit einem gewissen Abstand, so dass einen Austausch zwischen den beiden Loci in der Meiose stattfinden kann.

Diese nicht eindeutige Interpretation des Erbgangs der *Xi-X*-Fragmente machte es deutlich, dass zum einen die Organisation der *Xi-X*-Fragmente in der parentalen Generation ausführlich untersucht werden musste (siehe S. 109ff.), zum anderen mussten die Untersuchungen der Vererbung der *Xi-X*-Fragmente in Einzelindividuen der Rückkreuzungsbastarde durchgeführt werden (siehe S. 131ff.). Außerdem war eine große Anzahl an Fische für die Analysen erforderlich.

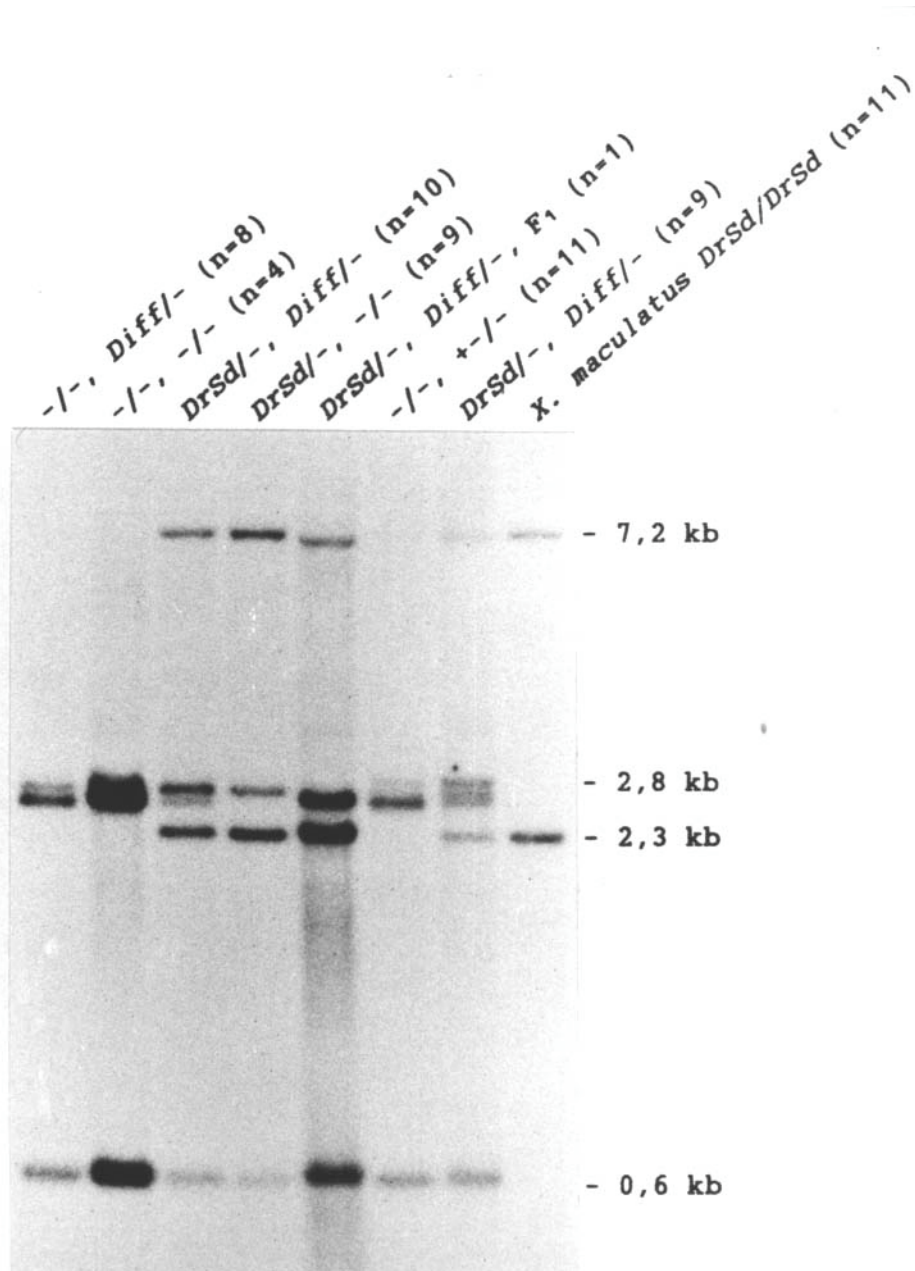


Abb. 38

Southern Analyse der Vererbung von *X. maculatus*- und *X. helleri*-spezifischen *Xi-X*-Fragmenten in einem F₁-Bastard und in Rückkreuzungsbastarden von *DrSd*, wobei die DNA aus mehreren Fischen zusammen isoliert wurde.

Die DNA wurde mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit der Sonde *Xi-X_C* hybridisiert. n gibt die Zahl der gemeinsam analysierten Fische an. Die erste Position in der Spur-Beschriftung bezeichnet die An- (*DrSd*/-) bzw. Abwesenheit (-/-) der Pigmentzellloci *DrSd* in den Bastarden. Die zweite Position sind entsprechend für das Loci *R_{Diff}* (*Diff*/- bzw. -/-) bezeichnend.

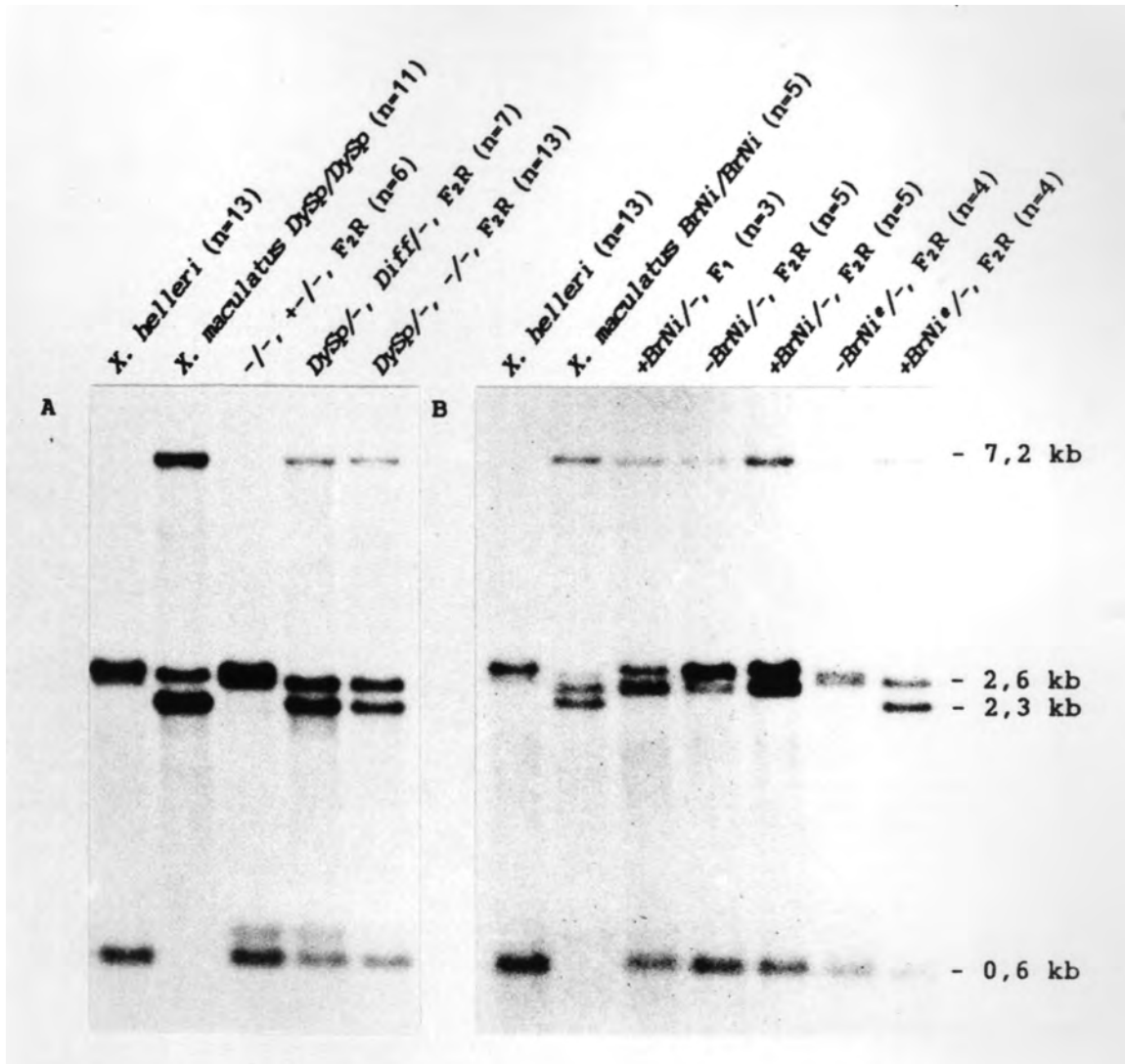


Abb. 39

Southern Analyse der Vererbung von *X. maculatus*- und *X. helleri*-spezifischen *Xi-X*-Fragmenten in Rückkreuzungsbastarden von A) *DySp* und B) *BrNi* bzw. *BrNi^e*, wobei die DNA aus mehreren Fischen zusammen isoliert wurde.

Die DNA wurde mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit der Sonde *Xi-X_C* hybridisiert. n gibt die Zahl der gemeinsam analysierten Fische an. *DySp*, *BrNi* bzw. *BrNi^e* und *Diff* (*R_{Diff}*) bezeichnen das Vorkommen dieser PS-Loci in den Rückkreuzungsbastarden (siehe Text zur Abb. 38, S. 127).

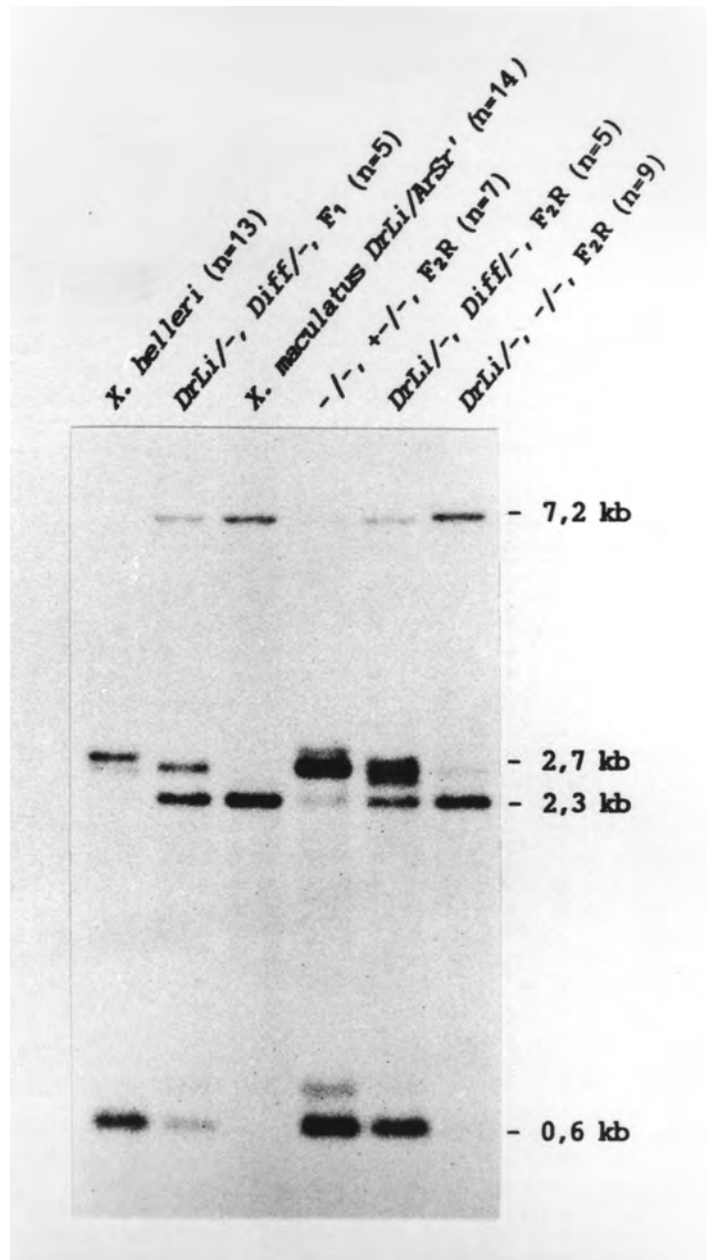


Abb. 40

Southern Analyse der Vererbung von *X. maculatus*- und *X. helleri*-spezifischen *Xi-X*-Fragmenten in Bastarden und Rückkreuzungsbastarden von *DrLi*, wobei die DNA aus mehreren Fischen zusammen isoliert wurde.

Die DNA wurde mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit der Sonde *Xi-X_C* hybridisiert. n gibt die Zahl der gemeinsam analysierten Fische an. *DrLi* und *Diff* (*R_{Diff}*) bezeichnen das Vorkommen dieser PS-Loci in den Bastarden bzw. Rückkreuzungsbastarden (siehe Text zur Abb. 38, S. 127).

Tab. 8

Die Vererbung der platyspezifischen Pigmentzellmuster und Xi-X-Fragmente in Rückkreuzungsbastarden mit *X. helleri*, wobei die DNA aus mehreren Fischen isoliert wurde.

F_nR gibt den Grad der Rückkreuzung an, die untersucht wurde. Wo dieser nicht bekannt war, wurde er mit x bezeichnet.

* Die Vererbung der PSPM in den Rückkreuzungsbastarden wird mit + oder - angegeben. Zusätzlich wird die An- (*Diff/-*) bzw. Abwesenheit (*-/-*) des Gens *R_{Diff}* im Genom angegeben.

** - bedeutet, dass die PS-Xi-X-Fragmente nicht beobachtet werden konnten, +, dass die PS-Xi-X-Fragmente in einer Intensität vorhanden waren, die mit der Intensität der HS-Xi-X Fragmente vergleichbar war, und (+) bezeichnet, dass das Vorkommen der PS-Xi-X-Fragmente deutlich geringer war, als die der HS-Xi-X Fragmente.

DrSd(*): Die DNA dieser Rubrik wurde von Frau Dr. G. Krekeler, Genetisches Institut, Gießen, isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

PSPM: platyspezifisches Pigmentzellmuster

HS: hellerispezifisch, PS: platyspezifisch

| Pigmentzell-Muster | Rückkreuz. F_nR | Anzahl | Vererb. des PSPMs* | Vererb. der PS-Xi-X** |
|---------------------------|----------------------------------|---------------|---------------------------|------------------------------|
| <i>DrSd</i> | F _x R | 11 | - | - |
| | | 9 | + (<i>Diff/-</i>) | + |
| | | 15 | + (<i>-/-</i>) | + |
| <i>DrSd</i> (*) | F _x R | 8 | - (<i>Diff/-</i>) | - |
| | | 4 | - (<i>-/-</i>) | - |
| | | 10 | + (<i>Diff/-</i>) | + |
| | | 9 | + (<i>-/-</i>) | + |
| <i>DySp</i> | F ₂ R | 6 | - | - |
| | | 7 | + (<i>Diff/-</i>) | + |
| | | 13 | + (<i>-/-</i>) | + |
| <i>ArSr</i> | F ₇ R | 5 | + | + |
| <i>BrNi</i> | F ₂ R | 5 | - | (+) |
| | | 5 | + | + |
| <i>BrNi^e</i> | F ₂ R | 4 | - | - |
| | | 4 | + | + |
| <i>DrLi</i> | F ₂ R | 7 | - | (+) |
| | | 5 | + (<i>Diff/-</i>) | + |
| | | 9 | + (<i>-/-</i>) | + |

Untersuchungen an DNA, isoliert aus einzelnen Fischen

Die Fragestellung dieser Analysen bestand darin, ob das isolierte Genfragment *Xi-X* mit den spezifischen Pigmentzellloci auf den Geschlechtschromosomen von *X. maculatus* und *X. variatus* gekoppelt ist, wie dies durch Analysen an DNA, isoliert aus mehreren Fischen gemeinsam, sich andeutete (siehe S. 125). Sollte dies der Fall sein, wäre ein Ausdruck für den Kopplungsgrad zu bestimmen. Ausführliche Studien der Vererbung von *Xi-X* wurden mit den Pigmentzellloci *DrSd* auf dem X-Chromosom von *X. maculatus* in den Rückkreuzungen mit *X. helleri* unternommen. Ergänzende Analysen wurden mit anderen Pigmentzellloci durchgeführt. Die Ergebnisse von DNA-Analysen isoliert aus einzelnen Fischen, sind in der Tab. 9 (siehe S. 145) zusammengefasst.

Die Untersuchungen bezogen sich auf die Frage, inwieweit die PS-*Xi-X*-Fragmente parallel mit den PSPM vererbt wurden. Ein Rekombinationsereignis zwischen den Pigmentzellloci und *Xi-X* würde rekombinante Chromosomen hervorrufen, die entweder die PSP-Loci zusammen mit den HS-*Xi-X*-Fragmenten, oder keine PSP-Loci, aber trotzdem die PS-*Xi-X*-Fragmente, besitzen. Für höhere Rückkreuzungen können in bezug auf Studien des Kopplungsgrades zweier Loci nur verwendet werden, wenn größere Populationen von Fischen für die Kreuzungen zur Verfügung stehen. Mit wenigen Fischen als Grundlage für die Kreuzungen kann der gefundene Kopplungsgrad fehlerhaft sein, abhängig von der Frequenz rekombinanter Chromosomen in den für die Kreuzungen verwendeten Individuen. Für die Aussage über eine Kopplung können diese hohe Rückkreuzung trotzdem informativ sein. In der Tab. 10 (siehe S. 146) wird die erwartete Inzidenz von rekombinanten Chromosomen bei einer Kopplung von 15 cM bzw. die Wahrscheinlichkeit einer parallelen Vererbung von PSPM und PS-*Xi-X*-Fragmente bei einer autosomalen Lokalisation von *Xi-X* verschiedener Rückkreuzungsgenerationen aufgelistet.

62 Einzelindividuen der ersten Rückkreuzung (F_2R) von *X. maculatus DrSd* mit *X. helleri* wurden untersucht (siehe Abb. 42, S. 133). Davon waren 30 tumorfrei, 32 besaßen entweder ein benignes oder ein malignes Melanom. Es zeigte sich, dass 28 der 32 tumortragenden Fische die PS-*Xi-X*-Fragmente besaßen. Dagegen wiesen 25 der 30 tumorfreien Tiere keine PS-*Xi-X*-Fragmente auf. Dies zeigt eindeutig eine parallele Vererbung der PSP-Loci und der PS-*Xi-X*-Fragmente: Eine Lokalisation von *Xi-X* auf demselben Chromosom, auf dem auch *DrSd* sich befindet, muss angenommen werden. Es wurden insgesamt 9 Rekombinationsereignisse in 62 Fischen beobachtet, eine Rekombinationsrate von 14,5% ergebend. Die gute Übereinstimmung der Rekombinationsereignisse in den beiden Gruppen, den tumorfreien (5/30) und den tumortragenden (4/32) Fischen, bestätigt die Validität dieser Kopplungsfrequenz (14,6 +/- 2,1%). In der F_2R -Generation ist die Rekombinationsfrequenz ein direkter Ausdruck für den Kopplungsgrad der beiden Loci, der damit ca. 15 cM beträgt.

Von 19 tumorfreien und 44 tumortragenden Bastarden der dritten Rückkreuzungsgeneration (F_4R) von *X. maculatus DrSd* mit *X. helleri* zeigte 1 Individuum der tumorfreien (5,3%) und 27 Individuen der tumortragenden Fische (61,4%) eine Rekombination zwischen den Pigmentzellloci *DrSd* und *Xi-X*. Die dritte Rückkreuzungsgeneration würde bei einer Kopplung von 15 cM theoretisch Rekombinationsereignisse von 10,8% bzw. 38,6% aufweisen. Die Zahl der gefundenen rekombinanten Chromosomen, sowohl in den tumorfreien als auch in den

ERGEBNISSE

tumortragenden Fischen, stimmten aber für eine Kopplung von 15 cM für die F₇R-Generation gut überein (siehe Tab. 10, S. 146; 6,7% bzw. 62,3%). Andere Kopplungsgrade oder andere Rückkreuzungsgenerationen würden diese Übereinstimmung zwischen den beiden Gruppen von tumorfreen bzw. tumortragenden Tieren nicht ergeben. Diese Analysen über die Kopplung von *DrSd* und *Xi-X* in der F₄R-Generation bestätigen damit die gefundene Kopplung von ca. 15 cM, gefunden bei den Analysen der F₂R-Generation. Die Diskrepanzen der erwarteten und observierten Rekombinationsfrequenz der F₄R-Generation beruhen wahrscheinlich auf einer zu hohen Präsenz rekombinanter Chromosomen in den für die Kreuzungen eingesetzten Fischen, was besonders unter Verwendung weniger Fische für die Kreuzungen auftreten kann.

Eine Austauschfrequenz von 15% bzw. eine Kopplung von 15 cM entspricht ungefähr einem Abstand von 30% der Chromosomenlänge (siehe Abb. 41, unten). Der Abstand zwischen den Pigmentzellloci und dem homöobox-enthaltenden Genfragment *Xi-X* ist zu lang, um eine direkte strukturelle Beziehung zu dem Makromelanophoren- oder Pterinophoren-Locus oder deren regulatorischen Genen (*R_{Co}*, *R_{Gew}*), die sehr nah an den Pigmentzellloci lokalisiert sein müssen, zu bestätigen.

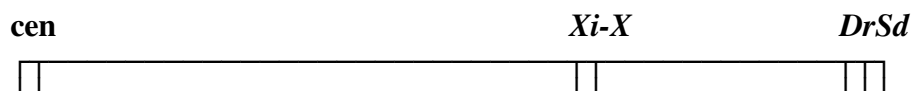


Abb. 41

Die relativen Positione des homöobox-enthaltendes Gen *Xi-X* und der Pigmentzellloci *DrSd* auf dem X-Chromosom von *X. maculatus* *DrSd* aus dem Rio Jamapa.

cen; Centromer

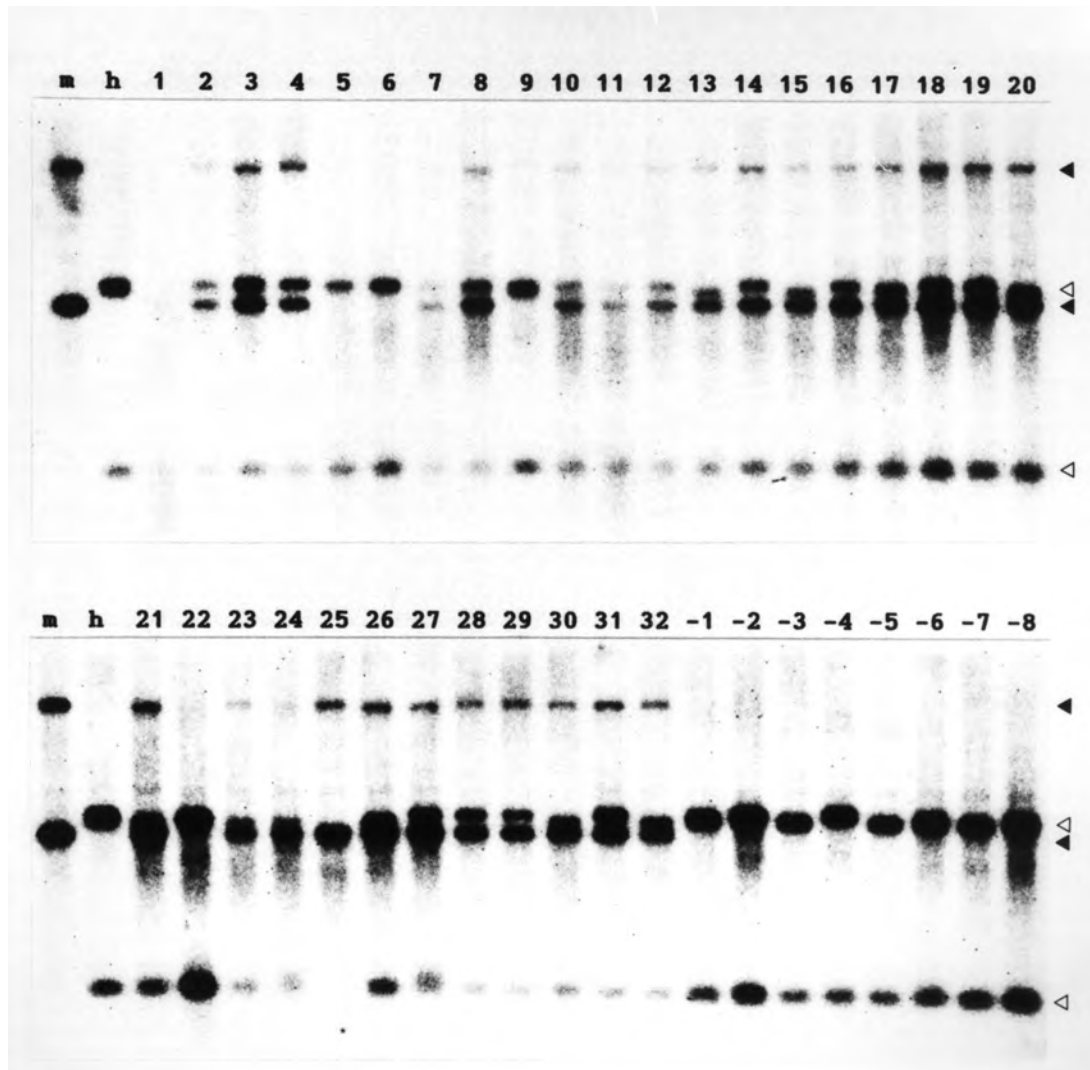


Abb. 42

Southern Analyse der Vererbung von *X. maculatus*- und *X. helleri*-spezifischen *Xi-X*-Fragmenten in Rückkreuzungsbastarden (F_2R) von *DrSd*.

Die Tiere wurden als Einzelindividuen untersucht. Die Fische 1-32 hatten alle das platyspezifische Pigmentzellmuster *DrSd* geerbt. Die Nummer -1 bis -8 bezeichnen Fische, die *DrSd* nicht geerbt hatten.

Die DNA wurde mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit *Xi-X_C* hybridisiert.

Die dunklen Pfeile geben die *X. maculatus*-spezifischen, die offenen Pfeile die *X. helleri*-spezifischen Fragmente an.

m: *X. maculatus DrSd/DrSd*

h: *X. helleri*

Tab. 9 (siehe S. 145) zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse der Rekombination zwischen *Xi-X* und der PSP-Loci anderer untersuchter Phänotypen. Die Zahl der untersuchten Individuen der einzelnen Gruppen ist jedoch hier zu klein, um Aussagen über den Kopplungsgrad machen zu können. Überzeugend ist die große Zahl der PS-*Xi-X*-Fragmente in der 28. Rückkreuzung (F₂₉R) von Fischen mit den Pigmentzellloci *YeLi*, bei denen, trotz der großen Zahl von Meiosen, noch 1 von 6 PSPM-tragenden Fischen die ursprüngliche Platy-Struktur behalten hat (siehe Abb. 44, S. 136). Von 6 PSPM-freien Fischen der gleichen Rückkreuzung hatte einer die PS-*Xi-X*-Fragmente geerbt. Einer von zwei PSPM-tragenden Fischen der 27. Rückkreuzung (F₂₈R) zeigte ein chimäres Chromosom (siehe Abb. 43, S. 135). Diese Ergebnisse zeigen ein relativ häufiges Vorkommen der PS-*Xi-X*-Fragmente in sehr hohen Rückkreuzungen und sprechen für eine sichere Kopplung von *Xi-X* an die Pigmentzellloci *YeLi* auf dem X-Chromosom von *X. variatus*, Rio Panuco; ohne eine Kopplung würden, durch eine Verdünnung der Platychromosomen, weniger als 10⁻⁶ Fische die PS-*Xi-X*-Fragmente besitzen (siehe Tab. 10, S. 146). Keine Rückkreuzungsbastarde von *X. variatus* mit dem Y-Chromosom, durch die Pigmentzellloci *OrPu* charakterisiert, standen für Untersuchungen zur Verfügung; eine Aussage über die Kopplung an die Pigmentzellloci *OrPu* kann deswegen nicht gemacht werden. Rückkreuzungsbastarde der Translokationsmutante *YeLiOrPu* wurden untersucht (siehe Abb. 43, S. 135), die Ergebnisse werden im Abschnitt der Pigmentzellmuster-Mutanten beschrieben (siehe S. 139ff.).

Das 5'-liegende Fragment von 2,55 kb, observiert im Genom von *X. variatus*, unterscheidet sich wenig von dem Fragment von 2,60 kb, observiert im Genom von *X. helleri*. Um zu beurteilen, ob die PS-Fragmente vererbt wurden, wurde auf das 7,2 kb "Platy"-Fragment Gewicht gelegt (siehe auch S. 149).

Für die Pigmentzellloci *ArSr* auf dem Y-Chromosom von *X. maculatus* aus dem Rio Jamapa wurden 4 Tiere der ersten Rückkreuzung (F₂R), zwei ohne und zwei mit geerbtem PSPM, als Einzelindividuen untersucht (Ergebnisse nicht gezeigt). Nur einer der untersuchten Fische zeigte eine Rekombination. Weiter zeigten zwei Einzelindividuen der 6. Rückkreuzung (F₇R) mit geerbtem PSPM beide PS-*Xi-X*-Fragmente (siehe Abb. 46, S. 141). Untersuchungen an DNA, isoliert aus mehreren Fischen zusammen (5 Tiere, siehe Tab. 8, S. 130), zeigten auch eine deutliche Vererbung der PS-Fragmente in PSPM-tragenden Fischen der 6. Rückkreuzung. Wenn keine Kopplung vorliegen würde, würden unter 2% der Fische der F₇R-Generation PS-*Xi-X*-Fragmente besitzen (siehe Tab. 10, S. 146). 2 Einzelindividuen mit der Mutation *ArSr'* der ersten Rückkreuzung (F₂R) zeigten auch die PS-*Xi-X*-Fragmente (siehe Abb. 46, S. 141). Die Ergebnisse aus Untersuchungen mit Einzelindividuen und mehreren Fischen gemeinsam lässt eine Kopplung der Pigmentzellloci *ArSr* bzw. *ArSr'* und *Xi-X* auf dem Y-Chromosom von *X. maculatus* aus dem Rio Jamapa vermuten. Werden die analysierten Fische der ersten Rückkreuzung (F₂R) berücksichtigt, beträgt die Kopplung 16,7 cM (1 Rekombinationsvorgang in 6 Tieren) und ist mit der gefundenen Kopplung von *Xi-X* an die Loci *DrSd* vergleichbar.

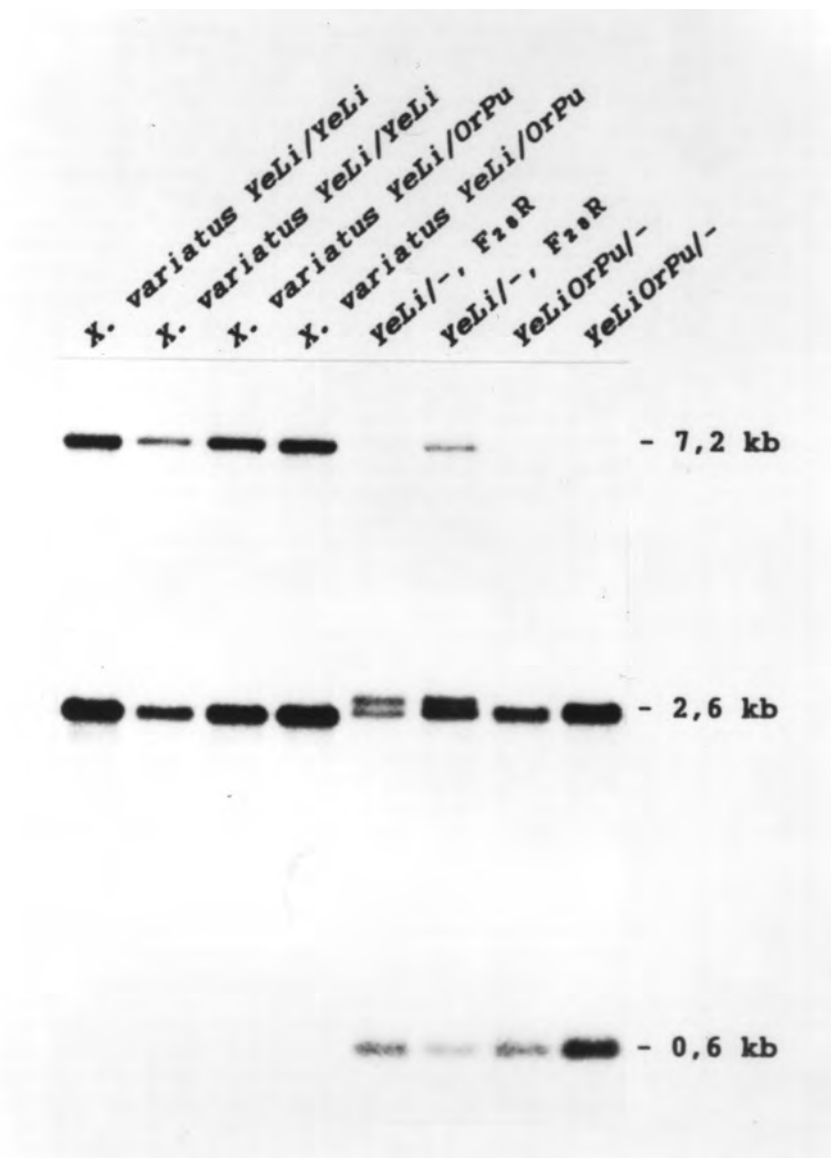


Abb. 43

Southern Analyse der *Xi-X*-Organisation in *X. variatus*, Weibchen ($X^{YeLi}X^{YeLi}$) und Männchen ($X^{YeLi}Y^{OrPu}$), und der Vererbung der *Xi-X*-Fragmente in Rückkreuzungsbastarden mit den Pigmentzellloci *YeLi* und *YeLiOrPu*.

Die Rückkreuzungen wurden mit *X. helleri* durchgeführt. Die DNA wurde von Einzelindividuen untersucht, mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit *Xi-X_C* hybridisiert.

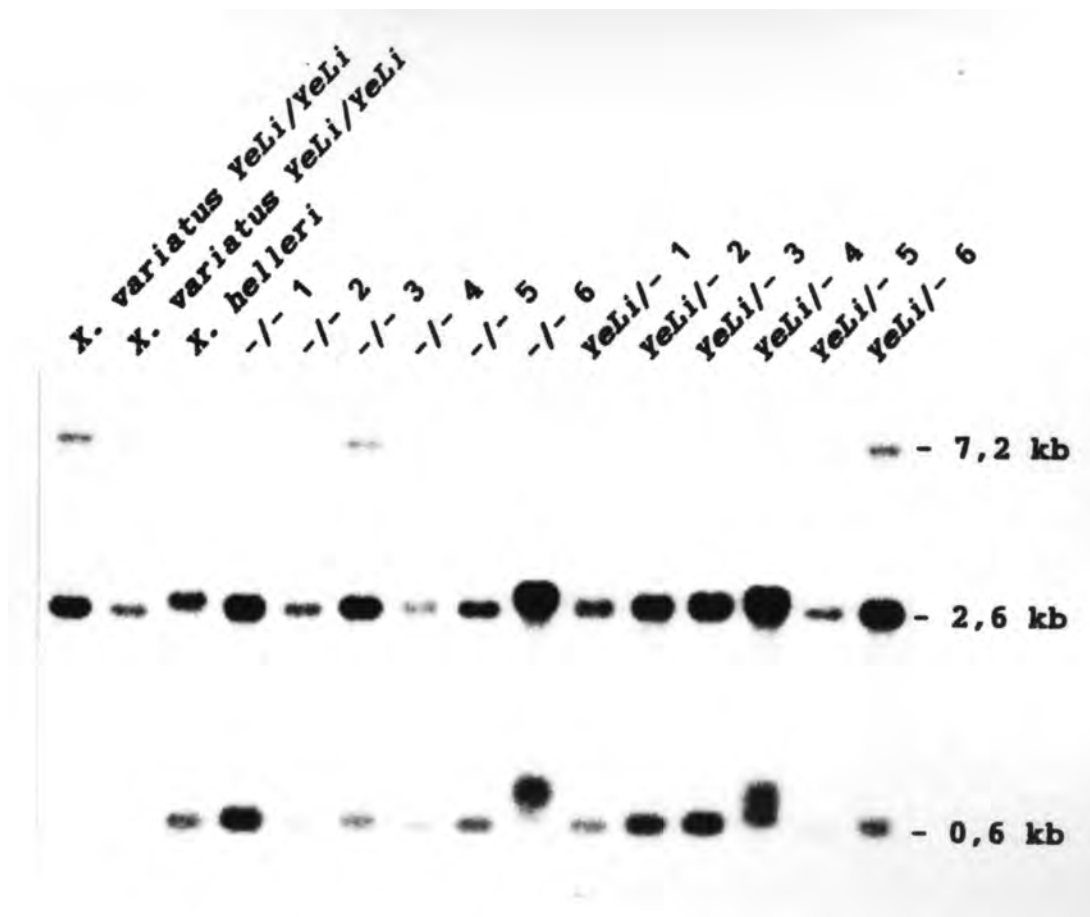


Abb. 44

Southern Analyse der Vererbung von *X. maculatus*- und *X. helleri*-spezifischen *Xi-X*-Fragmenten in Rückkreuzungsbastarden (F_2R) von *YeLi*.

Die Tiere wurden als Einzelindividuen untersucht. Die Fische, die das platyspezifische Pigmentzellmuster (PSPM) geerbt hatten, erhalten die Bezeichnung *YeLi/-*; im negativen Fall wird dieser mit *-/-* bezeichnet. Die DNA wurde mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit *Xi-X_C* hybridisiert.

Hinsichtlich der Pigmentzellloci *BrNi* auf dem Z-Chromosom von *X. maculatus*, Belize River, wurden 6 Rückkreuzungsbastarde, alle Geschwister, des ersten Grades (F_2R) untersucht. Eine Rekombination wurde nur bei einem der drei PSPM-tragenden Fischen observiert (siehe Abb. 45, S. 138). Dies ergibt 1 Rekombinationsereignis in 6 Individuen, einer Kopplung von 16,7% entsprechend. Einer der Bastarde, der das Z-Chromosom erbt, hatte den funktionellen *Ni*-Locus verloren, der *Br*-Locus war erhalten geblieben (siehe auch S. 140). Die Analysen von DNA, isoliert aus mehreren Fischen, bestätigten die Befunde (siehe Tab. 8, S. 130; Abb. 39B, S. 128): In den Rückkreuzungsbastarden von *BrNi* (F_2R), die kein PSPM geerbt hatten, waren die PS-*Xi-X*-Fragmente nur sehr schwach zu beobachten. Rückkreuzungsbastarde von der PSPM-Mutante *BrNi^e* (F_2R) zeigten eine eindeutige Vererbung der PS-*Xi-X*-Fragmente mit PSPM, die PSPM-freien Fische zeigten keine PS-*Xi-X*-Fragmente. Auch für *BrNi* bzw. *BrNi^e* muss eine Kopplung von *Xi-X* mit den spezifischen Pigmentzellloci auf dem Z-Chromosom von *X. maculatus*, Belize River, angenommen werden.

Für die parentale Generation von *X. maculatus* aus dem Belize River wurden zwei 5'-liegende *Bam*HI-Fragmente von 2,3 bzw. 2,5 kb nachgewiesen (siehe S. 113). In den Rückkreuzungsbastarden mit *X. helleri* (F₂R), die die PS-*Xi-X*-Fragmente aufwiesen, kam nur eines der beiden Fragmente zur Erscheinung: In den untersuchten Einzelindividuen der Rückkreuzungsbastarde mit den Loci *BrNi* (siehe oben und Abb. 45, S. 138) besaßen alle Tiere das 2,3 kb Fragment. Gesamtanalysen von Rückkreuzungsbastarden von *BrNi* zeigten alle nur das 2,5 kb Fragment, sowohl in den PSPM-tragenden, als auch schwach in den PSPM-freien Individuen (siehe Abb. 39B, S. 128). Rückkreuzungsbastarde von *BrNi^e* zeigten nur das 2,3 kb Fragment (siehe Abb. 39B, S. 128). Die Vererbung von nur einem der beiden Fragmente in einer Analyse hängt mit den wenigen erfolgreichen Bastardierungen, die von *X. maculatus* aus dem Belize River und *X. helleri* ausgehen, sicherlich zusammen. Ein fertiler F₁-Bastard erbt nur eines der beiden Fragmente, das dann an alle weiteren F₂R-Bastarde weitergegeben wird. Alle Tiere einer Untersuchung waren deswegen vermutlich Geschwister, die von einem F₁-Bastard abstammten. Die Untersuchungen der Rückkreuzungsbastarde mit den PSPM *BrNi* bzw. *BrNi^e* bestätigten, dass die 2,3 und 2,5 kb *Bam*HI-Allele von *Xi-X* beide auf dem *BrNi*- bzw. *BrNi^e*-tragenden Z-Chromosom dieser *X. maculatus*-Population lokalisiert sind. Weibchen mit WZ können auch die beiden, verschiedenen *Xi-X*-Fragmente besitzen (für *BrNi^e* beobachtet, Ergebnis nicht gezeigt), was indirekt auch das W-Chromosom als ein Träger für *Xi-X* schließen läßt.

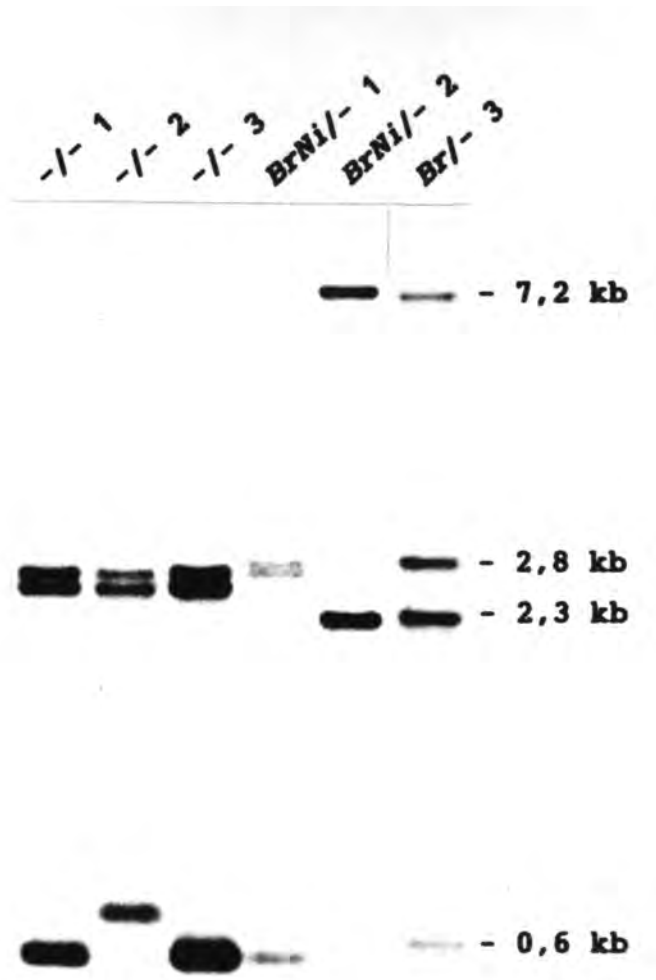


Abb. 45

Southern Analyse der Vererbung von *X. maculatus*- und *X. helleri*-spezifischen *Xi-X*-Fragmenten in Rückkreuzungsbastarden (F_2R) von *BrNi*.

Die Fische wurden als Einzelindividuen untersucht. Die DNA wurde mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit *Xi-X_C* hybridisiert. Der Fisch *Br/-* 3 hat das Z-Chromosom geerbt, die funktionelle *Ni*-Einheit aber verloren (siehe S. 140).

Strukturelle Organisation von Xi-X in Rückkreuzungsbastarden der Pigmentzellmuster-Mutanten und in Zelllinien

Als bekannt war, dass *Xi-X* mit den Pigmentzellloci auf den Geschlechtschromosomen von *X. maculatus* und *X. variatus* gekoppelt ist, war es interessant, zu erkunden, ob die Mutationsereignisse, die zu geänderten Pigmentzellmustern geführt hatten, auf Umordnungen dieser *Xi-X*-Region zurückzuführen sein könnten. Die Interpretation der Involvierung von *Xi-X* in den Mutationsereignissen setzt Kenntnisse der parental Wildtyp-Organisation (siehe S. 109ff.) und der chromosomalen Lokalisation von *Xi-X* (siehe S. 125ff.) voraus. Wegen des Abstands von 15 cM zwischen den Pigmentzellloci und *Xi-X* ist es möglich, dass die PS-*Xi-X*-Fragmente in PSPM-tragenden Bastarden durch Rekombinationsereignisse mit homologen Bereichen der *X. helleri*-Chromosomen verlorengegangen sind.

Pigmentzellmuster-Mutanten

Im vorangegangenen Hauptabschnitt (siehe S. 109ff.) sind zwei Einzelindividuen von *X. maculatus* mit dem kompartiments-mutierten PSPM ***DrSd'*** (*DrSd'/ArSr'*) beschrieben worden. Diese Individuen zeigten beide, wie die Individuen mit dem Wildtyp-Pigmentzellmuster *DrSd*, *BamHI*-Fragmente von 2,3 und 7,2 kb (siehe Abb. 33, S. 112). Ausschließlich diese beiden Fragmente wurden auch in einer Gesamtextraktion von 13 weiblichen *X. maculatus DrSd'/DrSd'*-Individuen beobachtet (siehe Abb. 33, S. 112). Kein Mutationsereignis konnte damit der *Xi-X*-Region des X-Chromosoms zugeschrieben werden.

Drei Individuen der Kompartimentsmutante ***BrNi^e*** in *X. maculatus* wurden einzeln untersucht (siehe S. 113, Ergebnisse nicht gezeigt). Die *Xi-X*-Organisation dieser Mutante unterscheidet sich nicht von der *Xi-X*-Organisation von Tieren mit dem Pigmentzellmuster *BrNi*, das Pigmentzellmuster aus dem die Mutante entstanden ist. Auch die Gesamtanalysen an mehrere Rückkreuzungsbastarde von *BrNi^e* zeigten die gleichen Belize River-spezifischen Fragmente von *Xi-X* wie *BrNi* (siehe Abb. 39B, S. 128). Das Fragment *Xi-X* spiegelt für *BrNi^e* keine strukturelle Involvierung dieses homöobox-enhaltenden Gens in diesem Mutationsvorgang wider.

Die Expressionsmutante ***ArSr'***, die durch die Analysen zweier Einzelindividuen von *X. maculatus* mit den Pigmentzellloci *DrSd'/ArSr'* untersucht wurde, zeigte keine veränderte *Xi-X*-Organisation im Vergleich zu den Individuen, die die Pigmentzellloci *DrSd/ArSr* besaßen (siehe Abb. 33, S. 112). Auch eine Gesamtanalyse von 14 Männchen mit den mutierten Pigmentzellloci *DrLi/ArSr'* konnte nur diese beiden PS-Fragmente ausfindig machen (siehe Abb. 40, S. 129). Zwei Einzelindividuen der ersten Rückkreuzung von *ArSr'* mit PSPM zeigten auch beide die PS-*BamHI*-Fragmente von 2,3 und 7,2 kb (siehe Abb. 46, S. 141): Das Mutationsereignis, das zu einer erhöhten *ArSr*-Expression führte, wurde in der isolierten Region *Xi-X* nicht vorgefunden.

Fische mit 2 Y-Chromosomen, ein Gesamtisolat der DNA von 8 Individuen mit *ArSr'/ArSr'*, wurden untersucht (nicht gezeigt): Sie zeigten zusätzlich zu den beschriebenen Banden Fragmente neuer Länge, dieses Bandenmuster wird in einem

anderen Abschnitt diskutiert (siehe „Abweichungen der erwarteten *Xi-X*-Organisation und des *Xi-X*-Erbgangs in Bastarden von *Xiphophorus*, S. 147ff.).

Es wurde die 4. Rückkreuzungsgeneration (F₅R) der beiden Translokations-Mutanten ***DrArSr*** und ***DrAr*** mit jeweils 2 Einzelindividuen (siehe Abb. 46, S. 141) und einer Gesamtanalyse aus 5 Fischen untersucht. Für diese Mutanten konnten keine PS-*Xi-X*-Fragmente beobachtet werden. Wahrscheinlich sind die PS-*Xi-X*-Fragmente durch natürliche Rekombinationsereignisse mit denen von *X. helleri* ausgetauscht worden. Aussagen über die Organisation des *X. maculatus*-spezifischen homöobox-enthaltenden Fragments *Xi-X* nach dem Translokationsprozess können damit nicht gemacht werden.

Rückkreuzungsbastarde mit dem mutierten X-Chromosom ***YeLiOrPu*** (n=2) zeigten nur die HS-*Xi-X*-Fragmente (siehe Abb. 43, S. 135), so dass für diese Mutante keine Aussage über die Organisation der PS-*Xi-X*-Region gemacht werden kann.

Für die Translokationsmutante mit den Pigmentzellloci ***DrLi*** wurden nur Gesamtanalysen von mehreren Individuen durchgeführt (siehe Abb. 40, S. 129). 14 Männchen mit den Pigmentzellloci *DrLi/ArSr'* zeigten die *Bam*HI-Fragmente von 2,3 und 7,2 kb, die auch für Fische mit den *DrSd*-Loci beobachtet wurden. Weiter wurden 5 Individuen der F₁-Generation von *DrLi* untersucht; sie zeigten eindeutig die gleichen PS-*Xi-X*-Fragmente zusätzlich zu den HS-Fragmenten. Die Rückkreuzungsbastarde der ersten Rückkreuzungsgeneration mit *DrLi* (5 mit und 9 ohne das *R_{Diff}*-tragende Chromosom im Genom) wiesen auch die beschriebenen PS-Fragmente auf. Der Translokationsprozess muss in einer Region distal von *Xi-X* stattgefunden haben. Eine Organisation von *Xi-X* entsprechend der von *DrSd* sagt aus, dass das Chromosom als solches wahrscheinlich von *X. maculatus* stammt, und dass möglicherweise nur der Makromelanophoren-Locus *Sd* gegen den Makromelanophoren-Locus *Li* ausgetauscht worden ist.

Für die Deletionsmutante ***Dr*** wurden 4 Weibchen gemeinsam untersucht; sie zeigten eindeutig die *Bam*HI-Fragmente von 2,3 und 7,2 kb (Ergebnis nicht gezeigt), die auch in den Wildtyp-Populationen von *X. maculatus* aus dem Rio Jamapa nachgewiesen wurden. 15 Tiere der 10. Rückkreuzung (F₁₁R) wurden einzeln untersucht (siehe Tab. 9, S. 145; Abb. 47, S. 142): 11 der Fische hatten die PS-*Xi-X*-Fragmente zusätzlich zu den HS-Fragmenten im Genom, die restlichen 4 Fische zeigten nur die HS-Fragmente. Dieses ergibt einen Anteil rekombinanter Chromosomen von 26,7% (4/15), in dieser hohen Rückkreuzungsgeneration eine eindeutige Kopplung von *Xi-X* mit *Dr* entsprechend.

Für die Deletionsmutante ***Br*** wurde nur 1 Fisch der ersten Rückkreuzung untersucht; er zeigte die PS-Fragmente von 2,3 und 7,2 kb, die auch in der parentalen *X. maculatus*-Population aus dem Belize River nachgewiesen wurden (siehe Abb. 45, S. 138).

Die deletierte Form der beiden Pigmentzellloci *ArSr*, (***ArSr***)**Del**, vom Y-Chromosom einer *X. maculatus*-Population aus dem Rio Jamapa, wurde in der F₁-Generation untersucht. Die PS-Fragmente von 2,3 und 7,2 kb waren in dem einen untersuchten Genom anwesend (nicht gezeigt).

Diese Analysen zeigen, dass die Deletionsmutanten *Dr* von *DrSd*, *Br* von *BrNi* und (***ArSr***)**Del**, die Deletion der beiden Pigmentzellloci *ArSr*, alle die gleichen *Xi-X* Fragmente, die auch in den nicht-deletierten Formen der Chromosomen observiert

ERGEBNISSE

wurden, noch besitzen: Die Deletionsvorgänge sind wieder Ereignisse, die sich distal von *Xi-X* abgespielt haben.

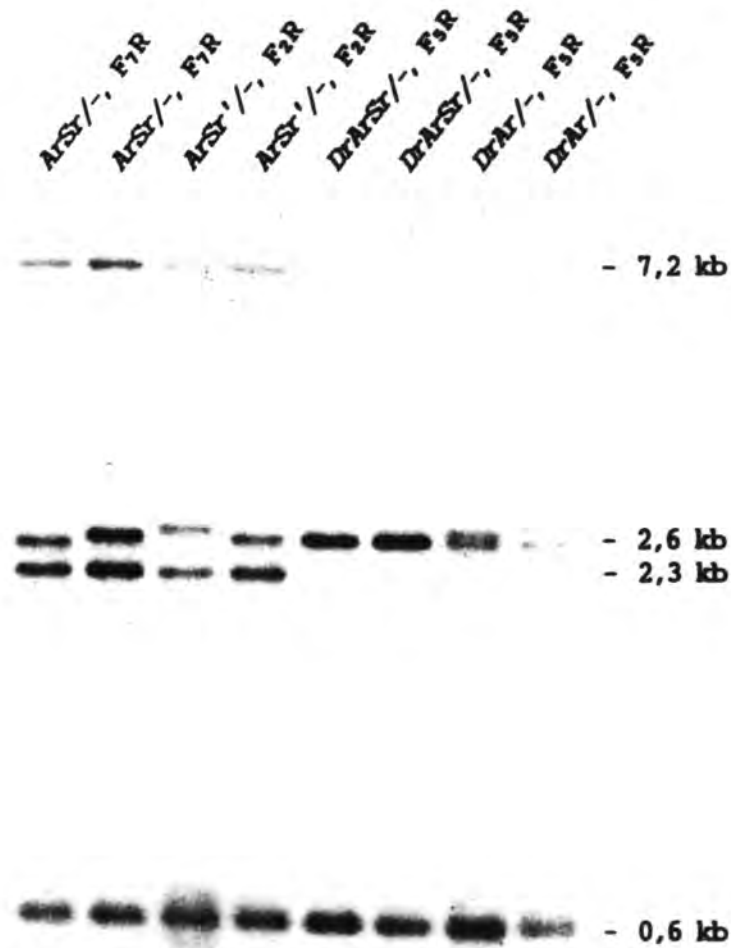


Abb. 46

Die Vererbung der *X. maculatus*-spezifischen *Xi-X*-Fragmente in Rückkreuzungsbastarden mit den Phänotypen *ArSr*, *ArSr'*, *DrArSr* bzw. *DrAr*.

Die Fische wurden als Einzelindividuen untersucht, die DNA mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit *Xi-X_C* hybridisiert.

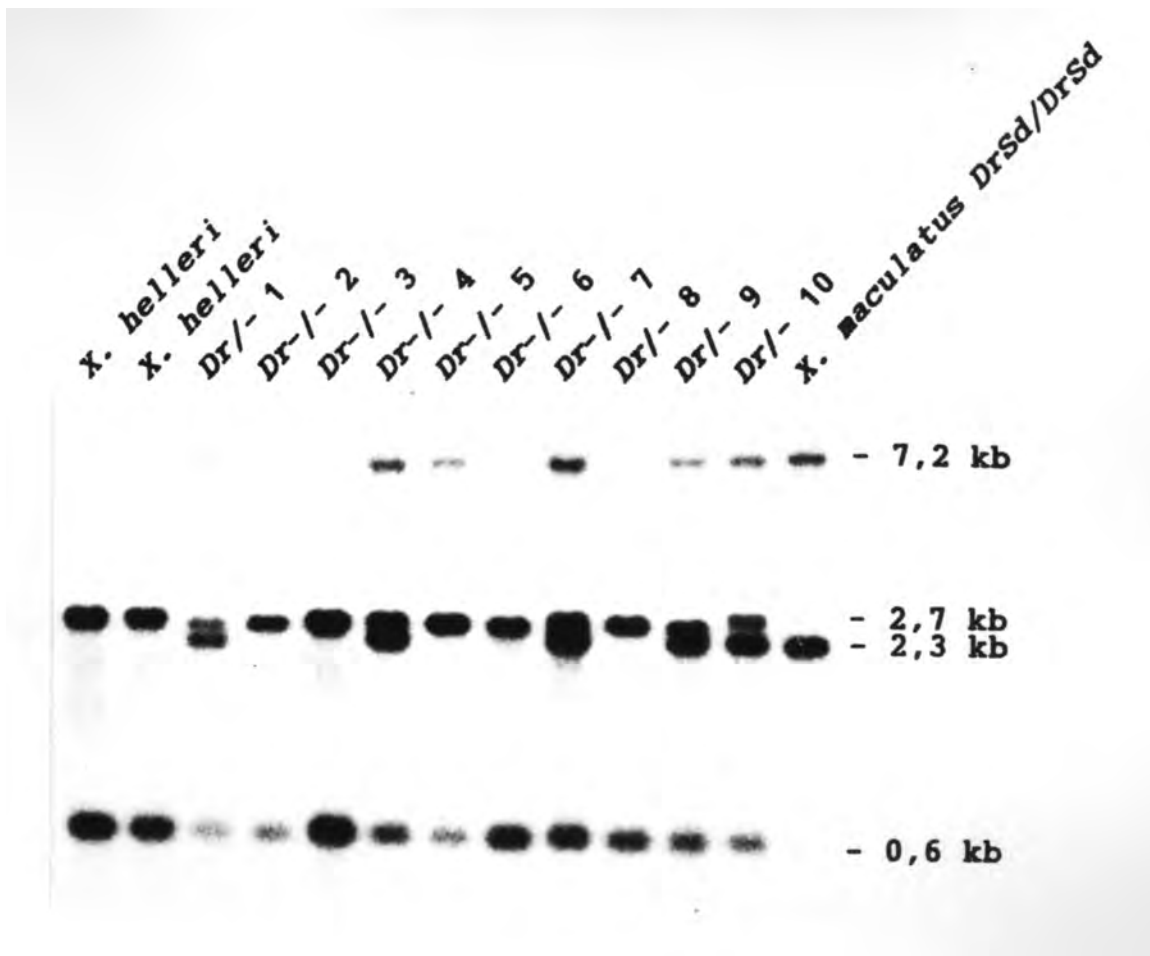


Abb. 47

Die Vererbung der *X. maculatus*-spezifischen *Xi-X*-Fragmente in Rückkreuzungsbastarden mit dem Phänotyp *Dr*.

Die Fische wurden als Einzelindividuen untersucht, die DNA mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit *Xi-X_C* hybridisiert.

Die Untersuchungen der *Xi-X*-Fragmente an Rückkreuzungsbastarden der Translokationsmutante *Sd^T* zeigten, dass die PS-*Xi-X*-Fragmente von 2,3 kb und 7,2 kb auf diesem rekombinanten Chromosom in einem hohen Prozentsatz der Tiere vorhanden sind. Gesamtanalysen von 7 Fischen mit benignem Melanom und 10 Fischen mit malignem Melanom wiesen die beiden PS-Fragmente auf, die im Vergleich zu den HS-Fragmenten deutlich schwächer waren (nicht gezeigt). Untersuchungen an 8 Einzelfischen von *Sd^T*, 4 mit benignem und 4 mit malignem Melanom, zeigten, dass 1 bzw. 2 Tiere die *Xi-X*-Fragmente spezifisch für *X. maculatus* besitzen (siehe Abb. 48, S. 144), eine Platy-Organisation in insgesamt 38% (3/8) der Fische ausmachend. Rückkreuzungsbastarde in der 4.-6. Generation (F₅R-F₇R) wurden untersucht. Diese Kopplung von PS-*Xi-X* mit *Sd* in der Mutante *Sd^T* entspricht etwa der Kopplung, die für *DrSd* gefunden wurde (siehe Tab. 10, S. 146). Die Ergebnisse zeigen, dass das *Sd^T*-Chromosom auch andere platyspezifischen Regionen außer dem *Sd*-Locus besitzt. Dieses

war sehr unerwartet, denn es wurde angenommen, dass der Translokationsprozess zwischen den Loci *Dr* und *Sd* stattgefunden hatte, und dass *Sd* an ein autosomales Chromosom von *X. helleri* überführt worden war. Rückkreuzungsbastarde mit *Sd^T* sollten damit keine anderen PS-Bereiche der Geschlechtschromosomen besitzen. Eine mögliche Erklärung des Auftretens von PS-*Xi-X*-Fragmenten in Rückkreuzungsbastarden mit dem Phänotyp *Sd^T* besteht darin, dass keine Translokation stattgefunden hat, sondern, dass das Chromosom als solches erhalten ist und nur die *Dr*-Funktion durch eine Mutation ausgefallen ist. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass zwei Rekombinationsereignisse zwischen *Xi-X* und *Sd* stattgefunden haben: Die Pigmentzellloci *DrSd* wurde im ersten Rekombinationsereignis auf ein autosomales Chromosom von *X. helleri*, wahrscheinlich das zu dem X-Chromosom von *X. maculatus* homologe Chromosom, übertragen. In einem zweiten Rekombinationsereignis wurde ausschließlich der *Sd*-Locus auf das X-Chromosom zurücktranslotiert.

Einen doppelten Austausch ist für den Genotyp *DrSd^{rec}* vermutet worden, hier sind die beiden Pigmentzellloci wieder vereint und vorhanden. 10 Rückkreuzungsbastarde von *DrSd^{rec}* mit malignem Melanom wurden zusammen untersucht und zeigten die PS-*Xi-X*-Fragmente von 2,3 und 7,2 kb in einer gleichen Intensität, wie die ebenso vorhandenen HS-*Xi-X*-Fragmente (nicht gezeigt). Anscheinend besitzen alle Individuen dieser Rückkreuzung von *DrSd^{rec}* die PS-*Xi-X*-Fragmente, die für das Wildtyp-Chromosom *X^{DrSd}* charakteristisch sind.

Zelllinien

Die Zelllinie **PSM**, die von Tumorgewebe eines F₁-Hybrids von *X. maculatus DySp* mit *X. helleri* angelegt worden ist, zeigte *Bam*HI-Fragmente von 2,45, 2,65 und 7,2 kb (nicht gezeigt). Hiermit fehlten die erwarteten Fragmente von 2,3 kb von *X. maculatus DySp* und 0,6 kb von *X. helleri*, dafür ist ein neues Fragment von 2,45 kb aufgetreten. Vermutlich sind diese untypischen Befunde u.a. auf zellkulturbedingte Artefakte zurückzuführen (siehe auch S. 148).

Die Zelllinie **A₂** stammt aus Embryonen von *X. xiphidium*. Die Banden, observiert in einem *Bam*HI-Verdau, sind von 2,70, 0,7 und 0,6 kb Länge (nicht gezeigt). In der reinen *X. xiphidium* Art (siehe S. 117) traten Fragmente von 2,40 und 7,2 kb auf (nicht gezeigt). Die Differenzen zwischen dem Wildtyp und die Embryonen beruhen eventuell darauf, dass die Embryonen Bastarde von *X. xiphidium* mit *X. helleri* sind, und dass die *X. xiphidium*-spezifischen *Xi-X*-Fragmente mit denen von *X. helleri* durch Rekombinationsereignisse verlorengegangen sind.

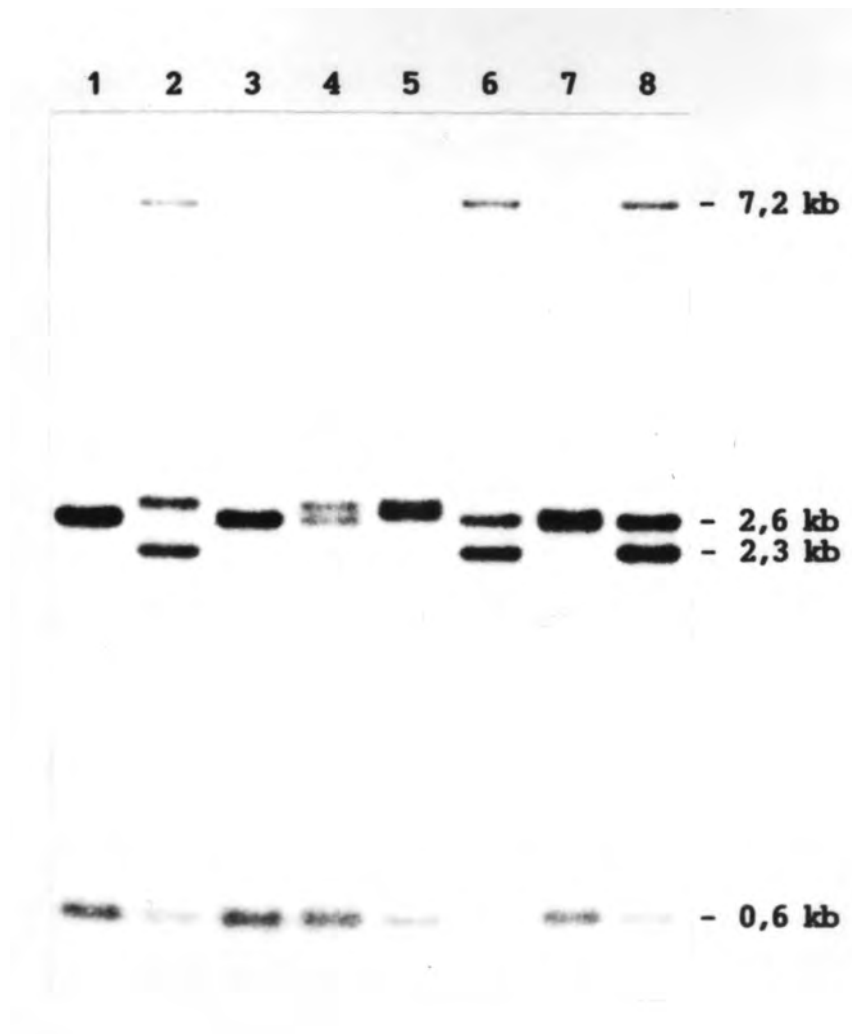


Abb. 48

Vererbung der *X. maculatus*-spezifischen *Xi-X*-Fragmente in Rückkreuzungsbastarden der Translokationsmutante *Sd^T* mit *X. helleri*.

Einzelindividuen wurden untersucht. Die DNA wurde mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit *Xi-X_C* hybridisiert. Die Bastarde 1-4 besaßen ein benignes und die Bastarde 5-8 ein malignes Melanom.

ERGEBNISSE

Tab. 9

Die Vererbung der platyspezifischen Pigmentzellmuster und Xi-X-Fragmente in Rückkreuzungsbastarden mit *X. helleri*, wobei die DNA aus einzelnen Fischen isoliert wurde.

A) Wildtyp-Pigmentzellmuster, B) Pigmentzellmuster-Mutanten.

* Für *X. helleri*, dem die PSP-Loci fehlen, wird die den PSP-Loci entsprechende Lokalisation auf den homologen Chromosomen von *X. helleri* angegeben.

x/n: n ist die Gesamtzahl der untersuchten Fische, x der Anteil der Fische, die ein rekombinantes Chromosom aufweisen.

PSPM: platyspezifisches Pigmentzellmuster

PSP: platyspezifische Pigmentzellen

| | Pigmentzell- muster (PSPM) | Rück- kreuzung F _n R | Vererbung des PSPMs | | Rekombination PSP-Loci [*] /Xi-X | |
|-------------|----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|-----|--|------|
| | | | - + | | x/n | % |
| A | <i>DrSd</i> | F ₂ R | - | | 5/30 | 14,5 |
| | | | + | | 4/32 | |
| | | F ₄ R | - | | 1/19 | 5,3 |
| | | | + | | 27/44 | 61,4 |
| | <i>ArSr</i> | F ₂ R | - | | 1/2 | 25 |
| | | | + | | -/2 | |
| | F ₇ R | + | | -/2 | - | |
| | | | | | | |
| <i>YeLi</i> | F ₂₈ R | + | | 1/2 | 50 | |
| | | | | | | |
| | F ₂₉ R | - | | 1/6 | 16,7 | |
| | | + | | 5/6 | 83,3 | |
| <i>BrNi</i> | F ₂ R | - | | -/3 | 16,7 | |
| | | + | | 1/3 | | |
| B | <i>ArSr'</i> | F ₂ R | + | | -/2 | - |
| | <i>Dr</i> | F ₁₁ R | + | | 4/15 | 26,7 |
| | <i>Sd^T</i> | F ₅₋₇ R | + Ben + Mal | | 3/4 2/4 | 62,5 |

ERGEBNISSE

Tab. 10

In verschiedenen Rückkreuzungsgenerationen (F_nR) von PSPM-tragenden Fischen mit *X. helleri* die erwartete (in %) A) gleichzeitige Vererbung der PSPM und PS-*Xi-X*-Fragmente bei einer autosomalen Lokalisation von *Xi-X* („Ohne Kopplung“) und B) Häufigkeit von Nachkommen mit einem rekombinanten Geschlechtschromosom der Platyfische bei einer Kopplung der PSPM und *Xi-X* von 15 cM.

| Generation | A) Ohne Kopplung | B) 15cM Kopplung: | |
|-------------------|------------------------|-------------------|---------------|
| | | PSPM-freie | PSPM-tragende |
| F ₁ | 100 | - | - |
| F ₂ R | 50 | 15 | 15 |
| F ₃ R | 25 | 12,8 | 27,8 |
| F ₄ R | 12,5 | 10,8 | 38,6 |
| F ₅ R | 6,3 | 9,2 | 47,8 |
| F ₆ R | 3,1 | 7,8 | 55,6 |
| F ₇ R | 1,6 | 6,7 | 62,3 |
| F ₈ R | 8 x 10 ⁻¹ | 5,7 | 68,0 |
| F ₉ R | 4 x 10 ⁻¹ | | |
| F ₁₀ R | 2 x 10 ⁻¹ | | |
| F ₁₁ R | 1 x 10 ⁻¹ | | |
| F ₁₂ R | 5 x 10 ⁻² | | |
| F ₁₃ R | 2,5 x 10 ⁻² | | |
| F ₁₄ R | 1,3 x 10 ⁻² | | |
| F ₁₅ R | 6 x 10 ⁻³ | | |
| F ₁₆ R | 3 x 10 ⁻³ | | |
| F ₁₇ R | 1,5 x 10 ⁻³ | | |
| F ₁₈ R | 8 x 10 ⁻⁴ | | |
| F ₁₉ R | 4 x 10 ⁻⁴ | | |
| F ₂₀ R | 2 x 10 ⁻⁴ | | |
| F ₂₁ R | 1 x 10 ⁻⁴ | | |
| F ₂₂ R | 5 x 10 ⁻⁵ | | |
| F ₂₃ R | 2,5 x 10 ⁻⁵ | | |
| F ₂₄ R | 1,3 x 10 ⁻⁵ | | |
| F ₂₅ R | 6 x 10 ⁻⁶ | | |
| F ₂₆ R | 3 x 10 ⁻⁶ | | |
| F ₂₇ R | 1,5 x 10 ⁻⁶ | | |
| F ₂₈ R | 8 x 10 ⁻⁷ | | |
| F ₂₉ R | 4 x 10 ⁻⁷ | | |
| F ₃₀ R | 2 x 10 ⁻⁷ | | |

Abweichungen der erwarteten Xi-X-Organisation und des Xi-X-Erbgangs in Bastarden von Xiphophorus

In einigen Individuen der untersuchten Bastarde von *Xiphophorus* wurde eine *Xi-X*-Organisation beobachtet, die in der parentalen Generation nicht ausfindig gemacht werden konnte. Auch eine untypische, relative Vererbung der PS- und HS-Fragmente kam in einigen Bastarden zum Vorschein. Dieses trat trotz der stabilen Erscheinung der *Xi-X*-Fragmente in den parentalen Wildtyp-Genomen auf (siehe S. 109ff.). Diese Ergebnisse stellen ein Beispiel für die genetische Instabilität interspezifischer Genome dar.

X- und Z-Chromosom von *X. maculatus*

Für die Vererbung der X-Chromosomen, die die Pigmentzellloci *DrSd* tragen, wurden 125 Rückkreuzungsbastarde mit *X. helleri* als Einzelindividuen untersucht. Von den 62 untersuchten Fischen der ersten Rückkreuzungsgeneration (F₂R) hatten 33 Individuen die PS-Fragmente geerbt. Einer dieser Tiere zeigte ein unerwartetes Muster der Vererbung (siehe Abb. 42, S. 133; Fisch 25); bei diesem Tier waren nur die PS-*Xi-X*-Fragmente zu beobachten, die beiden HS-*BamHI*-Fragmente fehlten. Wie im letzten Abschnitt erwähnt (S. 123), müssten die HS-*Xi-X*-Fragmente im Genom aller Bastarde, die durch Kreuzungen mit *X. helleri* entstanden sind, vorhanden sein. Von den 63 untersuchten Fischen in der F₄R-Generation hatten 18 Individuen die PS-Fragmente geerbt. Die strangabwärtsliegenden 0,6 kb HS-Fragmente fehlten bei zwei von diesen Individuen, die strangaufwärtsliegenden *BamHI*-Fragmente von *X. helleri* waren noch in den Genomen vorhanden (nicht gezeigt). Bei einem der Tiere wurde das Fehlen des 0,6 kb-Fragments mit dem Auftreten eines neuen Fragments von ca. 3,5 kb gefolgt. Einer von zwei untersuchten F₁-Bastarden von *DrSd* zeigte zusätzlich zu den beschriebenen PS- und HS-*Xi-X*-Fragmenten ein Fragment von ca. 1,0 kb (nicht gezeigt). Alle Fische mit *DrSd*, die einen unerwarteten Erbgang der *Xi-X*-Fragmente aufwiesen, besaßen ein benignes Melanom.

Von 15 Rückkreuzungsbastarden der 10. Generation mit *Dr* (F₁₁R) konnte in einem der 11 untersuchten Individuen mit geerbten PS-Fragmenten ein Fehlen des PS-Fragments von 2,3 kb, aber trotzdem die Anwesenheit des 7,2 kb Fragments, beobachtet werden (siehe Abb. 47, S. 142; Fisch 5). Von 8 Einzelindividuen der Mutante *Sd^T* zeigten 3 Fischen die PS-Fragmente, aber kein aberranter Erbgang konnte bei diesen Tieren ausfindig gemacht werden. Von einem Einzelindividuum der F₁-Generation und zwei Einzelindividuen der F₂R-Generation von *BrNi*, die die PS-*Xi-X*-Fragmente geerbt hatten, fehlte bei einem Individuum die beiden HS-Banden (siehe Abb. 45, S. 138; Fisch *BrNil-2*). Für Rückkreuzungsbastarde mit den Pigmentzellloci *Dr* bzw. *BrNi* kann über die Kopienzahl der Gene *R_{Diff}* im Genom nicht eindeutig geurteilt werden.

Von den insgesamt 67 Bastarden, die von Kreuzungen von Fischen mit den PSP-Loci *DrSd* oder von deren mutierten Pigmentzellmuster-Phänotypen *Dr* und *Sd^T* ausgingen und die PS-Fragmente geerbt hatten, zeigten 5 der Tiere einen untypischen Erbgang der *Xi-X*-Fragmente (7,5%). Werden die Bastarde von *BrNi* mit einbezogen, zeigten 6 von 70 Fischen (8,6%) einen aberranten Erbgang. Hiervon waren 5 mit einem Verlust von spezifischen Fragmenten und zwei mit dem Auftreten von neuen Fragmenten verbunden. Keiner der 87 Bastarde, die ausschließlich HS-Fragmente geerbt hatten, zeigten

Aberrationen; sie besaßen alle die beschriebenen 5'- und 3'-spezifischen *Bam*HI-Fragmente von *X. helleri*. Es scheint, als ob das parallele Vorkommen der PS- und HS-*Xi-X*-Fragmente in einem Individuum gewisse Probleme bereitet, die durch abnormale Rekombinationsereignisse versuchsweise gelöst werden.

In Gesamtanalysen der Rückkreuzungsbastarde konnte auch, wie für Analysen an einzeln untersuchten Individuen (siehe oben), ein Verlust der HS- im Vergleich zu den PS-Fragmenten beobachtet werden. Dieses Phänomen ist besonders für die Rückkreuzungsbastarde (F₂R) von *DrLi* mit malignem Melanom (*DrLi*/-, -/-; n=9) deutlich zu beobachten; die Banden von *X. helleri* sind nur sehr schwach ausgeprägt (siehe Abb. 40, S. 129). Hier hat sehr wahrscheinlich ein Austausch der HS-Fragmente mit den PS-Fragmenten stattgefunden; diese Rekombinationen müssten in vielen, vielleicht 7 oder 8, der 9 untersuchten Fische stattgefunden haben. Merkwürdig ist jedoch, dass die F₂R-Bastarde, die benigne Melanome haben, keinen relativen Verlust der HS-*Xi-X*-Fragmente aufweisen, was für unabhängige Rekombinationsereignisse in den Genomen von Fischen, die ein malignes Melanom entwickeln, spricht. Diese Häufung des abnormalen Erbgangs in Rückkreuzungsbastarden mit malignen Melanomen steht im Kontrast zu den Befunden für die Aberrationen in Einzelindividuen von *DrSd*, die alle ein benignes Melanom besaßen (siehe oben). Eine relativ häufigere Anwesenheit der PS-Fragmente gegenüber den HS-Fragmenten kann auch in den Rückkreuzungsbastarden von *DrSd* mit malignen Melanomen (*DrSd*/-, -/-, n=9; siehe Abb. 38; S. 127) im Gegensatz zu den Geschwistern mit gutartigem Melanom (*DrSd*/-, *Diff*/-; n=10) beobachtet werden. In den F₁-Bastarden von *DrLi* (n=5, siehe Abb. 40, S. 129) und *BrNi* (n=5; siehe Abb. 39B, S. 128) sowie in Rückkreuzungsbastarden von und mit *BrNi*^e (F₂R, n=4; siehe Abb. 39B, S. 128) ist ein relativer Verlust an HS-Banden ebenso zu beobachten. Eine eventuelle Bedeutung des Gens *R_{Diff}* für die Rekombinationsvorgänge wird in der Diskussion angesprochen (siehe S. 255ff.).

Für die PSM-Zellen sind auch abweichende *Xi-X*-Fragmente zu beobachten: *Bam*HI-Fragmente von 2,45, 2,65 und 7,2 kb treten auf (nicht gezeigt). Das Fragment von 2,3 kb, das für *DrSd* charakteristisch ist, fehlt. Dafür ist ein Fragment von 2,45 kb zusätzlich zu dem 7,2 kb PS-Fragment vorhanden. Von den HS-Fragmenten ist nur das 5'-liegende *Bam*HI-Fragment von 2,65 kb anwesend, das 3'-liegende 0,6 kb Fragment fehlt. Die genetischen Aberrationen dieser Zelllinie stimmen mit den Typen observierter Aberrationen, die in den untersuchten Fischen beobachtet werden konnte, überein. Die Hybridisierungssignale der drei Fragmente haben alle eine gleiche Intensität, für das Vorkommen dieser Fragmente in allen Zellen der Zellkultur sprechend.

Y-Chromosom von *X. maculatus*

Es scheint, als ob die *Xi-X*-Fragmente der Y-Chromosomen mit den Pigmentzellloci *ArSr* bzw. *ArSr'* in Bastarden mit *X. helleri* besonders instabil sind. In der parentalen Generation, insgesamt für 6 Einzelindividuen untersucht, wurden keine abnormale *Xi-X*-Struktur beobachtet (siehe S. 110). Auch nicht in einer Gesamtisolation von 14 Männchen des Phänotyps *DrLi/ArSr'* wurden aberrante *Xi-X*-Fragmente beobachtet (siehe S. 139). Jeweils zwei Einzelindividuen von Rückkreuzungsbastarden mit *ArSr*

(F₇R) und *ArSr'* (F₂R) zeigten ebenfalls die erwartete *Xi-X*-Organisation (siehe Abb. 46, S. 141).

Im Gegensatz dazu wiesen 4 Einzelindividuen der *ArSr*-Bastarde, 1 der F₁-Generation und 3 der ersten Rückkreuzungsgeneration (F₂R), PS-Fragmente von 2,5 kb und 7,2 kb (nicht gezeigt) zusätzlich zu den HS-Fragmenten auf; das 2,3 kb Fragment von *X. maculatus* fehlte. Die Tiere der F₂R-Generation waren Geschwister, und möglicherweise hat einer der Vorfahren diese beobachtete Mutation schon im Genom gehabt; vielleicht stammen sie aus dem untersuchten F₁-Bastard. Ein weiterer Geschwister, der kein PSPM geerbt hatte, besaß keine PS-Fragmente.

Eine Gesamtanalyse von 5 *ArSr*-Männchen (F₇R) zeigte zusätzlich zu den beschriebenen PS- und HS-Fragmenten ein *Bam*HI-Fragment von ca. 4,7 kb und ein *Hind*III-Fragment von ca. 4,8 kb (nicht gezeigt). Es ist unmöglich zu beurteilen, ob diese Fragmente von den *X. maculatus*- oder *X. helleri*-Chromosomen abstammten, denn alle erwarteten *Xi-X*-Fragmente sind vorhanden und haben etwa die gleiche Intensität. Diese mögliche Neumutation kann in einer früheren Kreuzungsgeneration aufgetreten sein und hat sich in mehreren Fischen der Nachkreuzungsgeneration durchgesetzt. Außerdem sind die untersuchten Fische nach der 6. Rückkreuzung untereinander gekreuzt worden.

Auch die Gesamtanalyse von 8 Fischen mit *ArSr'/ArSr'* (nicht gezeigt) zeigt zusätzlich zu den 2,3 und 7,2 kb *Bam*HI-Banden eine *Bam*HI-Bande von ca. 2,5 kb. *Hind*III-verdaute DNA von *ArSr'/ArSr'* zeigte das 8,5 kb Fragment, das in den meisten Fischen vorkommt, und zusätzlich Fragmente von 6,2 und 5,5 kb. Das 2,5 kb *Bam*HI-Fragment und das 5,5 kb *Hind*III-Fragment, die beide sowohl in dem DNA-Isolat der *ArSr'/ArSr'*-Individuen als auch in den einzeln untersuchten Bastarden der F₁R- und F₂R-Generation (siehe oben) auftreten, entsprechen den Fragmentlängen, die in der *X. maculatus*-Population aus dem Belize River observiert wurden. Im Gegensatz zu den Fragmenten der Population aus dem Belize River, die auch in der parental Generation vertreten sind, tauchen sie bei *ArSr* bzw. *ArSr'* erst in den Bastarden auf. Das *Hind*III-Fragment von 6,2 kb wurde in keinem anderen untersuchten Phänotyp der Fische beobachtet.

Wegen der Analysen von DNA-Gesamtisolaten aus mehreren Fischen ist es schwer zu beurteilen, ob spezifische Fragmente verlorengegangen sind. Deutlich ist, dass das Neuaufreten von neuen Fragmentenlängen für die Bastarde mit einem Y-Chromosom besonders charakteristisch ist. Dieses steht im Kontrast zu den Bastarden mit X- bzw. Z-Chromosomen, die nur selten neue Banden aufweisen (in 2 von 70 Tieren) und vorwiegend durch das Fehlen von spezifischen Fragmenten charakterisiert sind.

X-Chromosom von *X. variatus*

Die 4 einzeln untersuchten *X. variatus*-Individuen zeigten *Bam*HI-Fragmente von ca. 2,55 und 7,2 kb (siehe Abb. 43, S. 135; Abb. 44, S. 136). Die Rückkreuzungsbastarde (F₂gR), die das 7,2 kb geerbt hatten, besaßen *Bam*HI-Fragmente von 2,60 und 2,70 kb zusätzlich zu dem 0,6 kb Fragment von *X. helleri*; das 2,55 kb Fragment, spezifisch für *X. variatus* ist nicht zu beobachten (siehe Abb. 43, S. 135). Ein Rekombinationsereignis hat möglicherweise stattgefunden, das das 2,55 kb Fragment von *X. variatus* gegen das 2,60 kb oder 2,70 kb Fragment von *X. helleri* ausgetauscht hat. Die 3'-Fragmente blieben

unverändert. Es ist nicht auszuschließen, weil nur 4 Individuen der parentalen Art untersucht wurden, dass die längeren Fragmente auch in den Wildtyparten vertreten sind. Für die Vererbung der PS-*Xi-X*-Fragmente in den Rückkreuzungsbastarden wurde Gewicht auf das 7,2 kb Fragment gelegt (siehe S. 134).

***X. helleri*-spezifische *Xi-X*-Fragmente**

In den Bastarden und Rückkreuzungsbastarden von *X. maculatus* mit *X. helleri* konnte häufig ein Verlust von *X. helleri*-spezifischen *Xi-X*-Fragmenten beobachtet werden (siehe S. 147-148). Dieser Verlust war auffallend häufig in Fischen mit einem malignen Melanom zu beobachten, was in vergleichenden Gesamtanalysen von Geschwistern mit Melanomen unterschiedlicher Malignität deutlich hervortrat. Eine mögliche Bedeutung vom Gen *R_{Diff}* bei den genetischen Umordnungen wird in der Diskussion erörtert (siehe S. 255ff.).

Ein anderes Phänomen, dass in den Rückkreuzungsbastarden beobachtet wurde, ist das Auftreten eines Fragments von ca. 2,80 kb, das in den 20 untersuchten Einzelindividuen von *X. helleri* aus dem Rio Lancetilla nicht auffindig gemacht werden konnte. Dieses Fragment wurde in den Bastarden relativ häufig angetroffen und kann z.B. bei den Rückkreuzungsbastarden mit *DrSd* (siehe Abb. 38, S. 127), *BrNi* (siehe Abb. 45, S. 138) und *DrAr* (siehe Abb. 46, S. 141) beobachtet werden. In der Wildtyp-Population von *X. helleri* aus dem Rio Jamapa besaß eins der zwei untersuchten Individuen das 2,80 kb-Fragment. Das Auftreten dieser *X. helleri*-Bande kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass diese Organisation auch in der parentalen Generation von *X. helleri* aus dem Rio Lancetilla vorkommt, aber mit diesen 20 untersuchten Individuen nicht erfasst wurde. Vielleicht ist die *Xi-X*-Region von *X. helleri* in den Bastarden instabil, und verschiedene, eventuell spezifische, Rekombinationsereignisse produzieren *Bam*HI-Fragmente dieser neuen Länge.

C-6) CHARAKTERISIERUNG DER SEQUENZ POLY(GTCT/GACA) IM GENOM VON XIPHOPHORUS

Die Sequenz Poly(GTCT), oder die homologe Sequenz Poly(GACA), wie sie in der Literatur bezeichnet wird, liegt repetitiv vor: Einerseits ist die Einheit GTCT in einer direkten Wiederholung organisiert, wobei sie in *Xi-X* in 15 vollständigen Kopien vorliegt, (GTCT)₁₅. Andererseits ist die Poly(GTCT)-Einheit vielfach im Genom präsent.

Die Sonden von *Xi-X*, die die Sequenz Poly(GTCT/GACA) enthalten, ergeben bei Southern Analysen positive *Bam*HI-Fragmente, die sich im Bereich von wenigen hundert Basenpaaren bis zu über 20 kb erstrecken. Die Zahl der erkennbaren Banden liegt bei allen Arten bei mindestens 30. Die Auflösung, besonders im hochmolekularen Bereich, ist zu gering um die genaue Anzahl angeben zu können. Vermutlich ist die Zahl der Poly(GTCT/GACA)-Regionen im Genom viel höher, als in diesen Analysen als distinkte Banden zum Vorschein kommt.

Es gibt zwischen den verschiedenen Arten und Rassen von *Xiphophorus*, nachgewiesen in Southern Analysen mit der Poly(GTCT/GACA)-enthaltenden Sonde *Xi-X_B*, einen ausgedehnten Restriktionsfragment-Längen Polymorphismus (RFLP) (siehe Abb. 49, S. 152). Innerhalb der Rasse von *X. maculatus* aus dem Rio Jamapa ist das Bandenmuster bei allen Individuen konstant (siehe Abb. 50, S. 153). Bei der Rasse von *X. maculatus* aus dem Belize River ist das Bandenmuster der verschiedenen Individuen weitgehend identisch: Auffallend ist eine Bande bei zwei der einzeln untersuchten Individuen und bei einer Gesamtanalyse (n=5); bei diesen DNA-Isolaten, die mit der Gensonde *Xi-X_C* zusätzliche *Bam*HI- und *Hind*III-Fragmente aufweisen (siehe S. 113), wird auch eine zusätzliche Kopie der Poly(GTCT/GACA)-Sequenz detektiert (siehe Abb. 51, S. 154). Bei der *X. helleri*-Population aus dem Rio Lancetilla hat jedes Individuum sein eigenes, charakteristisches Bandenmuster (siehe Abb. 52, S. 155). Somit kann sowohl innerhalb der Art *X. helleri*, als auch zwischen den verschiedenen Arten und Rassen von *Xiphophorus* die Sequenz Poly(GTCT/GACA) als DNA-Sonde für "Fingerprint"-Analysen eingesetzt werden. Das unterschiedliche Bandenmuster der Poly(GTCT/GACA)-hybridisierten Fragmente in Southern Analysen verschiedener Arten, Rassen, Populationen und Individuen von *Xiphophorus* ist ein Parameter für die genetische Diversität, die sich innerhalb der Gattung *Xiphophorus* befindet.

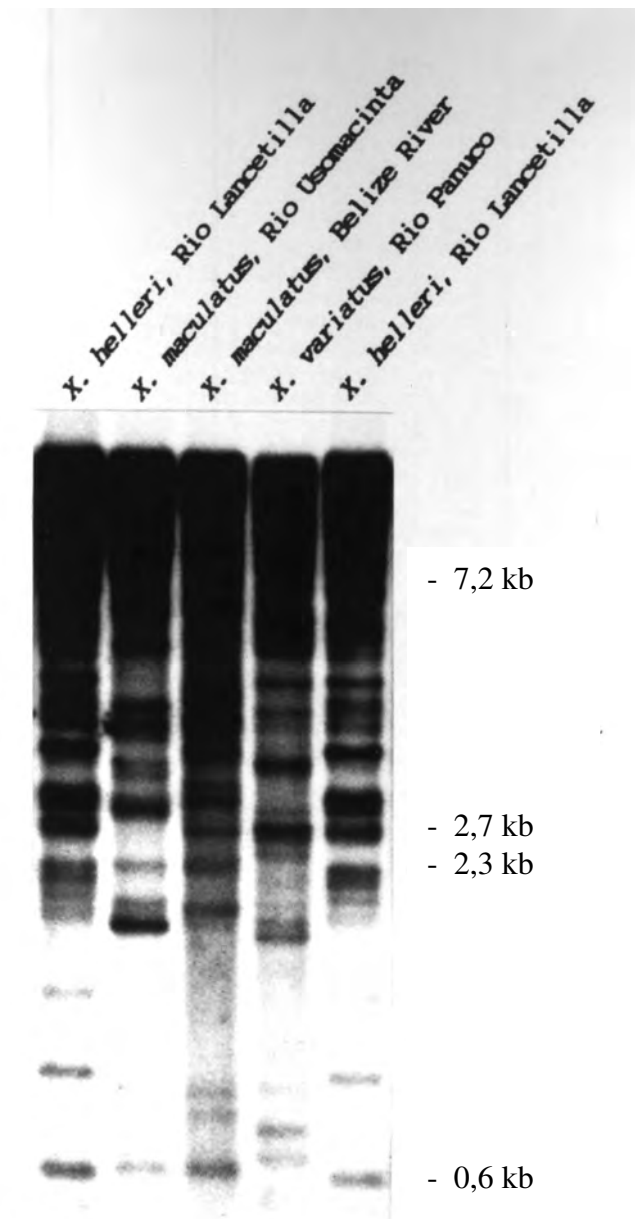


Abb. 49

Southern Analyse der Sequenz Poly(GTCT/GACA) im Genom verschiedener, xiphophoriner Arten und Rassen.

Die Fische wurden als Einzelindividuen untersucht, die DNA mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit der Sonde *Xi-X_B* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Der Southern Filter ist zum Teil mit dem Filter in der Abb. 35 (siehe S. 118) identisch.

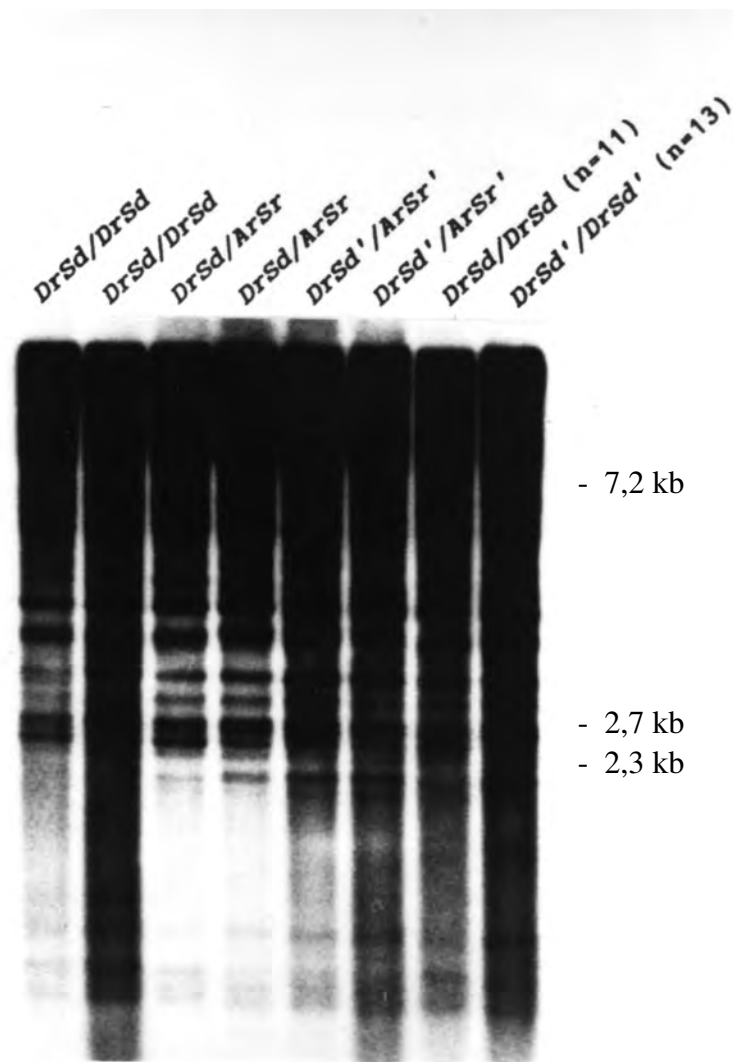


Abb. 50

Southern Analyse der Sequenz Poly(GTCT/GACA) im Genom von *X. maculatus* aus dem Rio Jamapa.

Die DNA wurde mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit der Sonde *Xi-X_B* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. n gibt die Zahl der untersuchten Fische in Gesamtanalysen mehrerer Fische an, die anderen Tiere wurden einzeln untersucht. Der Southern Filter ist zum Teil mit dem Filter in der Abb. 33 (siehe S. 112) identisch.

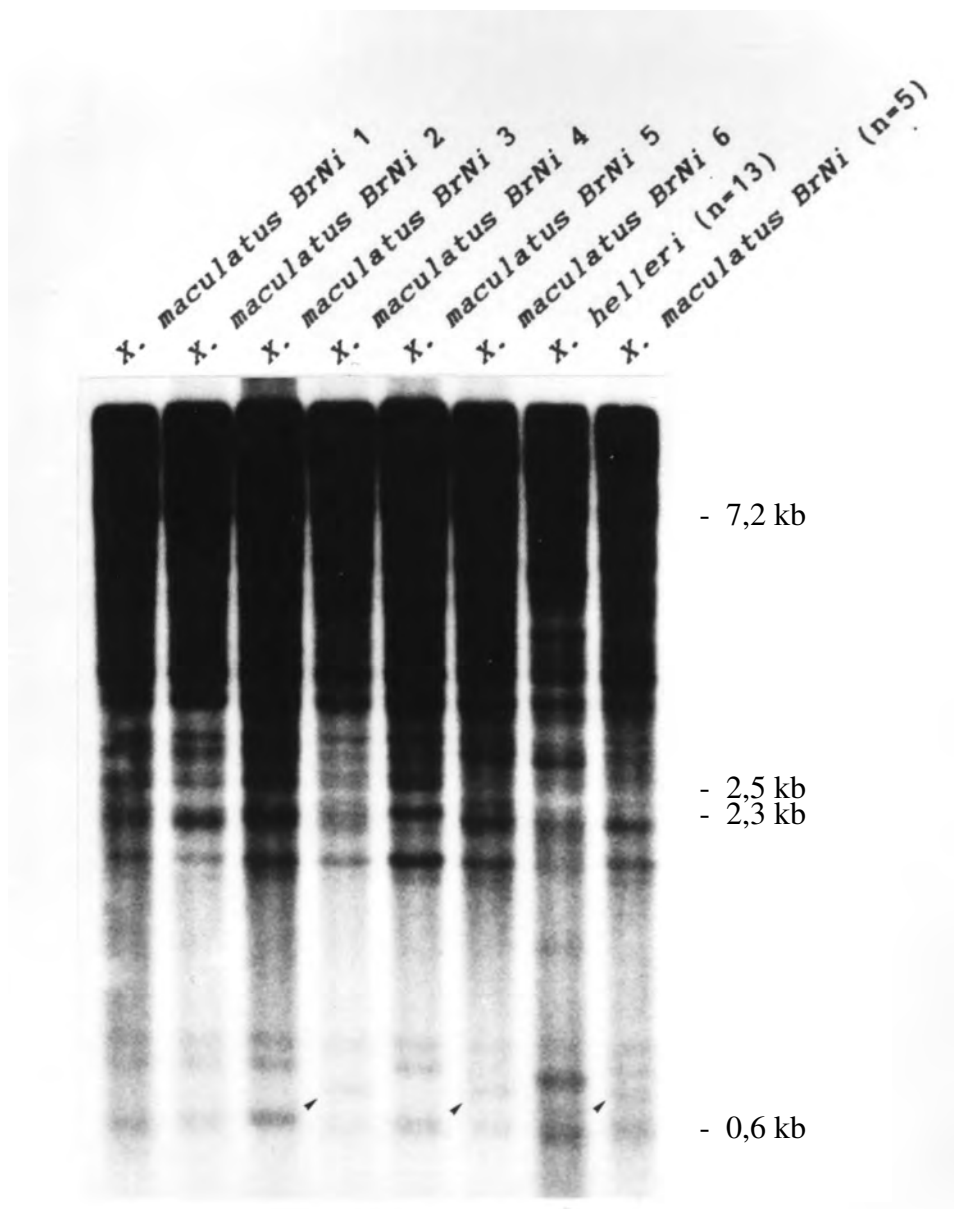


Abb. 51

Southern Analyse der Sequenz Poly(GTCT/GACA) im Genom von *X. maculatus* aus dem Belize River.

Die DNA wurde mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit der Sonde *Xi-X_B* unter stringenten Bedingungen hybridisiert. n gibt die Zahl der untersuchten Fische in Gesamtanalysen mehrerer Fische an, die anderen Tiere wurden einzeln untersucht. Die zusätzlichen Poly(GTCT/GACA)-Banden, die mit den zusätzlichen *Xi-X_B*-Banden von *Bam*HI- bzw. *Hind*III-verdauter DNA bei den Individuen 4 und 6, sowie mit einer Gesamtanalyse mehrerer Fische, korrelieren, werden mit Pfeilen markiert. Der Southern Filter ist zum Teil mit dem Filter in der Abb. 34 (siehe S. 114) identisch.

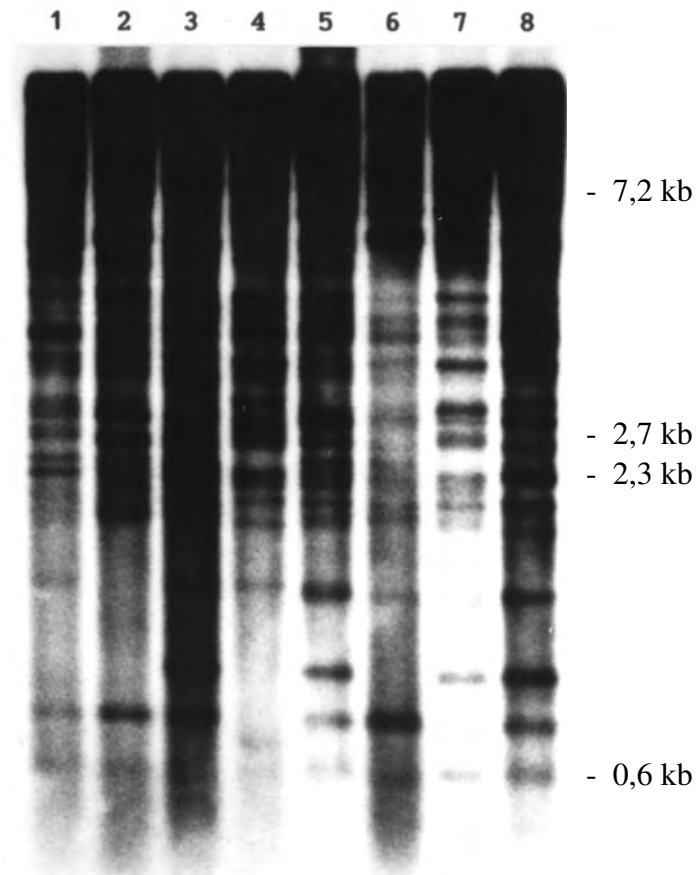


Abb. 52

Southern Analyse der Sequenz Poly(GTCT/GACA) im Genom von *X. helleri* aus dem Rio Lancetilla.

Die Fische wurden als Einzelindividuen untersucht, die DNA mit *Bam*HI geschnitten und der entsprechende Southern Filter mit der Sonde *Xi-X_B* unter stringenten Bedingungen hybridisiert.

C-7) KONSERVIERUNG VON XI-X IN DER EVOLUTION

Die Präsenz homologer Sequenzen in den Genomen von Tieren unterschiedlicher Evolutionsstufen zu verschiedenen Subregionen von *Xi-X* wurde untersucht. Nicht-stringente Hybridisierungs- und Waschbedingungen wurden hauptsächlich für diese Analysen angewandt.

Die Gensonden *Xi-X_A*, *Xi-X_{B-Hom}*, *Xi-X_{B-Spez1}* und *Xi-X_C* detektieren unter stringenten Bedingungen *EcoRI*-Fragmente von 2,5 kb und 2,2 kb bei *X. helleri* bzw. *X. maculatus* (nicht gezeigt). Unter der Anwendung nicht-stringenter Bedingungen kommen Fragmente von 4,3 kb bzw. 4,0 kb für alle Gensonden zusätzlich zum Vorschein (siehe Abb. 53A, S. 157; Abb. 54, S. 158). Vielleicht reflektieren die zusätzlichen, ausschließlich unter nicht-stringenten Bedingungen auftretenden, Fragmente ein zu *Xi-X* nah verwandtes Gen. Alternativ könnten die zusätzlichen Banden partielle Verdauungsprodukte von *Xi-X* entsprechen.

Die Gensonden *Xi-X_{B-Spez1}* (nicht gezeigt) und *Xi-X_C* (siehe Abb. 53, S. 157) konnten nur unter den Zahnkarpfen, Ordnung Atheriniformes, Sequenzen mit hohen Homologien aufdecken. Ein Hybridisierungssignal wurde für die Poeciliidaen, d.h. für die lebendgebärenden Zahnkarpfen, wie *Poecilia sphenops*, *Poecilia reticulata* und *Heterandria bimaculata*, sowie für die eierlegenden Zahnkarpfen *Aplocheilichthys lineatus*, beobachtet. Andere Fischordnungen wie Cypriniformes (karpfenartige), vertreten durch *Cheirodon axelrodi* und *Danio rerio*, Siluriformes (welsartige), vertreten durch *Corydoras paleatus* und Perciformes (barschartige), vertreten durch *Pelvicachromis pulcher*, waren negativ (siehe Abb. 53B, S. 157). Keine der anderen untersuchten Tierarten, weder die, die in der Evolution höher noch die, die in der Evolution niedriger zu den Fischen stehen, zeigten Homologien zu den Subregionen B-Spez1 und C von *Xi-X* (siehe Abb. 53A, S. 157): Genome vom Mensch (*Homo sapiens*), Maus (*Mus musculus*, nicht gezeigt), Schaf (*Ovis ammonis*) und Taube (*Columba livia*) sowie Tintenfisch (*Sepia officinalis*) und Schnecke (*Planorbis corneus*) wurden untersucht. Ob das begrenzte Vorkommen dieser DNA-Region im Tierreich auf eine Funktion hinweist, die ausschließlich bei den Zahnkarpfen in Kraft tritt, verbleibt aufgrund dieser Analysen unbeantwortet. Eine andere Möglichkeit ist, dass die verwendeten Gensonden nur geringfügig konservierte Genregionen enthalten.

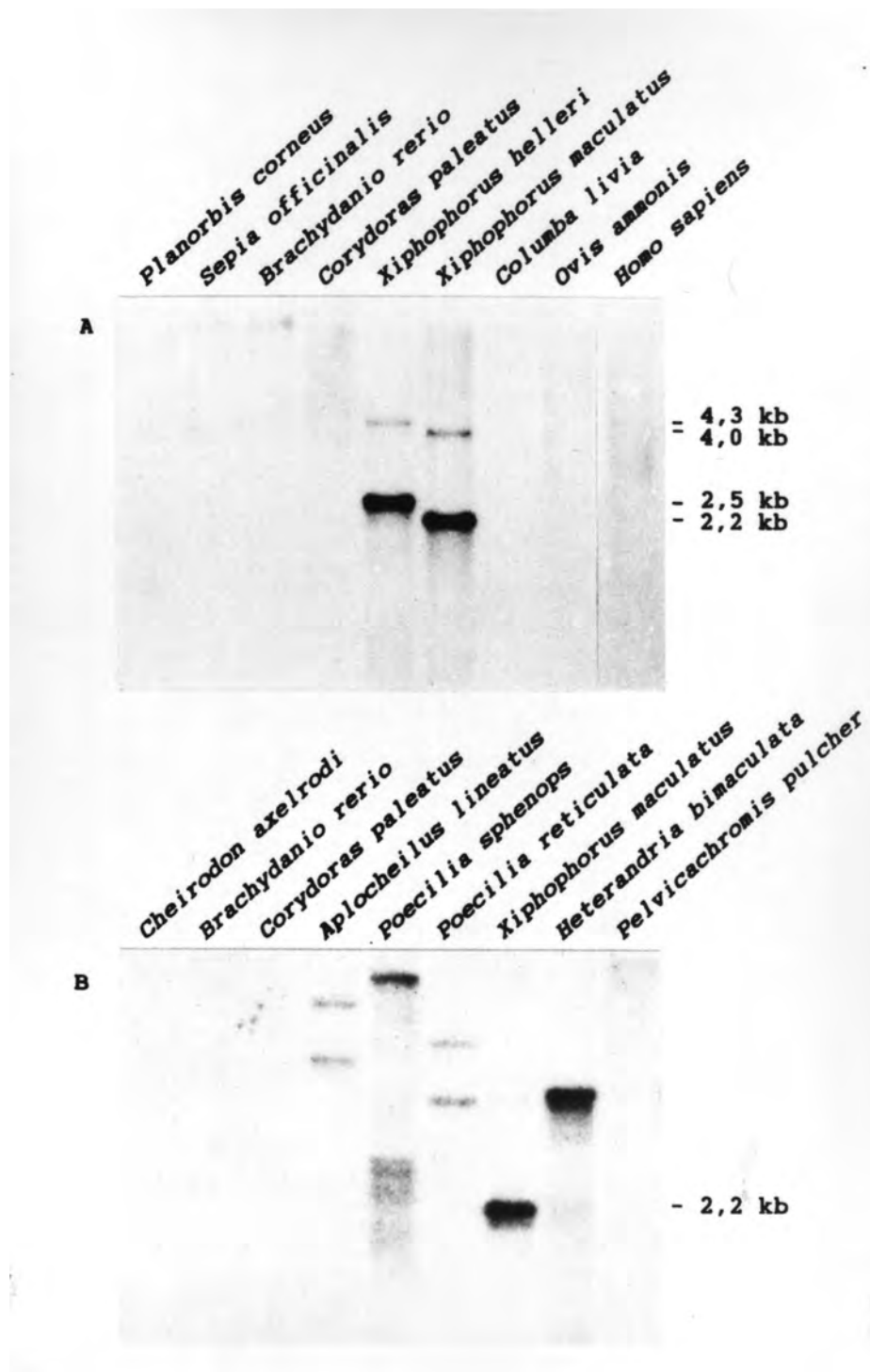


Abb. 53

Das Vorkommen homologer Regionen zu $Xi-X_C$ im Genom von verschiedenen Organismen.

A) Tiere verschiedener Evolutionsstufen. B) Verschiedene Fischarten.

Die DNA wurde mit *EcoRI* geschnitten und unter nicht-stringenten Bedingungen hybridisiert.

ERGEBNISSE

Die Sonde *Xi-X_B-Hom* kann bei Mensch, Schaf und Vogel eine Reihe schwacher Banden detektieren (siehe Abb. 54, unten). Diese Sonde enthält das gut konservierte, letzte Drittel der Homöobox und detektiert damit wahrscheinlich homöobox-enhaltende Fragmente dieser Arten. Die Genome von Schaf und Mensch zeigen auch mit der Gensonde *Xi-X_A* schwache, definierte Banden, die vielleicht auch auf Fragmente homöobox-enhaltender Gene zurückzuführen sind (siehe Abb. 54, unten). Diese Sonde beinhaltet u.a. die restlichen zwei Drittel der Homöobox. Die Bandenmuster, erreicht mit den beiden homöobox-enhaltenden Gensonden, sind, mit der Ausnahme der bekannten *Xi-X*-Fragmente, nicht identisch.

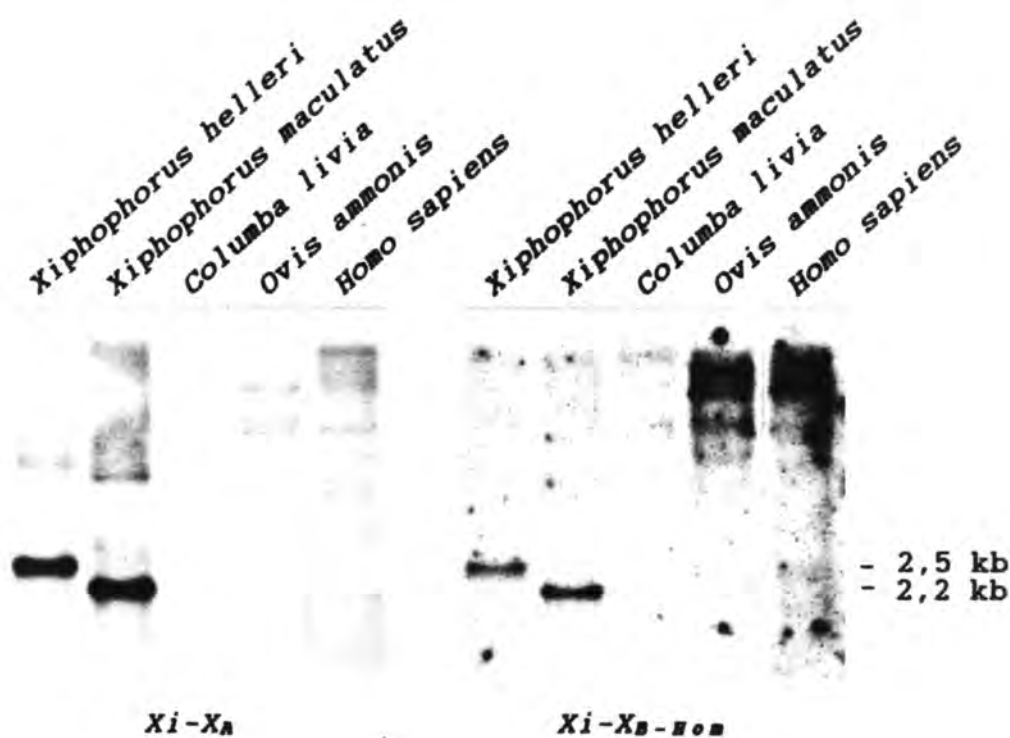


Abb. 54

Das Vorkommen homologer Regionen zu *Xi-X_A* und *Xi-X_B-Hom* in den Genomen von Tieren verschiedener Evolutionsstadien.

Der Southern Filter ist zum Teil mit dem in den Abb. 53A (siehe S. 157) gezeigten identisch. Die Hybridisierungen wurden unter nicht-stringenten Bedingungen durchgeführt.

C-8) FUNKTIONELLES CHARAKTERISIEREN VON XI-X DURCH RNA EXPRESSIONSSTUDIEN

Die Gesamt-RNA wurde von Gewebsextrakten mit Guanidinisothiocyanat über einen CsCl-Gradienten gereinigt und die Poly(A)⁺-RNA mittels Oligo(dT)-Chromatographie angereichert (siehe Methoden S. 59ff.). In einem mit Formaldehyd versetzten Agarosegel wurden die Transkripte elektrophoretisch nach Längen aufgetrennt, die RNA vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (Northern Blot) und die Membran mit geeigneten Gensonden hybridisiert. Wenn nicht anders vermerkt, wurden 20 µg Gesamt-RNA in den Northern Analysen verwendet.

Methodische Aspekte der Expressionsanalysen

Bevor die Xi-X-Expression in den verschiedenen Organen, Gewebearten und Zellen vorgestellt wird, werden einige Aspekte zur Qualität und Quantität der isolierten RNA und die Qualität der Hybridisierungssignale diskutiert. Anschließend an der methodischen Erörterung wird das Expressionsmuster von Aktin, das als Kontrolle für die eben erwähnten Eigenschaften eingesetzt wurde, in den verschiedenen Gewebearten beschrieben.

Qualität und Quantität der gewonnenen Gesamt-RNA

In dieser Arbeit ist die Isolation von hochqualitativer RNA in den meisten Fällen gelungen. Eine Ausnahme stellt die aus Gehirn isolierte RNA dar, die in 3 von 4 Isolationsvorgängen etwas abgebaut war. Möglicherweise ist der Abbau auf eine hohe endogene RNase-Aktivität zurückzuführen, denn die Gewinnung von hochqualitativer RNA aus anderen Organen in denselben Isolationsvorgängen sind mit Erfolg durchgeführt worden, wodurch eine exogene RNase-Kontamination ausgeschlossen ist. Eine andere mögliche Erklärung des RNA-Abbaus ist auf den hohen Fettgehalt im Gehirn zurückzuführen, der möglicherweise die Auftrennung der RNA von der RNase-haltigen Proteinphase im CsCl-Gradienten etwas verhindert.

Quantitativ lag die isolierte RNA in einem großen Schwankungsbereich. Die Werte variierten, je nach Gewebeart, von ca. 20 µg (Skelettmuskulatur) bis 1,5 mg (Leber) RNA aus 0,5 g Gewebe (siehe Tab. 11, S. 160). Für Embryonen war die spezifische Ausbeute der RNA abhängig von den Entwicklungsstadien; Stadium 13 war mit dieser Methode das früheste Entwicklungsstadium, aus dem RNA quantitativ isoliert werden konnte. Die isolierbare RNA-Menge stieg mit den steigenden Entwicklungsstadien.

Qualität und Quantität der isolierten Poly(A)⁺-RNA

Die Poly(A)⁺-RNA wurde von der restlichen RNA mittels Oligo(dT)-Chromatographie getrennt. Dieses war der Fall für RNA, isoliert aus Lebern von *X. helleri*, Weibchen (siehe Abb. 71, S. 201), und aus einer gemeinsamen Extraktion von Lebern einer Reihe von Platyfischen verschiedener Arten und Rassen, ebenso Weibchen (nicht gezeigt). Die Poly(A)⁺-RNA wurde auch aus der Gesamt-RNA von Embryonen der Stadien 22 und 25 von *X. helleri* angereichert (siehe Abb. 71, S. 201).

ERGEBNISSE

Quantitativ ergaben die Isolationsvorgänge 20-30 µg Poly(A)⁺-RNA aus 500-600 µg Gesamt-RNA, d.h. ca. 5% der Gesamt-RNA wurde durch eine zweifache Reinigung über eine Säule mit Oligo(dT)-Cellulose als Poly(A)⁺-angereicherte RNA erhalten. Die isolierte Poly(A)⁺-RNA war während der Isolationsvorgänge intakt verblieben und wies gute Hybridisierungseigenschaften auf.

Tab. 11

Die durchschnittliche, spezifische Ausbeute von Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen, Geweben und Zellen.

* Die RNA-Ausbeute der Embryonen war vom Entwicklungsstadium abhängig.

| Gewebe | µg RNA pro Gramm Gewebe |
|-------------------|-------------------------|
| Skelettmuskulatur | 40 |
| Wirbelsäule | 60 |
| Herz | 700 |
| Darm | 2500 |
| Leber | 3000 |
| Gehirn | 500 |
| Nieren | 2200 |
| Hoden | 1900 |
| Fett | 100 |
| Milz/Pankreas | 1400 |
| Zelllinien | 1200 |
| Kopfreste | 300 |
| Augen | 500 |
| Kiemen | 700 |
| Haut | 250 |
| Flossen | 1100 |
| Melanom, reines | 600 |
| Peritoneum | 200 |
| Embryonen* | 100-800 |

Qualität und Auswertung der Hybridisierungssignale

Bevor die Expressionsergebnisse in den folgenden Abschnitten im Einzelnen vorgestellt werden, sollen in diesem Abschnitt einige Aspekte zu Hybridisierungseigenschaften der Sonden und zur Interpretation der Hybridisierungssignale diskutiert werden.

Es wurden zwei verschiedene Hybridisierungs- und Waschbedingungen verwendet (siehe Methoden S. 62). Für die Sonden $Xi-X_B$ und $Xi-X_B-Rep$, die beide eine repetitive Sequenz enthalten, und Aktin wurden meistens stringente Bedingungen angewandt. Für die Subsonden $Xi-X_A$, $Xi-X_B-Spez1$ und $Xi-X_B-Spez2$ wurden nicht-stringente Bedingungen durchgeführt. Für die Sonden $Xi-X_B-Hom$ und $Xi-X_C$ wurden beide Stringenzbedingungen benutzt (siehe unter den einzelnen Ergebnissen).

Bei der Hybridisierung der Northern Filtermembranen konnte für bestimmte Kombinationen von Sonden und Organen eine hohe Hintergrundfärbung der Gelspuren registriert werden. Dieser Hintergrund ist teilweise auf den hoch-repetitiven Anteil der Sonden $Xi-X_B$ und $Xi-X_B-Rep$ zurückzuführen, und reflektiert vermutlich die Anwesenheit dieser repetitiven Sequenz in Transkripten mehrerer Gene (siehe z.B. Abb. 57, S. 172; Abb. 61, S. 180; Abb. 70, S. 198). Die Anwendung anderer Sonden konnte den Hintergrund ganz, wie mit den Sonden $Xi-X_C$, $Xi-X_B-Spez2$ (siehe z.B. Abb. 55, S. 167; Abb. 70, S. 198) und Aktin, oder zum Teil, wie mit den Sonden $Xi-X_A$ und $Xi-X_B-Spez1$ (siehe Abb. 55, S. 167) reduzieren. Die Sonde $Xi-X_B-Hom$ ergibt bei den meisten Geweben unter nicht-stringenten Bedingungen einen starken Hintergrund (siehe Abb. 55, S. 167; Abb. 61, S. 180), der unter die Anwendung stringenter Bedingungen reduziert werden konnte. Teilweise spielen auch die Zelltypen, aus der die RNA isoliert wurde, eine Rolle. Die repetitiven Sonden ergeben bei aus Fett und Darm isolierter RNA keine (siehe Abb. 57, S. 172) und für die Skelettmuskulatur (siehe Abb. 58, S. 174) nur eine schwache Hintergrundfärbung.

Die Hintergrundfärbung der Gelspuren konnte für die repetitive Sonde $Xi-X_B$ in den meisten Fällen durch einen stringenteren Waschvorgang etwas reduziert werden. Die SSC-Konzentration im Waschpuffer wurde versuchsweise von 1x auf 0,5x und 0,1x reduziert und die Temperatur von 60 auf 65 °C erhöht. Die entsprechenden Autoradiogramme zeigten einen geschwächten Hintergrund, aber auch eine Reduktion in der Intensität der spezifischen Banden, und somit verblieb das Verhältnis von spezifischen Banden zum Hintergrund gleich.

Der teilweise starke Hintergrund erschwerte die Auswertung der Northern Analysen. Einerseits kamen häufig auftretende, nicht-spezifische Transkripte durch die unspezifische Schwarzfärbung der Gelspuren als Banden zum Vorschein, andererseits traten spezifische Transkripte in einer geringen Konzentration kaum aus dem Hintergrund hervor. In dieser Arbeit wurden nur die Banden berücksichtigt, die klar vom Hintergrund abzugrenzen waren und durch wiederholte Hybridisiervorgänge verschiedener Northern-Filter, zum Teil mit verschiedenen DNA-Sonden, einen Hinweis auf spezifische Transkripte ergaben.

Bedingt durch die Sequenz Poly(GTCT/GACA) im isolierten Genabschnitt $Xi-X$ wurden mit Sonden, die diese repetitive Region beinhalten ($Xi-X_B$ und $Xi-X_B-Rep$) meistens starke, reproduzierbare Hybridisierungssignale erreicht. Die $Xi-X$ -Expression in der Skelettmuskulatur, nachgewiesen mit verschiedenen Subsonden von $Xi-X$ (siehe

Abb. 58, S. 174), verdeutlicht die Signifikanz der repetitiven Sequenz für die Intensität der Hybridisierungssignale. Die nicht-Poly(GTCT/GACA)-enthaltenden Gensonden *Xi-X_A*, *Xi-X_{B-Hom}* und *Xi-X_{B-Spez1}* erzeugen eine Signalintensität, die nur einen Bruchteil der Signalintensität, die mit der repetitiven Sonde *Xi-X_{B-Rep}* erreicht wurde, entspricht. Dementsprechend kann für Transkripte, die mit der Sonde *Xi-X_B* nur ein schwaches Signal hervorrufen, meistens keine andere Subregion von *Xi-X* nachgewiesen werden. Mit viel eingesetzter markierter Sonde, entsprechend $0,8 \cdot 10^6$ cpm markierter Gensonde pro ml Hybridisierungslösung, und nicht-stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen konnten in einigen Fällen Transkripte sichtbar gemacht werden, die unter den üblichen Bedingungen nicht nachweisbar waren.

Poly(GTCT/GACA)-enthaltende Sonden könnten eventuell Transkripte zusätzlicher Gene detektieren, die die Poly(GTCT/GACA)-Sequenz enthalten. Somit sind Transkripte, die ausschließlich mit Poly(GTCT/GACA)-enthaltenden Sonden ein Hybridisierungssignal detektiert wird, nicht unbedingt auf das Gen *Xi-X* zurückzuführen.

Die Gensonde *Xi-X_{B-Hom}* enthält einen gut konservierten Bereich der Homöobox, und detektiert damit, außer Transkripte von *Xi-X*, wahrscheinlich auch Transkripte anderer homöobox-enthaltender Gene, die in den entsprechenden Gewebearten exprimiert werden. Dieses kann für die Skelettmuskulatur unter Verwendung verschiedener Subsonden deutlich beobachtet werden (siehe Abb. 58, S. 174).

Die Transkriptlänge der 18 S rRNA beträgt für *Xiphophorus*, wie für die humane 18 S rRNA, ca. 2,0 kb. Die 28 S rRNA von *Xiphophorus* ist ca. 4,1 kb lang, sich von der humanen 28 S rRNA, 5,1 kb betragend, unterscheidend. Die xiphophorinen rRNA-Transkripte wurden in den Northern Analysen neben den käuflichen RNA-Markern als interne Standarde für die Auswertung der Transkriptlängen verwendet.

Das Expressionsmuster von Aktin

Die aus Hefe stammender Gensonde für Aktin zeigte eine hohe Homologie zu Aktin-Transkripten in *Xiphophorus* (siehe z.B. Abb. 57, S. 172). Die Expression war meistens sehr hoch und eine Expositionszeit der Röntgenfilme von wenigen Stunden reichte meistens aus, um gute Signale zu erreichen. Hybridisierungen mit Aktin wurden immer als Kontrolle für die Qualität und Quantität der RNA eingesetzt. Die verschiedenen, untersuchten Gewebe- und Zelltypen zeigten Transkripte unterschiedlicher Länge, die Ergebnisse werden in der Tab. 12 (siehe S. 164) zusammengefasst.

Das Herzgewebe zeigte ein spezifisches Transkript von 1,6 kb (siehe Abb. 57, S. 172), das in keinem der anderen untersuchten Gewebearten zu beobachten war, und wahrscheinlich das spezifische, kontraktile System der Herzmuskelzellen widerspiegelt. Die Skelettmuskulatur zeigte ausschließlich ein Transkript von 1,8 kb (siehe z.B. Abb. 59, S. 177) und muss als das Aktin-Transkript für die Muskelkontraktion der Skelettmuskelzellen verantwortlich gemacht werden. Das Herzgewebe zeigte auch schwach ein Transkript von 1,8 kb. Alle untersuchten Gewebe- und Zelltypen, mit Ausnahme der Skelettmuskulatur und der Wirbelsäule, zeigten Transkripte von 2,2 kb (siehe z.B. Abb. 57, S. 172). Folglich kann von einem nicht-muskulären Aktin-Transkript von 2,2 kb in fast allen Zellen ausgegangen werden. Dieses Transkript ist auch in den

Herzen und in der glatten Muskulatur, indirekt durch Untersuchungen an Darmgewebe zurückzuschließen, zu beobachten. Dass die Wirbelsäule ausschließlich das spezifische Transkript der quergestreiften Muskulatur vorwies, ist wahrscheinlich einerseits auf die deutliche Anwesenheit von Skelettmuskelzellen, bedingt durch die Kontamination bei der Präparation, und andererseits auf die relativ geringe Menge an Zellen in Knochen- und Knorpelgewebe zurückzuführen. Die Anwesenheit des 1,8 kb Transkriptes in den Kopfsternen, Augen und Embryonen sind möglicherweise auf die Anwesenheit von Skelettmuskelzellen in diesen Präparaten zurückzuführen.

Die verschiedenen Gewebe- und Zelltypen zeigten eine unterschiedliche Intensität der Hybridisierungssignale der Aktin-Transkripte. Sowohl das 1,8 kb Transkript in der Skelettmuskulatur (z.B. Abb. 59, S. 177), als auch das 1,6 kb Transkript in den Herzen (siehe Abb. 57, S. 172) hatten eine sehr starke Intensität. Das 1,8 kb Transkript wies in allen anderen Geweben schwächere Signale auf. Das Hybridisierungssignal der 2,2 kb Transkripte zeigten in den verschiedenen Zelltypen eine schwache (Fettgewebe) bis sehr starke (Nieren) Intensität (siehe Abb. 57, S. 172). In den Haut-Präparaten war die Intensität der Transkripte von 2,2 kb und 1,8 kb beide gleich schwach (siehe z.B. Abb. 62, S. 182). Die Flossen und Kiemen zeigten das gleiche Expressionsmuster von Aktin, ein relativ schwaches 1,8 kb und ein starkes 2,2 kb Transkript (siehe z.B. Abb. 57, S. 172; Abb. 68, S. 193).

In den jeweiligen, folgenden Abschnitten, in denen die *Xi-X* Expression in verschiedenen Geweben zur Diskussion steht, wird, wenn dieses eine Bedeutung für die Auswertung der *Xi-X* Transkripte in bestimmten Zelltypen hat, das Expressionsmuster von Aktin genauer erläutert (siehe "*Xi-X* Expression in der Haut" S. 180, "*Xi-X* Expression in Flossen", S. 186 und "*Xi-X* Expression im Peritoneum", S. 196).

Tab. 12

Aktin-Transkripte, nachgewiesen in den verschiedenen Geweben und Zellen von *Xiphophorus*.

Alle beschriebenen, xiphophorinen Zelllinien* (siehe S. 183) und Rückenflossen** (siehe S. 186) wurden untersucht.

| Gewebe | 1,6 kb | 1,8 kb | 2,2 kb |
|-----------------|--------|--------|--------|
| Skelettmuskel | - | + | - |
| Wirbelsäule | - | + | - |
| Herz | + | + | + |
| Darm | - | - | + |
| Leber | - | - | + |
| Gehirn | - | - | + |
| Nieren | - | - | + |
| Hoden | - | - | + |
| Fett | - | - | + |
| Milz/Pankreas | - | - | + |
| Zelllinien* | - | - | + |
| Kopfrete | - | + | + |
| Augen | - | + | + |
| Kiemen | - | + | + |
| Haut | - | + | + |
| Rückenflossen** | - | + | + |
| Melanom, reines | - | - | + |
| Peritoneum | - | - | + |
| Embryonen | - | + | + |

Xi-X Expression der verschiedenen Gewebe- und Zelltypen von Xiphophorus

Die Expressionsdaten von *Xi-X*, erhoben mit verschiedenen Subregionen des isolierten Genabschnitts *Xi-X*, werden in den folgenden Abschnitten beschrieben und in den Tab. 14 (siehe S. 203) und Tab. 15 (siehe S. 204) zusammengefasst. Die Positionen der Subsonden im isolierten Genabschnitt *Xi-X* werden u.a. in der Abb. 17 (siehe S. 85), Abb. 55 (siehe S. 167) und Abb. 58 (siehe S. 174) beschrieben.

Xi-X Expression in der Leber

Mit der Hybridisierungsprobe *Xi-X_C* konnte eine Expression in der Leber nachgewiesen werden (siehe Abb. 55, S. 167; Abb. 56, S. 170; Abb. 70, S. 198; Abb. 71, S. 201). Die Transkriptlänge betrug ca. 0,8 kb, und die Hybridisierungssignale hatten in verschiedenen Leberpräparaten sehr schwankende Intensitäten (siehe S. 168 und Tab. 13, S. 169). Bei einer sehr hohen Expression des Genabschnitts in der Leber bzw. nach einer langen Expositionszeit der Röntgenfilme kam ein Transkript von ca. 3,1 kb zum Vorschein (siehe Abb. 55, S. 167). Das längere Transkript kann entweder einem alternativen Spleißprodukt oder dem primären Transkript der Genregion entsprechen.

Die Sonden *Xi-X_B* und *Xi-X_{B-Rep}*, die beide die repetitive Sequenz Poly(GTCT/GACA) enthalten, konnten auch die beiden Transkripte von 0,8 kb und 3,1 kb in der Leber ausfindig machen (siehe Abb. 55, S. 167). Die Signalintensitäten der 0,8 kb Banden waren auch mit diesen Sonden sehr schwankend, aber meistens schwächer als diejenigen, die mit der Sonde *Xi-X_C* erreicht wurden (siehe Abb. 55, S. 167; Abb. 70, S. 198; sowie Text S. 168 und Tab. 13, S. 169). Die Banden produziert mit der Sonde *Xi-X_C* sind breiter, als die Banden nach Hybridisierung mit der Sonde *Xi-X_B*. Dieses könnte methodisch bedingt sein, denn eine größere Konzentration an Transkripten zeigt etwas andere Laufeigenschaften. Eine andere Möglichkeit ist eine Heterogenität der Transkriptlängen.

Unter nicht-stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen mit 1×10^6 cpm markierter Sonde per ml Hybridisierungslösung, konnten auch sehr schwache Signale bei 0,8 kb mit den Sonden *Xi-X_A*, *Xi-X_{B-Hom}*, *Xi-X_{B-Spez1}* und *Xi-X_{B-Spez2}* detektiert werden (siehe Abb. 55, S. 167). Die erwähnten Sonden machen auch das 3,1 kb Transkript ausfindig. Die Sonde *Xi-X_{B-Hom}* zeigt einen relativ hohen Hintergrund mit Banden, die mit anderen Subsonden nicht detektierbar sind, was eventuell auf die Anwesenheit einer hoch konservierten Region der Homöobox in dieser Sonde zurückzuführen ist.

Die positiven Hybridisierungssignale in der Leber waren auf spezifische Transkripte zurückzuführen, was durch die Trennung von Poly(A)⁺- und Poly(A)⁻-RNA aus Gesamt-RNA, isoliert aus weiblichen Fischen von *X. helleri* (siehe Abb. 71, S. 201) bzw. *X. maculatus* (nicht gezeigt), bestätigt wurde: Das Transkript von 0,8 kb kam in der Poly(A)⁺-RNA Fraktion zum Vorschein, und das Signal blieb in der Poly(A)⁻-Fraktion der RNA aus. Weiter zeigten die beiden Fraktionen, dass die schwachen Signale im Bereich der rRNA-Transkripte unspezifisch sind, indem diese nur in der Poly(A)⁻-Fraktion zu beobachten waren. Auch das 2,2 kb Aktin-Transkript kam nur in der Poly(A)⁺-Fraktion zum Vorschein (nicht gezeigt).

Verschiedene Leber-Transkripte

Die repetitive Sequenz Poly(GTCT/GACA) in der Sonde *Xi-X_B-Rep* ruft durch ihre Anwesenheit in den Transkripten starke Hybridisierungssignale hervor (siehe Abb. 55, S. 167). Die Intensität, erreicht mit der Sonde *Xi-X_C*, ist aber für das 0,8 kb Leber-Transkript meistens stärker, als die Intensität, erreicht mit den repetitiven Sonden, und viel stärker als die Signale, erreicht mit den Sonden *Xi-X_A*, *Xi-X_B-Hom* und *Xi-X_B-Spez1*, die auch keine repetitive Sequenz enthalten. Nur die Sonde *Xi-X_B-Spez2* zeigt in einem Präparat eine erhöhte Signalintensität (siehe Abb. 55, S. 167), in anderen Präparaten war die Signalintensität vergleichbar mit denen der Subsonden A, B-Hom und B-Spez1. Die Möglichkeit, dass in der Sonde *Xi-X_C* eine repetitive Sequenz beherbergt wird, was eine Erhöhung in Signalintensität verursachen würde, wird durch Sequenzstudien und Southern Analysen widerlegt. Eine andere Möglichkeit ist, dass von der Existenz zweier, verschiedener Gentranskripte der gleichen Länge in der Leber ausgegangen werden muss: Das eine Transkript, *Xi-X^{LeberC}*, enthält nur die Subregion C, mit vermutlich einem kleinen Anteil vom angrenzenden Subregion B-Spez2, vom untersuchten *Xi-X*-Fragment. Dies ist auch durch das Erreichen von positiven Hybridisierungssignalen ausschließlich mit der Sonde *Xi-X_C* in bestimmten Leber-Präparaten, die für die Sonden *Xi-X_B* negativ waren, zurückzuschließen (siehe Abb. 70, S. 198 und Tab. 13, S. 169). Das andere Transkript, *Xi-X^{LeberB}*, enthält die anderen detektierten Genregionen (*Xi-X_A*, *Xi-X_B-Hom*, *Xi-X_B-Spez1*, *Xi-X_B-Rep* und vermutlich Teile von *Xi-X_B-Spez2*). Ob das Transkript *Xi-X^{LeberB}* auch die Region *Xi-X_C* enthält, kann mit den angewandten Methoden nicht beantwortet werden. Das Transkript *Xi-X^{LeberC}* kommt in einer viel höheren Konzentration, als das Transkript *Xi-X^{LeberB}* vor, was deutlich durch die Intensität der Signale, erreicht mit den nicht-repetitiven Sonden zum Ausdruck kommt.

Ein vermutliches homöobox-enthaltendes Exon von *Xi-X^{LeberB}* wird in der Abb. 20 (siehe S. 94) gezeigt. Ein 3'-Spleißsignal 29 bp strangaufwärts zur Homöobox tritt vermutlich in Kraft (siehe Sequenzabschnitt, S. 86ff.). Das Polyadenylierungssignal AATAAA in der Subregion Spez2 markiert vermutlich das 3'-Ende des Transkripts. Das Leber B Transkript enthält die Homöobox, die repetitive Sequenz Poly(GTCT), die spezifische Region dazwischen und die spezifische Region strangabwärts zur repetitiven Sequenz. Das LeberC-Transkript enthält keine Homöobox und vermutlich vorwiegend Regionen vom Subregion C und einen kleinen Anteil vom angrenzenden Region Spez2. Auch in der Subregion C befindet sich ein Polyadenylierungssignal, so dass diese Region das 3'-Ende des Leber C Transkripts entsprechen könnte (siehe auch „Gen unbekannter Motive, *Xi-X-LC*“, S. 103). Sowohl das Leber-Transkript B als auch das Leber-Transkript C werden daher möglich mit Exons, beliegend strangaufwärts zum isolierten Genfragments, verbunden.

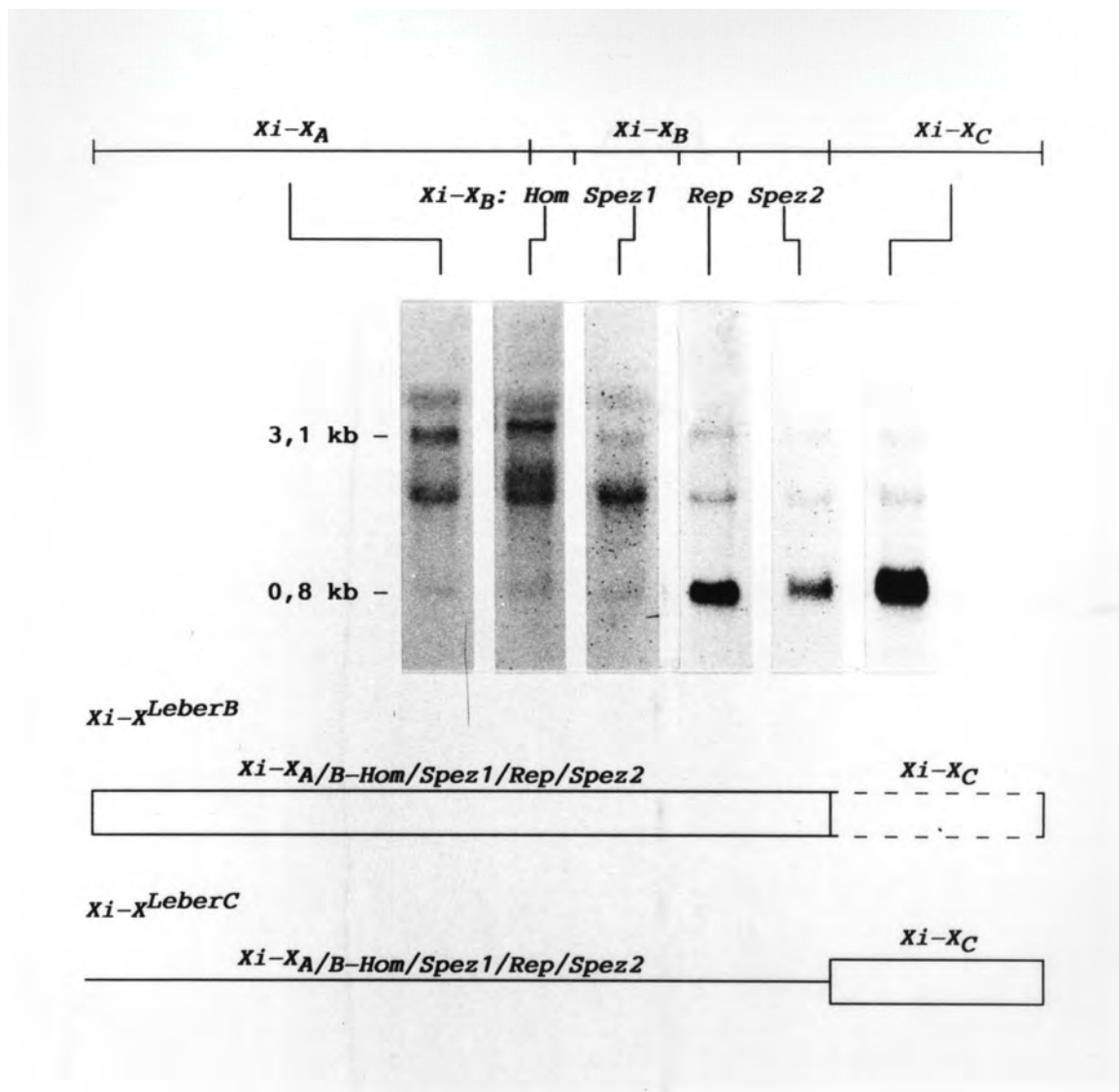


Abb. 55

Die Anwesenheit der verschiedenen Subregionen von *Xi-X* im 0,8 kb Transkript in RNA, isoliert aus Leber.

Eine graphische Darstellung der verschiedenen Subregionen von *Xi-X* in den Sonden (oben), die Hybridisierungsergebnisse (mitte) und eine graphische Darstellung über die Exon-Bereiche (als eine Box dargestellt) bzw. abwesende Intron-Bereiche (mit einer Linie dargestellt) von *Xi-X* in den zwei verschiedenen Leber-Transkripten. Die gestrichelte Boxregion gibt einen Genabschnitt an, in dem eine Transkription nicht definitiv angegeben werden kann. Für die Sonden *Xi-X_A*, *Xi-X_{B-Hom}*, *Xi-X_{B-Spez1}* und *Xi-X_{B-Spez2}* wurden nicht-stringente Hybridisierungs- und Waschbedingungen angewandt. Die Expositionszeiten betragen für die Sonden, von 5' nach 3' angeordnet, 3, 6, 8, 3, 8 bzw. 4 Tage.

Quantitative Schwankungen

Die Konzentrationen von *Xi-X* Transkripten, detektiert mit den Sonden *Xi-X_B* bzw. *X-X_C*, zeigten in den verschiedenen Leber-Präparaten große quantitative Schwankungen (siehe Tab. 13, S. 169). Dieses traf für die beiden Transkripte B und C unabhängig vom Genotyp und Phänotyp der Fische mit Eigenschaften wie Art, Rückkreuzungsgeneration, Pigmentzellmuster oder Geschlecht als Kriterien zu. Die Hybridisierungssignale, erreicht mit der Sonde *Xi-X_C*, sind für fast alle Leber-Präparate stärker als die Signale, die mit der Sonde *Xi-X_B* erreicht wurden. So konnten für Leber, präpariert aus *X. helleri*, Männchen, in einem Präparat mit der Sonde *Xi-X_C*, sehr starke Signale (***) in einem anderen Präparat nur mittelstarke Signale (**) beobachtet werden. Für die Sonde *Xi-X_B* wurden für dieselbe RNA starke (**) bzw. keine (-) Signale erzielt. Für einige Leber-Präparate sind die Signale mit der *Xi-X_C* Sonde von einer mittleren bis starken Intensität (**/**), mit der Sonde *Xi-X_B* sind hier keine Signale detektierbar: Dieses traf für Rückkreuzungsbastarde mit den Pigmentzellloci *DrSd* bzw. *Sd^T* (siehe Abb. 70, S. 198) und, wie schon beschrieben, für *X. helleri*, Männchen, zu. Andere Leber-Präparate, wie die Präparate von *X. helleri*, Weibchen, *X. maculatus*, Männchen, und Rückkreuzungsbastarde mit *Dr*, zeigten für beide Sonden keine bzw. sehr schwache Signale (-/*). Schließlich gab es Präparate, bei denen die *Xi-X_C* Expression hoch bis sehr hoch (**/**) und die entsprechende *Xi-X_B* Expression schwach bis mittelstark war (*/**), wie für zwei Präparate von *X. maculatus*, Weibchen, und für die PSPM-freien Rückkreuzungsbastarde beobachtet werden konnte. Es konnte somit eindeutig gezeigt werden, dass sowohl die Konzentrationen der *Xi-X^{LeberB}*-Transkripte, als auch die Konzentrationen der *Xi-X^{LeberC}*-Transkripte in der Leber von *Xiphophorus* sehr schwankend sind. Die Synthese bzw. Abbau der beiden Transkripte steht offensichtlich unter einer unterschiedlichen, nicht-konstitutiven Regulation, die vermutlich von Signalen der Umgebung bzw. Gesundheits- und Ernährungszustand der Fische beeinflusst werden könnte (siehe auch S. 169-170).

Auffallend ist, dass in zwei der RNA-Isolate, isoliert aus den Rückkreuzungsbastarden mit *DrSd* (siehe Abb. 70, S. 198) bzw. mit *Golden*, keine bzw. nur eine sehr geringe Konzentration der Leber B Transkripte nachgewiesen wurde, einhergehend mit einer kaum detektierbaren Aktin-Expression; für alle anderen Leberpräparate war die Expression von Aktin sehr hoch. Die Signale der Leber C Transkripte waren aber in diesen Isolaten stark, so dass eine reduzierte RNA-Qualität für die schwachen Hybridisierungssignale nicht verantwortlich gemacht werden konnte. Vielleicht steht die Synthese bzw. der Abbau der Transkripte der beiden Gene Aktin und *Xi-X* unter der Kontrolle gewisser, gemeinsamer, regulatorischer Signale.

Tab. 13

Intensität der Hybridisierungssignale der 0,8 kb Transkripte, erreicht mit den Sonden $Xi-X_B$ und $Xi-X_C$ in verschiedenen Leber-Präparaten von A) *X. helleri* und *X. maculatus* und B) Rückkreuzungsbastarden.

-/- bezeichnet Rückkreuzungsbastarde, die keine PSPM, und $DrSd/-$, $Dr/-$ und $Sd^T/-$ Rückkreuzungsbastarde, die die jeweiligen PSPM geerbt hatten. *g* steht für die rezessive Mutation *Golden*.

Bei Unterscheidung bezüglich des Geschlechts wird m für männlich und w für weiblich angegeben. Viele der Rückkreuzungsbastarde waren ohne besondere Geschlechtsmerkmale, mit - bezeichnet.

| | Genotyp | Geschlecht | Anzahl | $Xi-X_B$ | $Xi-X_C$ |
|----------|---------------------|------------|--------|----------|----------|
| A | <i>X. helleri</i> | m | 10 | - | ** |
| | | m | 10 | ** | *** |
| | | w | 4 | * | * |
| | <i>X. maculatus</i> | m | 17 | - | - |
| | | w | 6 | * | ** |
| | | w | 5 | ** | *** |
| B | -/- | m | 7 | * | ** |
| | -/-, <i>g/g</i> | - | 9 | * | ** |
| | $DrSd/-$ | - | 3 | - | ** |
| | $Dr/-$ | - | 5 | * | * |
| | $Sd^T/-$ | - | 6 | - | *** |

Um zu überprüfen, ob die Schwankungen in den Transkript-Konzentrationen verschiedener Leber-Präparate vielleicht mit dem Ernährungszustand der Fische zusammenhängen könnte, wurden männliche *X. helleri* Fische (junge, gesunde Tiere der gleichen Größe) untersucht. Einem Teil der Fische (n=5) wurde zwei Tage lang kein Futter gereicht. Die Kontrollgruppe (n=3) wurde normal gefüttert und war bei der Leberentnahme seit einer Stunde beim "Frühstücken". Mit der Sonde $Xi-X_B$ zeigten die Leber der Kontrollfische eine Intensität des 0,8 kb Transkriptsignals, das stärker, als die Intensität des Signals der gehungerten Fische war. Mit der Gensonde $Xi-X_C$ war das Verhältnis umgekehrt, die gehungerten Fische zeigten ein 0,8 kb Transkript, das eine stärkere Intensität, als die der Kontrollfische besaß. Das Transkript $Xi-X^{LeberC}$ ist somit für den Hungerzustand charakteristisch, das Transkript $Xi-X^{LeberB}$ in Alimentationsvorgängen involviert. Die beiden starken und die beiden schwachen Signale waren in der Intensität mit den verwendeten Sonden und gleichen Expositionszeiten der Röntgenfilme vergleichbar. Das Verhältnis der Intensität der schwachen und starken Banden, durch spektrofotometrische Messungen ermittelt, betrug für beiden Sonden den Faktor 1,5. Es muss betont werden, dass das $Xi-X^{LeberB}$ Transkript hier mit einer repetitiven Sonde detektiert wurde, und vermutlich in einer viel geringeren Konzentration als das $Xi-X^{LeberC}$ Transkript vorlag.

ERGEBNISSE

Mit diesem Experiment konnte bestätigt werden, dass es sich wirklich um zwei verschiedene *Xi-X* Lebertranskripte handelt, und dass die Konzentration dieser beiden Transkripte u.a. durch den Ernährungszustand der Fische reguliert werden kann.

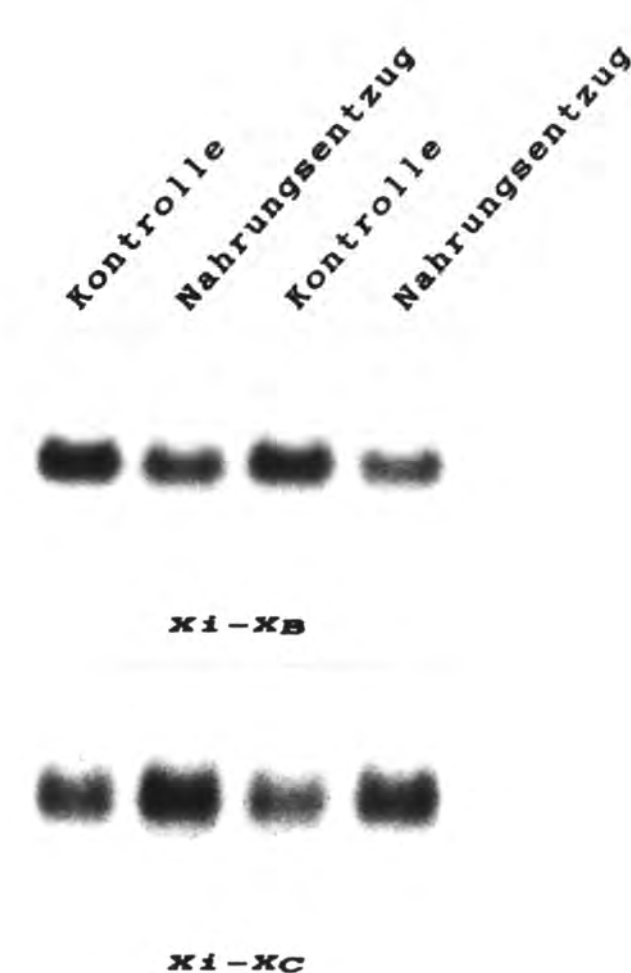


Abb. 56

Die Konzentration der zwei verschiedenen 0,8 kb Leber-Transkripte *Xi-X^{LeberB}* und *Xi-X^{LeberC}*, detektiert mit den Gensonden *Xi-X_B* bzw. *Xi-X_C* in den Lebern von Fischen, die zwei Tage kein Futter erhielten, verglichen mit Kontrolltieren, die normal gefüttert wurden.

***Xi-X* Expression im Gehirn**

Ein Transkript von ca. 0,8 kb konnte in der RNA, isoliert aus Gehirn, detektiert werden (siehe Abb. 57, S. 172). Die untersuchten Organe stammten entweder aus *X. helleri*, Männchen, aus männlichen, PSPM-freien Rückkreuzungsbastarden oder sie wurden aus *X. helleri* mit *Db* zusammen mit Rückkreuzungsbastarden mit den Pigmentzellloci *DrSd*, *Sd^T* und *YeLi* gemeinsam untersucht. Nur die Sonden *Xi-X_B* und *Xi-X_{B-Rep}* riefen Hybridisierungssignale hervor, die für die verschiedenen, untersuchten Gehirn-Präparate eine vergleichbare, mittelstarke Intensität aufwiesen.

***Xi-X* Expression in Hoden**

In Transkripten, isoliert aus Hoden, kamen in Northern Analysen ausschließlich mit den Sonden *Xi-X_B* und *Xi-X_{B-Rep}* eine schmale, schwache Bande im Bereich von ca. 1,4 kb und eine etwas stärkere, breitere Bande im Bereich von ca. 1,1 kb zum Vorschein (siehe Abb. 57, S. 172). Die untersuchten Fische waren *X. helleri* bzw. PSPM-freie Rückkreuzungsbastarde.

***Xi-X* Expression in Kiemen**

Bei den Kiemen, isoliert aus *X. helleri*, Männchen (siehe Abb. 57, S. 172), und aus Rückkreuzungsbastarden mit dem Phänotyp *Sd^T*, wurde mit der Sonde *Xi-X_B* ein den Hoden ähnliches Expressionsmuster observiert. Eine entsprechende Bande bei 1,1 kb konnte nachgewiesen werden, aber die schwächere Bande war etwas länger als beim Hoden und betrug ca. 1,5 kb. Zusätzlich zeigte die RNA, isoliert aus Kiemen, eine starke Schwarzfärbung direkt unterhalb der 18 S rRNA-Bande, die für keine andere Gewebeart so ausgeprägt nachgewiesen werden konnte, und einem Transkript von ca. 1,9 kb entspricht.

***Xi-X* Expression in Milz, Pankreas, Nieren, Darm und Fettgewebe**

Es war schwierig Milz und Pankreas aufgrund ihrer Makromorphologie voneinander zu trennen, so dass diese beiden Organe gemeinsam untersucht wurden. In diesen Organen (isoliert aus *X. helleri* Männchen, aus männlichen PSPM-freien Rückkreuzungsbastarden oder aus melanomtragenden Rückkreuzungsbastarden von *DrSd* und *Sd^T*) konnten für keine der Sonden *Xi-X_A*, *Xi-X_B* oder *Xi-X_C* spezifische Transkripte nachgewiesen werden. Dies verhielt sich gleichermaßen für RNA, isoliert aus Darmgewebe (von *X. helleri*, Männchen), aus Fettgewebe (präpariert aus *X. helleri* Männchen bzw. melanomtragenden Rückkreuzungsbastarden von *DrSd*) und aus Nieren (präpariert aus *X. helleri* und PSPM-freien Rückkreuzungsbastarden, beide Männchen, und von *X. helleri* mit *Db* zusammen mit Rückkreuzungsbastarden mit den Pigmentzellloci *DrSd*, *Sd^T* und *YeLi*); keine *Xi-X* Transkripte konnten in Milz-, Pankreas-, Nieren-, Darm- oder Fettgewebe nachgewiesen werden (siehe Abb. 57, S. 172).

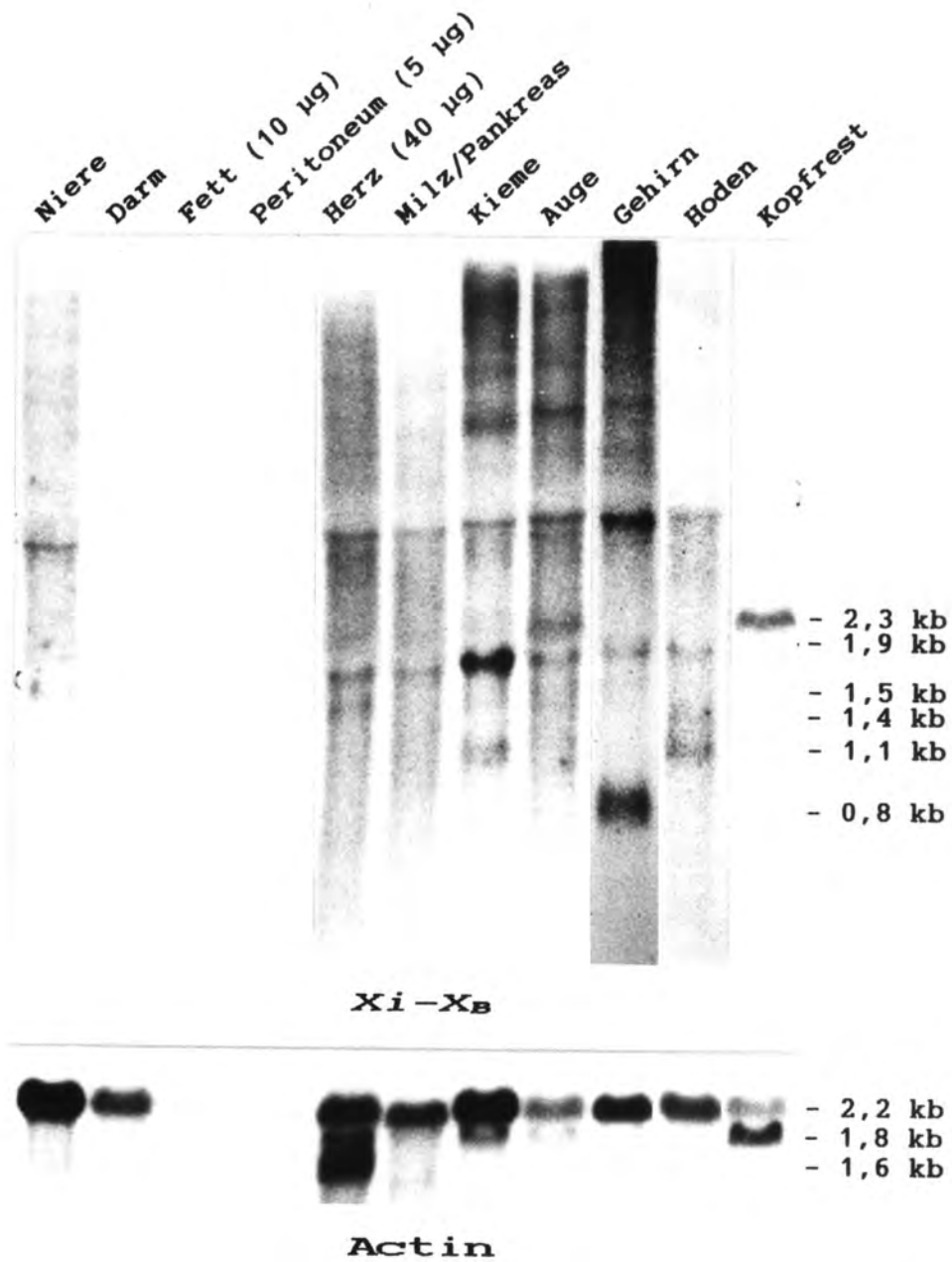


Abb. 57

Das Expressionsmuster von *Xi-X* und Aktin in verschiedenen Organen, präpariert aus *X. helleri*, Männchen.

Die Subsonde *Xi-X_B* wurde für den *Xi-X* Nachweis eingesetzt.

Xi-X Expression in Muskelgewebe

Quergestreifte Muskulatur

Es wurde Gewebe aus der Rumpfmuskulatur im dorsalen Bereich der Fische für die Analysen der **Skelettmuskelzellen** präpariert. Für jede Analyse wurde meistens Muskelgewebe von nur wenigen (1-3) Individuen untersucht. 0,5 g Muskelgewebe, die maximal einsetzbare Menge für das angewandte RNA-Extraktionsverfahren, ergab nur ungefähr 20 µg RNA. Wegen der geringen RNA-Menge, die aus Muskelgewebe gewonnen werden konnte, wurden für die meisten RNA-Isolate keine Quantifizierung der RNA durchgeführt; die gesamte, extrahierte RNA wurde auf das Gel aufgetragen, wodurch es zu Schwankungen der eingesetzten RNA-Mengen kam.

Die Skelettmuskulatur zeigte eine hohe Expression von *Xi-X*, die Transkriptlänge betrug ca. 2,3 kb (siehe Abb. 58, S. 174; Abb. 59, S. 177; Abb. 60, S. 178). Hybridisierungen, die zur Analyse der Anwesenheit der verschiedenen Subregionen von *Xi-X* im Transkript unternommen wurden, wurden unter nicht-stringenten Bedingungen mit viel markierter Sonde (1×10^6 cpm/ml Hybridisierungslösung) durchgeführt (siehe Abb. 58, S. 174). Das 2,3 kb Transkript konnte mit den Sonden *Xi-X_A*, *Xi-X_{B-Hom}*, *Xi-X_{B-Spez1}* und *Xi-X_{B-Rep}* detektiert werden, die Subregionen *Xi-X_{B-Spez2}* und *Xi-X_C* waren negativ. Die Sonde *Xi-X_{B-Hom}* konnte außerdem zwei starke Banden von ca. 4,0 kb und 1,3 kb ausfindig machen. Diese Gensonde enthält eine gut konservierte Region der Homöobox und detektiert damit wahrscheinlich andere homöobox-enthaltene Gene, die auch in den Muskelzellen exprimiert werden. Alternativ könnten sie differentiellen Spleißprodukten von *Xi-X* entsprechen, die keine andere Regionen des isolierten *Xi-X* Genabschnitts enthalten.

Beim Muskel-Transkript von *Xi-X* könnte das gleiche Spleißsignal 29 bp strangaufwärts zur Homöobox wie beim LeberB-Transkript in Kraft treten (siehe Abb. 20, S. 94). Im Muskel-Transkript ist die Subregion *Spez2*, die ein Polyadenylierungssignal enthält und dem 3'-Ende vom LeberB Transkript entspricht, nicht präsent. Die repetitive Region wird vermutlich mit weiteren Exons strangabwärts zum isolierten Genfragment verbunden.

Banden direkt unterhalb der 18S rRNA Transkripte, detektiert mit den Sonden *Xi-X_A*, *Xi-X_{B-Hom}* und *Xi-X_{B-Spez1}*, entsprechen vermutlich einer unspezifischen Färbung, wie diese durch die Trennung von Poly(A)⁺- und Poly(A)⁻-RNA in RNA-Isolaten aus Leber und Embryonen (siehe Abb. 71, S. 201) nachgewiesen werden konnte. Ein unspezifisches Signal (nicht gezeigt), erreicht mit der Sonde *Xi-X_{B-Spez1}*, konnte durch einen stringenten Waschvorgang entfernt werden. Wenn eine sehr hohe *Xi-X*-Expression in der Skelettmuskulatur vorhanden war, konnte mit den Sonden *Xi-X_B* und *Xi-X_{B-Rep}*, wie auch für die Leber gezeigt, ein Transkript von ca. 3,1 kb nachgewiesen werden (siehe Abb. 59B, S. 177).

Das *Xi-X*-Transkript von 2,3 kb wurde auch in anderen Organen und Körperteilen nachgewiesen, wahrscheinlich zum Teil durch das natürliche Vorkommen von Skelettmuskelzellen in diesen Präparaten oder durch Muskelkontaminationen bei den Präparationen bedingt. Dieses gilt für die Kopfreife (ohne Gehirn und Augen), die Augen, die Wirbelsäulen und für Embryonen. Diese Annahme wurde durch die Anwesenheit des skelettmuskulären Aktin Transkripts von 1,8 kb in diesen Präparaten bestätigt (siehe S. 197 bzw. 199).

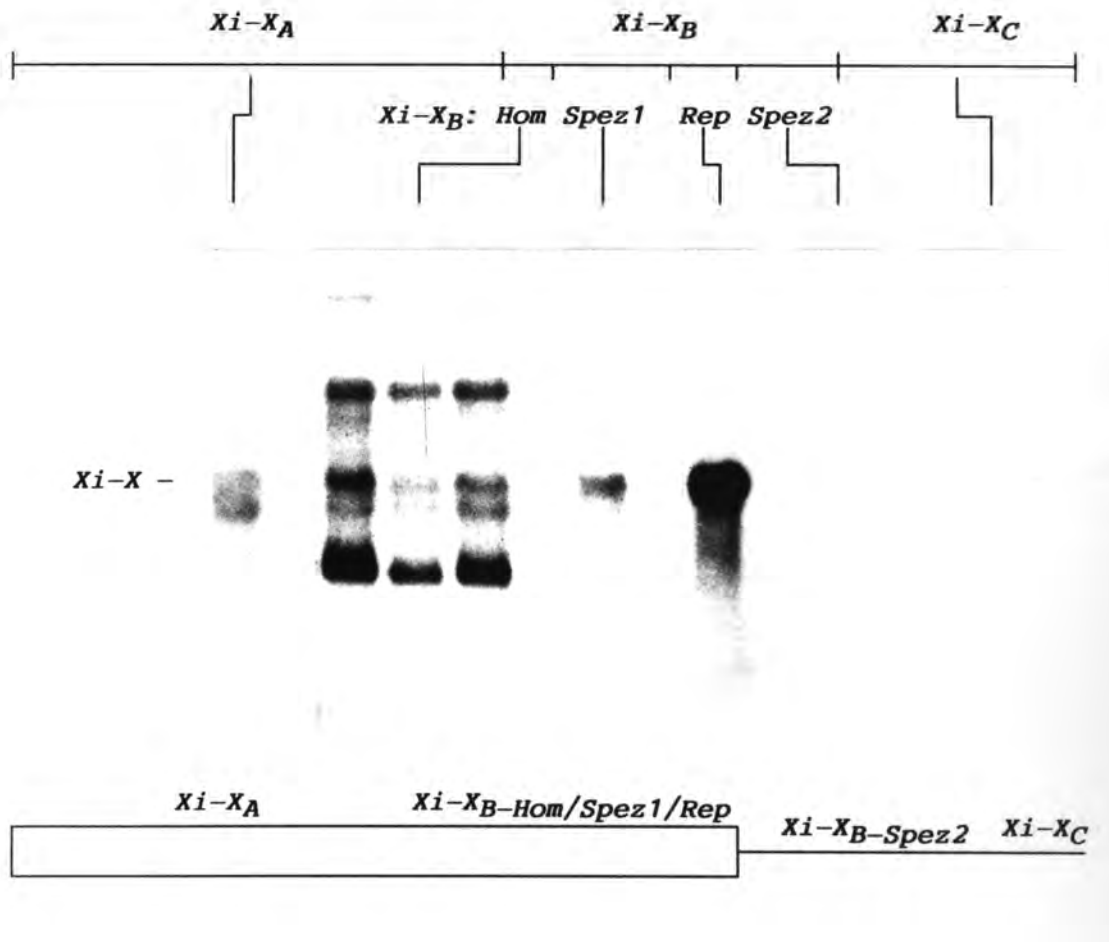


Abb. 58

Die Anwesenheit der verschiedenen Subregionen von *Xi-X* im 2,3 kb Transkript, isoliert aus der Skelettmuskulatur.

Eine Darstellung der verschiedenen Subregionen von *Xi-X* in den Sonden (oben), die Hybridisierungsergebnisse (mitte) und eine graphische Darstellung (unten) der Exonbereiche (als eine Box dargestellt) bzw. abwesenden Bereiche (mit einer Linie dargestellt) von *Xi-X* in den Transkripten.

Nicht-stringente Hybridisierungs- und Waschbedingungen wurden angewandt. Die Expositionszeit war für die Sonden mit positiven Hybridisierungssignalen alle gleich (3 Tage). Die Northern Analysen mit Sonden, die keine Signale hervorriefen, wurden 14 Tage exponiert, ohne dass die Transkripte dabei sichtbar wurden. Die starken Signale, erreicht mit der Sonde *Xi-X_B-Rep*, im Vergleich zu den Signalen, erreicht mit den anderen Sonden, macht die Bedeutung der repetitiven Sequenz für die Signalintensität deutlich.

Quantitative Schwankungen der Xi-X-Expression in der Skelettmuskulatur

In einer ersten Untersuchung zur Xi-X Expression in Skelettmuskelzellen wurde RNA aus Muskelgewebe von *X. maculatus DrSd/ArSr*, von einem Rückkreuzungsbastard mit dem Pigmentzelllocus *Dr* und von *X. helleri*, Männchen, mit der Sonde *Xi-X_B* untersucht (siehe Abb. 59A, S. 177). Für diese Analysen wurden stringente Hybridisierungs- und Waschbedingungen angewandt. Von dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel wurden die eingesetzten RNA-Mengen auf 20, 12 bzw. 10 µg geschätzt. Die Hybridisierungssignale der 2,3 kb *Xi-X* Transkripte zeigten für die drei RNA-Isolate eine unterschiedliche Intensität, die sich nur für *X. helleri* und *X. maculatus DrSd/ArSr* mit den eingesetzten RNA-Mengen korrelieren ließ. Demgegenüber zeigte der Rückkreuzungsbastard mit *Dr*, bei dem die RNA-Menge nur etwa die Hälfte der Menge eingesetzt für *X. maculatus DrSd/ArSr* betrug, eine Signalstärke, die schätzungsweise etwa dreifach erhöht ist. Dieses ergibt umgerechnet eine fast sechsfach höhere Expression von *Xi-X* in der Skelettmuskulatur, isoliert aus dem Rückkreuzungsbastard mit dem Phänotyp *Dr*, als aus den reinen *X. maculatus* und *X. helleri* Arten.

Um zu erkunden, ob die *Xi-X* Expression im Muskel mit dem Pigmentzellmuster der Fische korreliert, wurden neue RNA-Extraktionen aus der Skelettmuskulatur vorgenommen. Die Präparationen wurden aus Rückkreuzungsbastarden mit den Pigmentzellloci *DrSd*, *Dr*, *Sd^T* bzw. *DrArSr* durchgeführt. Für *DrArSr* wurde sowohl die einfache, als auch die doppelte Dosis der Pigmentzellgene im Genom, und dazu die direkten *DrArSr*-freien Geschwister untersucht. Für die Fische mit dem Phänotyp *Sd^T* wurde die Konzentration der RNA im Isolat gemessen und 5, 10 und 20 µg für die Northern Analyse eingesetzt; diese RNA-Mengen dienten als Standards für das Einschätzen der anderen RNA-Mengen. Die Northern Analyse ergab einen unterschiedlichen Grad der Expression von *Xi-X* in der quergestreiften Muskulatur der verschiedenen Tiere (siehe Abb. 60, S. 178). Die Rückkreuzungsbastarde mit *DrSd* und *Dr* zeigten eine höhere Intensität der Hybridisierungssignale als die Rückkreuzungsbastarde mit *Sd^T* und *DrArSr*. Besonders deutlich ist das für die Phänotypen mit *Dr* und *Sd^T* zu sehen, die schätzungsweise beide 5 µg RNA betrugten und vergleichbare Aktin-Signalintensitäten aufwiesen. Das Hybridisierungssignal der Fische mit dem Phänotyp *Dr* hatte schätzungsweise eine vierfache Intensität, verglichen mit der Intensität der Signale der Fische mit dem Phänotyp *Sd^T*. Die Rückkreuzungsbastarde mit der Loci *DrSd* zeigten eine vergleichbare Signalintensität wie Fische mit dem Phänotyp *Dr*. Die Fische mit der Loci *DrArSr*, die durch eine besonders intensive Rotfärbung charakterisiert sind, hatten keine ausgeprägte *Xi-X*-Expression, nur etwas höher als die Expression des Fisches mit dem Phänotyp *Sd^T*. Eine doppelte Dosis der Pigmentzellloci *DrArSr* ergab keine Erhöhung in Signalintensität, sie entsprach nur ein Viertel der einfachen *DrArSr*-Dosis. Die PSPM-freien Geschwister zeigten eine entsprechende geringe Expression.

Einerseits wurden die Ergebnisse gefunden in der ersten Versuchsreihe, dass Rückkreuzungsbastarde mit *Dr* eine besonders hohe *Xi-X* Expression im Muskelgewebe aufzeigen, bestätigt. Dieses konnte gegenüber dem Rückkreuzungsbastard mit *Sd^T*, aber auch gegenüber den PSPM-freien Bastarden gesehen werden. Anscheinend ist die Anwesenheit von dem Locus *Dr* im Genom nicht alleine ausschlaggebend; obwohl Rückkreuzungsbastarde mit den Loci *DrSd* eine vergleichbare Intensität wie Fische mit dem Locus *Dr* zeigten, war die Intensität der *Xi-X*-Hybridisierungssignale von

Rückkreuzungsbastarden mit *DrArSr* kaum erhöht. Auch die reine Platyart mit der Loci *DrSd/ArSr* in der ersten Untersuchungsreihe zeigte eine niedrige Genaktivität. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte es Hinweise darauf geben, dass die Loci *ArSr* die Expression von *Xi-X* in Bastarden mit *Dr* unterdrückt.

Im letzten Versuch zur vergleichenden Expressionsrate von *Xi-X* in der Skelettmuskulatur wurde erneut Rückkreuzungsbastarde mit den Phänotypen *Dr* bzw. *Sd^T* untersucht (siehe Abb. 59B, S. 177). Diese Expression wurde mit der Expression in Muskelgewebe von *X. helleri* verglichen, um zu erkunden, ob Unterschiede im Expressionsgrad auf unterschiedliche Eigenschaften zwischen den reinen Arten und den Rückkreuzungsbastarden beruht, wie durch die Ergebnisse im ersten Versuch zu entnehmen sein könnte. Die Muskulatur von dem Rückkreuzungsbastard mit dem Pigmentzelllocus *Dr* zeigte in diesem dritten Versuch eindeutig eine viel geringere *Xi-X* Expression, die vielleicht einem Sechstel der Expressionshöhe der anderen Tiere entsprach. Hiermit ist ein Ergebnis erzielt worden, das im Gegensatz zu dem Ergebnis der ersten und zweiten Untersuchungsreihe steht, in denen bei den Rückkreuzungsbastarden mit *Dr* eine vier- bis sechsfach höhere Expression, als bei *X. helleri* und Rückkreuzungsbastarden mit *Sd^T* gefunden wurde.

Somit konnte der beobachtete Unterschied im Expressionsgrad von *Xi-X* in verschiedenen Muskel-Präparaten entweder mit einem Unterschied zwischen den reinen Arten und den Rückkreuzungsbastarden oder direkt mit der Anwesenheit der verschiedenen Pigmentzellloci im Genom in Zusammenhang gebracht werden. Genotypen, die mehrmals untersucht wurden, zeigten schwankende Expressionswerte. Auffallend ist, dass die relative Intensität der Aktin-Banden oft der relativen Intensität der *Xi-X*-Banden entsprach, in der Abb. 59A (siehe S. 177) ist dieser Effekt besonders deutlich zu erkennen. Dieses Phänomen kann auf eine parallele Funktion der beiden Gene hindeuten, oder die unterschiedliche Intensität der Hybridisierungssignale sind methodisch zu erklären, indem die Signale entweder die eingesetzten RNA-Mengen oder vielleicht die Reinheit der RNA und damit die Zugänglichkeit zur Sonde bei der Hybridisierung widerspiegeln. In der Abb. 59B (siehe S. 177) ist die Aktin-Expression konstant, trotz großer Schwankungen der *Xi-X* Expression. In dieser letzten Versuchsreihe ist die unterschiedliche *Xi-X* Expression nicht auf das methodische Verfahren, sondern auf die individuellen Schwankungsbereiche der Fische zurückzuführen.

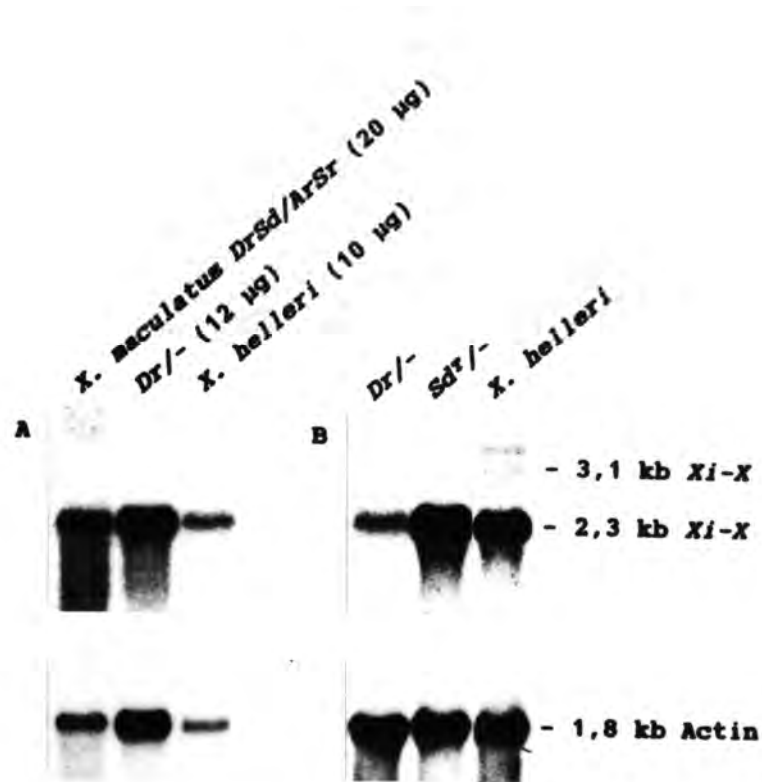


Abb. 59

Die RNA-Expression von *Xi-X* und Aktin in der Skelettmuskulatur von verschiedenen Arten und Rückkreuzungsbastarden von *Xiphophorus*.

Die Subsonde *Xi-X_B* wurde für den *Xi-X* Nachweis eingesetzt.

In B betragen die eingesetzten RNA-Mengen ca. 20 µg für alle drei Isolate.

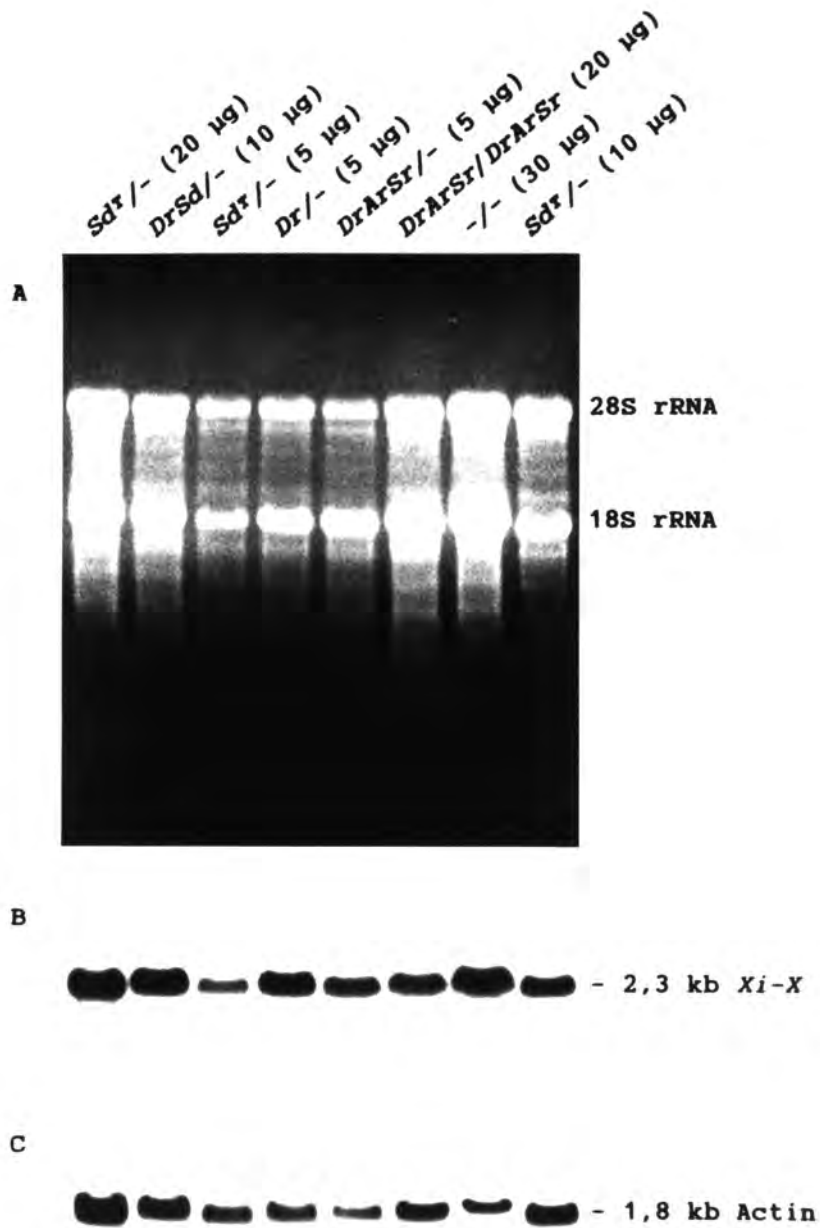


Abb. 60

Die RNA-Expression von *Xi-X* und Aktin in der Skelettmuskulatur von Rückkreuzungsbastarden von *Xiphophorus* mit verschiedenen Pigmentzellloci.

A) Die RNA im Agarosegel nach der Elektrophorese, nachgewiesen durch eine Ethidiumbromidfärbung. B) Das entsprechende Autoradiogramm der Northern Filtermembran, hybridisiert mit der Sonde *Xi-X_B* und C) rehybridisiert mit Aktin.

Herz und glatte Muskulatur

Herzen wurden aus *X. helleri* Männchen bzw. aus Rückkreuzungsbastarden mit *DrSd* und *Sd^T* präpariert, um die *Xi-X* Expression in **Herzmuskelzellen** zu untersuchen. Das Transkript von 2,3 kb, das in der Skelettmuskulatur zu beobachten ist, ist in der RNA, isoliert aus Herzen, nicht zu erkennen. Dagegen ist ein Transkript von ca. 0,8 kb mit den Sonden *Xi-X_B*, *Xi-X_B-Hom* und *Xi-X_C* zu beobachten (siehe Abb. 61, S. 180). Die 0,8 kb Bande hat mit der Sonde *Xi-X_B* eine sehr schwache Erscheinung, was für eine Abwesenheit der repetitiven Sequenz Poly(GTCT) in diesem Transkript spricht. Dieses wird durch die ausschließliche Detektion unter Verwendung von nicht-stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen bestätigt. Mit den Sonden *Xi-X_A*, *Xi-X_B-Spez1* und *Xi-X_B-Spez2* konnten keine Hybridisierungssignale hervorgerufen werden, was eventuell auf eine Maskierung eines schwachen Signals durch einen relativ hohen Hintergrund zurückzuführen sein könnte. Für die Herzen isoliert aus *X. helleri* war das Hybridisierungssignal des 0,8 kb Transkripts mit der Sonde *Xi-X_C* besonders deutlich, das Signal von *Xi-X_B* war sehr schwach und das Signal von *Xi-X_B-Hom* nicht zu detektieren. Für die Herzen, isoliert aus den melanomtragenden Rückkreuzungsbastarden, war dagegen das Signal mit der Sonde *Xi-X_B-Hom* besonders stark, mit der Sonde *Xi-X_C* schwach und mit *Xi-X_B* nicht detektierbar. Diese unterschiedlichen Signalintensitäten, detektiert mit den Subsonden von *Xi-X* in verschiedenen Herz-Präparaten, sprechen eventuell, wie für die Lebertranskripte beobachtet werden konnte (siehe S. 166), für zwei verschiedene 0,8 kb *Xi-X*-Transkripte in den Herzen. Diese Transkripte könnten durch alternative Spleißvorgänge eines primären Gentranskripts entstanden sein. Vermutlich sind zum Teil hier wieder andere Spleißvorgänge als in der Leber und Skelettmuskulatur aktiv. Zumindest das eine Transkript enthält die Homöobox, während die Sequenz Poly(GTCT) anscheinend abwesend ist.

Auch ein Transkript von 1,5 kb konnte in den Herzen ausschließlich mit der Sonde *Xi-X_B* detektiert werden (siehe Abb. 57, S. 172 und Abb. 61, S. 180).

Die RNA isoliert aus Darm, präpariert aus männlichen Tieren von *X. helleri*, zeigte mit keiner der Sonden *Xi-X_A*, *Xi-X_B* oder *Xi-X_C* eine erkennbare *Xi-X* Expression (siehe Abb. 57, S. 172). Der Gehalt an **glatten Muskelzellen** im Darm ist relativ hoch, und ein negatives Ergebnis der Transkriptionsanalysen kann, jedenfalls im Vergleich zu der hohen 2,3 kb Transkriptionsrate in der Skelettmuskulatur, eine vergleichbare hohe *Xi-X* Transkription in der glatten, visceralen Muskulatur unwahrscheinlich machen. Das Darm-Präparat zeigte auch nicht die 1,8 kb und 1,6 kb Aktin-Transkripte, die für die Skelettmuskulatur bzw. Herzmuskulatur charakteristisch sind.

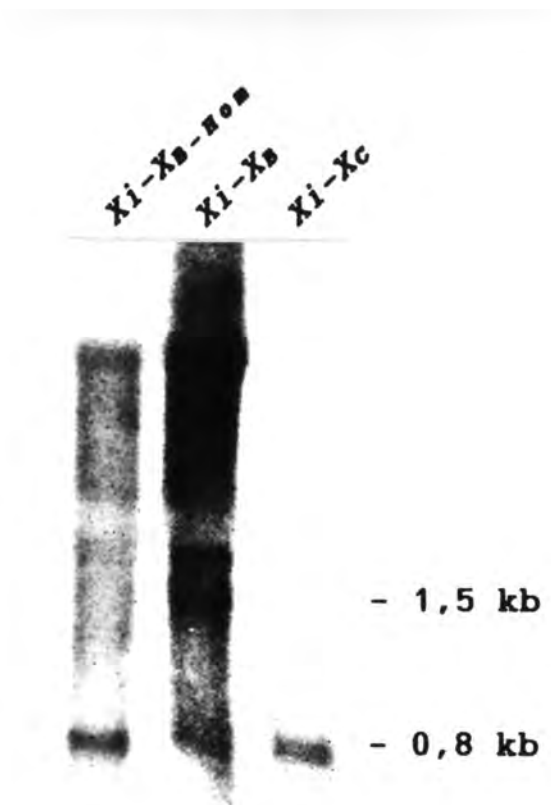


Abb. 61

***Xi-X* Transkripte in den Herzen, nachgewiesen mit verschiedenen Subsonden von *Xi-X*.**

Die RNA, die mit der Sonde *Xi-X_B-Hom* hybridisiert wurde, stammt aus Rückkreuzungsbastarden mit *Sd* und *Sd^T*. Die RNA, die mit den Sonden *Xi-X_B* bzw. *Xi-X_C* hybridisiert wurde, stammt aus männlichen Tieren von *X. helleri*.

***Xi-X* Expression in der Haut**

Die ersten Haut-Präparate zeigten in Northern Analysen mit der Sonde *Xi-X_B* ein Transkript von 2,3 kb für *X. maculatus DrSd/ArSr*, während die Haut, präpariert aus *X. helleri* bzw. aus Rückkreuzungsbastarden mit dem Pigmentzelllocus *Dr*, negativ waren (siehe Abb. 62A, S. 182). Als festgestellt wurde, dass die Skelettmuskulatur eine hohe *Xi-X_B* Expression aufweist (siehe S. 173), musste die Frage gestellt werden, inwieweit das 2,3 kb Transkript, beobachtet in der Haut der Platyfische, auf eine Muskelkontamination zurückzuführen war. Weil die Skelettmuskulatur ein Aktin-Transkript von 1,8 kb synthetisiert, müsste, wenn die *Xi-X* Signale von kontaminierenden Muskelzellen abstammten, dieses Aktin-Transkript vorhanden sein. Dieses Transkript war in allen der erwähnten RNA-Isolaten schwach zu beobachten, ohne dass das Isolat von *X. maculatus* eine erhöhte Intensität erwies. Spätere Haut-Präparate wurden mit großer Sorgfalt von Muskelgewebe befreit; alle Präparate zeigten ein relativ schwaches

1,8 kb Aktin-Transkript, das an Intensität vergleichbar mit dem 2,2 kb Aktin-Transkript war (siehe Abb. 62B/C, S. 182).

In einer Versuchsreihe wurden verschiedene Mengen an Skelettmuskelgewebe zu den Haut-Präparaten bei der RNA-Extraktion zugesetzt (siehe Abb. 62B, S. 182). Die Zugabe von Skelettmuskulatur, 10% (w/w) des Hautgewichtes, zeigte eine deutliche Erhöhung der Signal-Intensität des 1,8 kb Aktin-Transkriptes und ein paralleles Auftreten einer *Xi-X* Expression. Die Zugabe von Skelettmuskulatur von etwa 5% des Hautgewichtes zeigte kaum eine Intensitätserhöhung der Aktin-Bande und ein kaum detektierbares *Xi-X* Transkript. 5% Muskelgewebe (w/w) gibt damit die Grenze für kontaminierende Muskelzellen an, die für diese spezifische Fragestellung einen Hintergrund erzeugen würde. Muskelgewebe mit einem Gewicht von über 25 mg ist auf jeden Fall deutlich sichtbar und kann von den Haut-Präparaten entfernt werden. Es ist offensichtlich, dass das 1,8 kb Aktin-Transkript und das 2,3 kb *Xi-X* Transkript mit der Menge an Skelettmuskulatur in den Haut-Präparaten korreliert. Das beschriebene Haut-Präparat von *X. maculatus* (siehe oben, Abb. 62A, S. 182) zeigte kein verstärktes Signal des 1,8 kb Aktin-Transkripts, weder im Vergleich zu den Haut-Präparaten ohne nachweisbare *Xi-X* Transkription, noch zu dem 2,2 kb Aktin-Transkript in demselben RNA-Isolat. Das 2,3 kb *Xi-X* Transkript muss demnach der Haut von *X. maculatus* selbst, und keinen kontaminierenden Skelettmuskelzellen, zugeschrieben werden.

Abb. 62C (siehe S. 182) vergleicht die Expression von Aktin und *Xi-X* in RNA aus einem Muskel- und aus einem Haut-Präparat von *X. helleri*. Die Menge an Skelettmuskel-RNA, ca. 2 µg, wird durch eine bestimmte Intensität des 1,8 kb Aktin-Transkripts und des 2,3 kb *Xi-X* Transkripts wiedergegeben. Obwohl ein Haut-Präparat, ca. 20 µg RNA wurde eingesetzt, die gleiche Intensität des 1,8 kb Aktin-Transkripts, wie die Skelettmuskulatur mit 2 µg RNA, aufweist, zeigt die Haut keine entsprechende *Xi-X* Expression. Da die Haut selbst keine Skelettmuskelzellen besitzt, und auch ohne nachweisbare, kontaminierende Skelettmuskulatur präpariert werden kann (siehe oben), muss angenommen werden, dass das 1,8 kb Aktin-Transkript, nachgewiesen in der Haut, nicht in den Skelettmuskelzellen gebildet wird, sondern hierfür andere Zellen verantwortlich sind. Diese Zellen produzieren nicht, jedenfalls nicht im vergleichbaren Maße wie die Skelettmuskelzellen, das 2,3 kb *Xi-X* Transkript. Dieses Phänomen kann auch für Kiemen (siehe S. 171) und Flossen (siehe S. 186) beobachtet werden.

Studien der Zelllinien (siehe S. 183), des Peritoneums (siehe S. 196), der Flossen (siehe S. 186) und des Melanoms (siehe S. 194) geben Hinweise darauf, dass ein *Xi-X* Transkript von 2,3 kb in Pigmentzellen produziert wird.

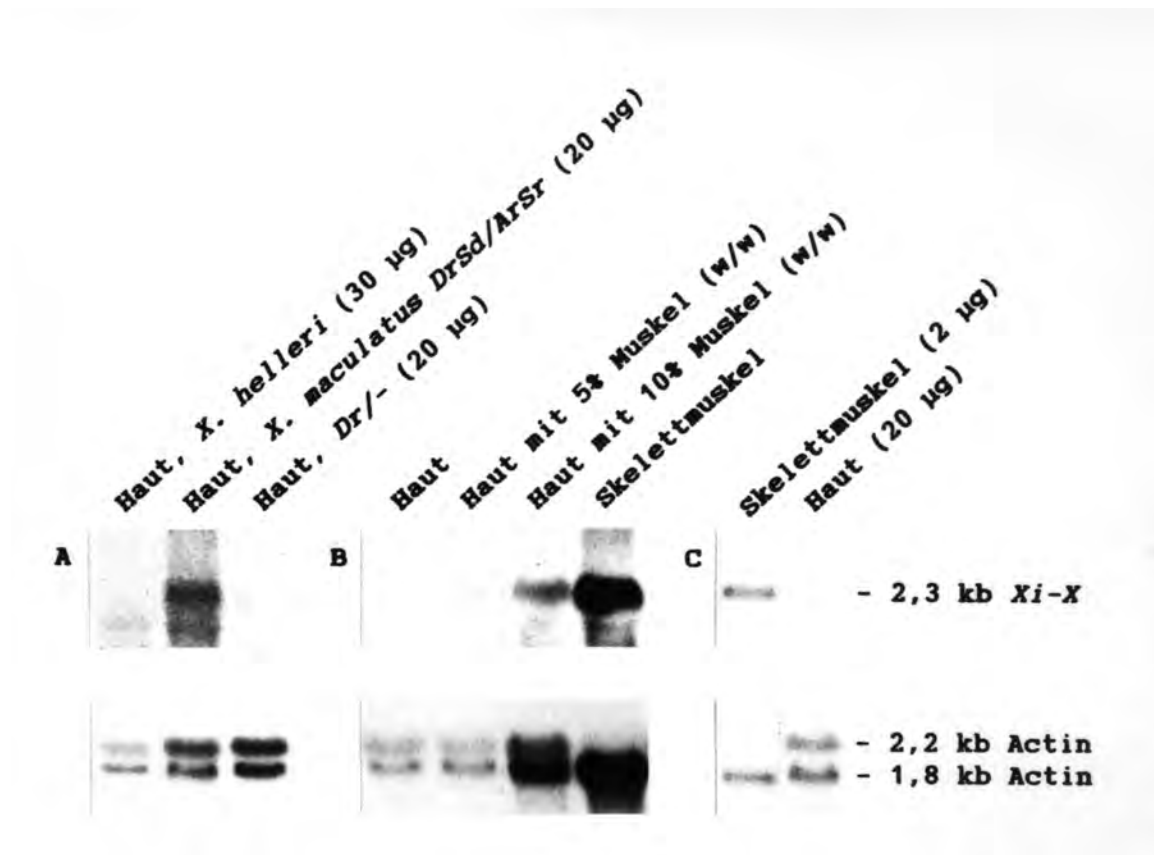


Abb. 62

Die Expression von *Xi-X* und Aktin in der Haut und Skelettmuskulatur von *Xiphophorus*.

Die Subsonde *Xi-X_B* wurde für den *Xi-X* Nachweis eingesetzt.

A) Vergleichende Expression von *Xi-X* und Aktin in der Haut, präpariert aus *X. helleri*, *X. maculatus DrSd/ArSr* und aus Rückkreuzungsbastarden mit *Dr*.

B) Untersuchungen zum Einfluss von kontaminierender Skelettmuskulatur in Haut-Präparaten von PSPM-freien Rückkreuzungsbastarden auf die *Xi-X* und Aktin Expression. Jeweils insgesamt 20 µg Gesamt-RNA wurden pro Gelspur eingesetzt. Die Haut wurde sorgfältig ohne sichtbare kontaminierende Muskulatur präpariert.

C) Haut und Skelettmuskulatur aus *X. helleri*.

Nur große Fische wurden für die weiteren Hautuntersuchungen verwendet, denn hier konnte die Haut einfacher und ohne sichtbare Muskelkontamination abgehoben werden. Es wurde die Haut von *X. helleri*, Weibchen und Männchen, *X. helleri* mit *Db* und von Rückkreuzungsbastarden mit den Pigmentzellloci *DrSd*, *Dr*, *Sd^T*, *YeLi* bzw. *DySp* sowie für Rückkreuzungsbastarde ohne PSPM untersucht. Das Haut-Präparat von Rückkreuzungsbastarden mit *DrSd* bzw. *Sd^T* zeigten sehr schwache Transkripte in den Bereichen von 2,3 kb und 1,5 kb (siehe Abb. 70, S. 198). Transkripte der gleichen Länge konnten für Haut-Präparate von *X. helleri*, Männchen, und PSPM-freien Rückkreuzungsbastarden nur erahnt werden. Die anderen untersuchten Phänotypen, bei denen keine spezifischen Transkripte nachgewiesen werden konnten, müssen nicht unbedingt ein anderes Transkriptionsmuster, als die Fische mit schwachen, positiven Banden vorweisen. Die sehr schwachen Signale kommen wahrscheinlich nur unter idealen Versuchsbedingungen und wenig Hintergrundfärbung zum Vorschein. Die Transkripte von 1,5 und 2,3 kb beziehen sich vermutlich auf die Pigmentzellen der Haut (siehe die weiteren Ergebnisse).

***Xi-X* Expression in Zelllinien**

Eine Anzahl von Zelllinien wurde auf die Expression von *Xi-X* untersucht; einerseits die seit längerer Zeit im genetischen Institut bestehenden, xiphophorinen Zelllinien BST, A₂ und PSM und andererseits die neu etablierten xiphophorinen Zelllinien DRLI, FM und LUNA. Zusätzlich wurde die Expression von *Xi-X* in Zelllinien des Zebrafisches (*Danio rerio*), des gefleckten Panzerwelses (*Corydoras paleatus*) und in einer Reptilien-Zelllinie (*Vipera russelli*) untersucht.

Die Aktin-Transkripte betragen bei allen untersuchten, xiphophorinen Zelllinien 2,2 kb. Die nicht-xiphophorinen Zelllinien zeigten Aktin-Transkriptlängen, die bei *Xiphophorus* nicht beobachtet werden konnten.

Die Zelllinien BST, A₂ (nicht gezeigt), LUNA und FM (siehe Abb. 63, S. 184) zeigten mit der Sonde *Xi-X_B* keine Transkripte von *Xi-X*.

Die Zelllinie PSM wies mit der Sonde *Xi-X_B* ein Transkript von ca. 1,5 kb auf (siehe Abb. 69C, S. 195). Die Zelllinie PSM ist vom Melanom angelegt worden, und die Expressionsbefunde sprechen für eine Produktion des 1,5 kb Transkripts in den Melanomzellen. Dies konnte durch das Auftreten eines 1,5 kb *Xi-X* Transkripts auch im nativen Melanom (siehe Abb. 69C, S. 195) bestätigt werden. Zusätzlich zeigten die PSM-Zellen Transkripte größerer Länge, die entweder einer unspezifischen Färbung durch häufig vorkommende Transkripte dieser Zellen entsprechen, wie im Ethidiumbromid-gefärbten Gel zu beobachten ist (nicht gezeigt), oder sie repräsentieren zellspezifische Transkripte, die eventuell durch die Zellkultivierung bedingt sind.

Die Zelllinie DRLI (siehe S. 205ff.) zeigte mit der Sonde *Xi-X_B* zwei Transkripte von ca. 1,5 kb bzw. 2,3 kb (siehe Abb. 63, S. 184 und Abb. 64, S. 186). Wie Untersuchungen der Zelllinie mit monoklonalen Antikörpern gezeigt hatten (siehe S. 207), konnten humane, melanocyten-spezifische Antigene in der Zellkultur nachgewiesen werden. Dieser Befund bestätigt den Ursprung des 1,5 kb Transkripts aus den Pigmentzellen. Ein 2,3 kb *Xi-X* Transkript konnte der Skelettmuskulatur zugeordnet werden (siehe S. 173).

ERGEBNISSE

Die Zelllinie DRLi zeigte aber entweder eine Anwesenheit von muskelspezifischen Antigenen (siehe S. 207) oder von skelettmuskelspezifischen 1,8 kb Aktin-Transkripten, was die Synthese des 2,3 kb Transkripts auch in anderen Zellen, als den Skelettmuskelzellen nahelegt. Vielleicht sind die Syntheseorte die silbernden, schwarzen oder roten Pigmentzellen, worauf Studien der Flossen (siehe S. 186) und des Peritoneums (siehe S. 196) Hinweise geben konnten.

Keine anderen Subregionen von *Xi-X* konnten in den Transkripten von 2,3 kb und 1,5 kb nachgewiesen werden.

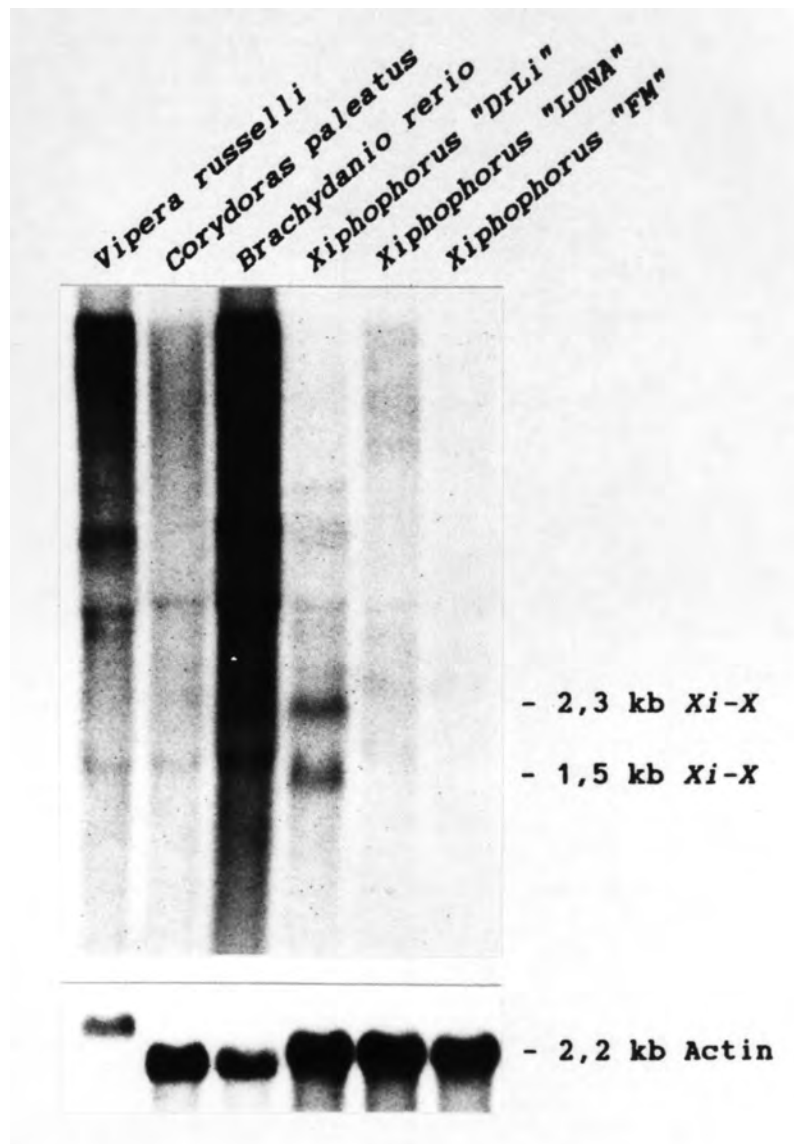


Abb. 63

Die Expression von *Xi-X* und Aktin in verschiedenen Zelllinien.

Die Subsonde *Xi-X_B* wurde für den *Xi-X* Nachweis eingesetzt.

In der Zellkultur DRLI (siehe S. 205ff.) konnten zwei verschiedene Zellformen beobachtet werden: Die meisten Zellen hatten eine fibroblastoide Morphologie. In nur geringer Anzahl konnten zusätzlich epitheloide Zellen beobachtet werden. Wie durch eine Subkultivierung der epitheloiden Zellen gezeigt werden konnte, representieren die beiden Zellformen wahrscheinlich verschiedene Differenzierungsstufen eines Zelltyps, die miteinander in einem Gleichgewicht stehen. Durch eine Behandlung mit Retinsäure wurden die Zellen zur Differenzierung induziert; nach der Behandlung waren die fibroblastoiden Zellen nicht mehr anwesend, sondern nur dendritische und epitheloide Zellen waren nachzuweisen. Das 1,5 kb Transkript, das in den unbehandelten Zellen vorhanden war, verschwand in den behandelten Zellen, das 2,3 kb Transkript jedoch war weiterhin vertreten (siehe Abb. 64, S. 186). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Produktion der beiden *Xi-X* Transkripte mit dem Differenzierungszustand der Zellen korreliert. Das 1,5 kb Transkript ist anscheinend ausschließlich mit den fibroblastoiden Zellen verbunden. Das 2,3 kb Transkript korreliert vermutlich mit den differenzierteren Stadien, wie den dendritischen und epitheloiden Zellformen. Es ist davon auszugehen, dass in den unbehandelten Zellen auch die dort anwesenden, epitheloiden Zellen das 2,3 kb Transkript synthetisieren. Ob die fibroblastoiden Zellen ebenfalls ein Produktionsort des 2,3 kb Transkripts sind, kann mit den beschriebenen Versuchen nicht beantwortet werden. Die Intensität der 2,3 kb Bande der stimulierten Zellen ist stärker als bei den unstimulierten Zellen. Entweder müsste die wenigen epitheloiden, unstimulierten Zellen eine sehr hohe Expressionsrate des 2,3 kb Transkripts und die fibroblastoiden Zellen keine Expression aufweisen, oder die fibroblastoiden Zellen produzieren das 2,3 kb Transkript, aber in einem geringeren Anteil als die differenzierteren Formen. Studien über sich regenerierenden Flossen von *X. helleri* und Rückkreuzungsbastarden mit *Dr* (siehe S. 190) sprechen für diese letzte Möglichkeit.

Weitere Untersuchungen müssen klären, ob die fibroblastoiden Zellen die Melanoblasten und die dendritischen und epitheloiden Zellen die Melanocyten bzw. Melanophoren representieren oder vielleicht der Differenzierungsreihe der Pterinophoren angehören.

In den nicht-xiphophorinen Zelllinien, angelegt vom Zebrafisch, vom gefleckten Panzerwels und von Reptilien, konnten keine spezifische *Xi-X* Transkripte mit der Sonde *Xi-X_B* nachgewiesen werden (siehe Abb. 63, S. 184). Die aus der Zebrafisch-Zelllinie isolierte RNA, zeigte eine Schwarzfärbung der gesamten Gelspur. Dieses beinhaltet einen Unterschied im Expressionsmuster von *Xi-X* bei *Xiphophorus* im Vergleich zu einigen anderen Tierarten, der wahrscheinlich auf der hochrepetitiven Sequenz Poly(GTCT) bzw. Poly(GACA) beruht. Die meist eindeutigen Transkript-Banden in den Northern Analysen bei *Xiphophorus* sprechen dafür, dass der repetitive Bereich in *Xiphophorus* nur in einem Gen oder wenigen Genen exprimiert wird. Bei anderen Tierarten, besonders beim Zebrafisch, kommen die Poly(GTCT)/(GTCT/GACA)-Sequenzen anscheinend in sehr vielen, verschiedenen Gentranskripten vor.



Abb. 64

Die Expression von *Xi-X* und Aktin in der Zelllinie DRL1 vor und nach der retinsäure-induzierten Differenzierung.

Die Subsonde *Xi-X_B* wurde für den *Xi-X* Nachweis eingesetzt.

***Xi-X* Expression in Flossen**

Für die Flossenstudien wurden hauptsächlich die Rückenflossen, nur in einer Untersuchung die Schwanzflossen, benutzt. Die Rückenflossen wurden im Abstand von ca. 1-2 mm von der Körperseite abgeschnitten; von den Schwanzflossen wurden nur die Regionen, die außerhalb der Schwerte lagen, eingesetzt.

Mit der Sonde *Xi-X_B* wurden Transkripte von ca. 1,5 kb und 2,3 kb in den Rückenflossen der Fische nachgewiesen. Mit der RNA, die hohe Intensitäten der beiden Transkripte aufwies (die regenerierenden Flossen von *Dr*, siehe S. 190), wurde die Anwesenheit der verschiedenen Subregionen von *Xi-X* in den Transkripten untersucht (nicht gezeigt). Es wurden nicht-stringente Bedingungen der Hybridisierung mit ca. $0,8-1 \times 10^6$ cpm markierter Probe pro ml Hybridisierungslösung und nicht-stringente Waschbedingungen verwendet. Dabei konnte nur die Sonde *Xi-X_{B-Rep}* ein Hybridisierungssignal hervorrufen, keine andere Subregionen von *Xi-X* waren in den Transkripten nachweisbar.

Die Anwesenheit und Intensität der jeweiligen Transkripte von 1,5 kb und 2,3 kb variierte mit den Pigmentzellmustern der Fische (siehe Abb. 65, S. 188). Bei allen untersuchten Flossen erzeugte das 1,5 kb Transkript eine deutlich hervortretende Bande. Das 2,3 kb Transkript kam nur in den Rückenflossen der Rückkreuzungsbastarde mit dem Phänotyp *Dr* und in Rückenflossen von *X. helleri* und PSPM-freien Bastarden zum Vorschein. Für die Rückkreuzungsbastarde mit dem Phänotyp *Dr* trat das Transkript in vergleichbarer Stärke wie das 1,5 kb Transkript auf. Für *X. helleri* und PSPM-freie Rückkreuzungsbastarde, die phänotypisch gleich sind, war das 1,5 kb Transkript von einer viel stärkeren Intensität, als das 2,3 kb Transkriptsignal. Im Gegensatz hierzu kam das 2,3 kb Transkript in den Rückkreuzungsbastarden mit den Pigmentzellloci *DySp* nicht zum Vorschein. Das Vorhandensein des 2,3 kb Transkripts korrelierte mit der Anwesenheit der roten Pigmentzellen: Die *Dr*-Flossen waren stark mit rot pigmentierten Zellen besiedelt, die Flossen von *X. helleri* und den PSPM-freien Rückkreuzungsbastarden besaßen rote Flecken, jedoch die verwendeten *DySp*-Flossen wiesen keine roten Pigmentzellen auf. Es muss angenommen werden, dass die rot pigmentierten Zellen, eventuell auch deren Vorstufen, das Transkript von 2,3 kb synthetisieren. Ein Ursprung des 1,5 kb Transkripts kann durch Analysen der Melanom-Zelllinie PSM (siehe S. 183) und des nativen Melanoms (siehe S. 194) den schwarzen Pigmentzellen zugeordnet werden.

Die Skelettmuskulatur zeigt eine hohe Anwesenheit von *Xi-X*-Transkripten mit 2,3 kb Länge (siehe S. 173). Es ist unwahrscheinlich, dass die beobachteten 2,3 kb Transkripte in den Flossen auf die Muskelzellen zurückzuführen sind, denn die phänotypisch verschiedenen Flossen besitzen alle die gleiche Intensität des ausschließlich in Skelettmuskelzellen einzig vorkommenden 1,8 kb Aktin-Transkripts. Die Intensität des 1,8 kb Transkripts würde, wie Studien der Haut gezeigt hatten (siehe S. 180), bei einer unterschiedlichen Anwesenheit von Skelettmuskelzellen in den Flossen mit der Intensität des 2,3 kb *Xi-X*-Muskeltranskripts korrelieren. Es ist auch unwahrscheinlich, dass Fische innerhalb der Gattung *Xiphophorus* einen unterschiedlichen Flossenbau in bezug auf Muskelzellen aufweisen.

Ausschließlich das 1,5 kb Transkript konnte in der Schwanzflosse von *X. helleri* nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die beiden Flossentypen von *X. helleri*, die Rückenflosse bzw. die Schwanzflosse, unterscheiden sich in der Anwesenheit von Pigmentzellen: Die benutzte Region der Schwanzflosse besaß, wie die Rückenflosse von *DySp*, nur Mikromelanophoren und kleine Xanthophoren, und dementsprechend nur das Transkript von 1,5 kb. Die Rückenflosse von *X. helleri* hat zusätzlich zu diesen beiden Pigmentzelltypen auch Flecken mit roten Pigmentzellen und dadurch zusätzlich ein 2,3 kb *Xi-X*-Transkript. Dieser Befund unterstützt die Annahme, dass das 2,3 kb Transkript mit der Anwesenheit von roten Pigmentzellen korreliert.

In einer weiteren Untersuchung wurden die Rückenflossen von Rückkreuzungsbastarden mit *Dr* in distale und proximale Hälften unterteilt. Die proximalen Hälften, die eine viel höhere Konzentration der roten Pigmentzellen besitzen, zeigten eine deutlich stärkere Intensität der 2,3 kb Hybridisierungssignale als die 1,5 kb Signale (nicht gezeigt). Dieser Befund bestätigt wieder die Annahme, dass das Transkript von 2,3 kb in den roten Pigmentzellen produziert wird.

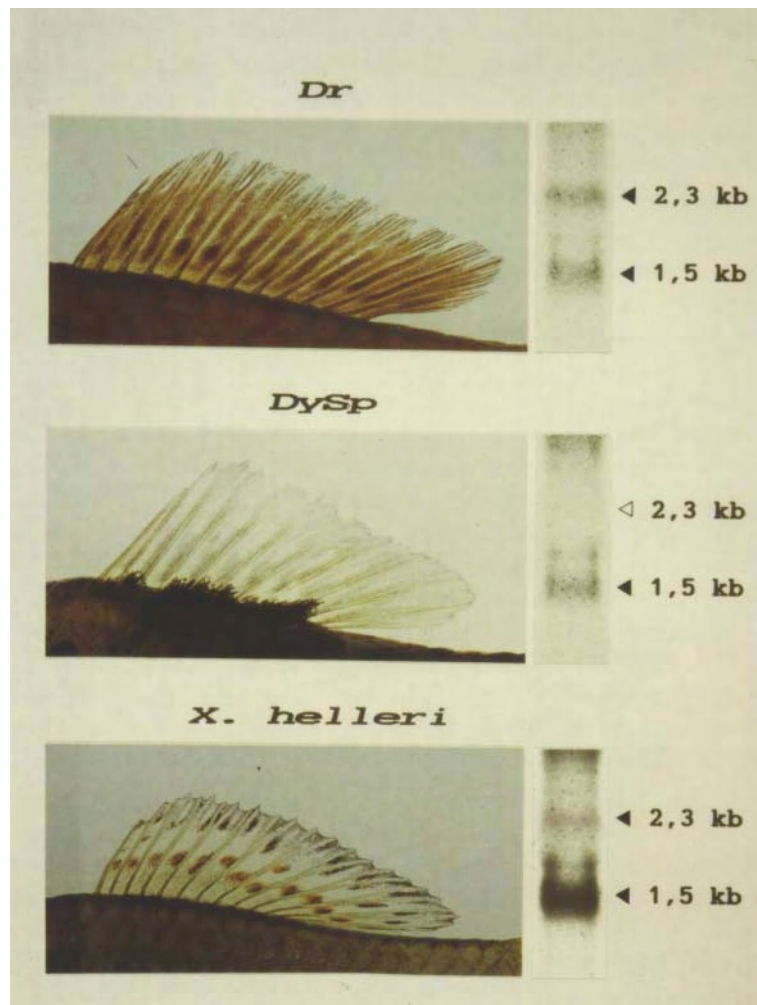


Abb. 65

Transkripte nachgewiesen mit der Sonde $Xi-X_B$ in Rückenflossen von *X. helleri* und von Rückkreuzungsbastarden mit den Phänotypen *DySp* bzw. *Dr*.

Rückenflossen von *X. helleri* und PSPM-freien Rückkreuzungsbastarden zeigten in den Northern Analysen ein 1,5 kb Transkript, das im Vergleich zu dem 2,3 kb Transkript eine viel stärkere Intensität besaß. In den meisten Flossen-Präparaten war diese Intensität viel stärker, als in Rückenflossen von Fischen mit dem Faktor *Dr* (Rückkreuzungsbastarde mit *DrSd* bzw. *Dr*), die eine vergleichbar starke Intensität der beiden Banden aufwiesen. In einem Experiment wurden aus den Flossen von *X. helleri* die Regionen mit roten Flecken herausgeschnitten und getrennt analysiert (nicht gezeigt). Die RNA, die von den Regionen der roten Flecken isoliert wurde, zeigte wieder eine schwächere Erscheinung der 1,5 kb Bande, verglichen mit dem Rest der Flossen. Anscheinend führt eine hohe Anwesenheit der roten Pigmentzellen zu einer Reduktion der Synthese des 1,5 kb Transkripts. Diese Verschiebung der Bandenintensitäten kann durch eine unterschiedliche Anwesenheit von Pigmentzellen in den entsprechenden Flossen und Flossenbereichen erklärt werden:

Wie in der Abb. 66A (siehe S. 191), die eine Vergrößerung eines roten Fleckes der Rückenflosse von *X. helleri* zeigt, zu sehen ist, besitzen die roten Flecken in den Flossen sehr wenige Xanthophoren. Es scheint, als ob die Xanthophoren, die außerhalb des Fleckes zahlreich vorkommen, durch ein Differenzierungssignal, das in der Mitte des Fleckes am stärksten ist und nach außen abnimmt, die Xanthophoren zu Erythrophoren differenzieren lässt. Einige Melanophoren haben im Fleck an Größe zugenommen und könnten als Makromelanophoren beschrieben werden. Die Mikromelanophoren können bei einer genauen Inspektion auch im Pigmentfleck beobachtet werden. Der Übergang der verschiedenen Differenzierungsstufen sind deutlich zu beobachten: Die kleinen Xanthophoren nehmen während der Differenzierung immer an Größe zu; erst werden sie zu größeren, gelben Zellen, die über Zwischenstufen der Xanthoerythrophoren (mit einer gelben Zellmitte und einer roten Peripherie) zu den großen Erythrophoren (mit ausschließlich roten Pigmenten) führt. Die schwarzen Pigmentzellen nehmen immer zum Zentrum des Fleckes an Größe zu und haben im Fleckinneren einen ca. 5-fach größeren Durchmesser als die Mikromelanophoren. Bei den Erythrophoren nimmt der Zelldiameter um das ca. 3-fache zu. Die Melanophoren im Fleckinneren sind etwas größer als die Erythrophoren, die sich hier befinden. Die Abnahme in der Intensität des 1,5 kb Transkripts hängt anscheinend mit der zunehmenden Pigmentzell-Differenzierung zusammen; weniger Xanthophoren und ein vermehrtes Auftreten von Xanthoerythrophoren, Erythrophoren und Makromelanophoren führt zu einer Abnahme der Intensität der 1,5 kb Transkripte und, wie durch Vergleiche der Flossen verschiedener Phänotypen gezeigt werden konnte, zu einem Auftreten der 2,3 kb Transkripte. Vermutlich kann man aus diesen Befunden schließen, dass auch die Xanthophoren, zusätzlich zu den Melanophoren, ein Transkript von 1,5 kb produzieren. Das Transkript verschwindet, oder nimmt an Intensität während einer weiteren Differenzierung dieser Zellen ab. Diese Ergebnisse stimmen mit dem differenzierungs-induzierten Verlust des 1,5 kb Transkripts in der Zelllinie DRLI überein (siehe S. 183).

Die Rückenflossen von Rückkreuzungsbastarden mit *DySp* besitzen im Vergleich zu der Rückenflosse von *X. helleri* und PSPM-freien Rückkreuzungsbastarden weniger Xanthophoren (nicht gezeigt), was auch in der Bezeichnung *Dy* („diluted yellow“) zum Ausdruck kommt. Auch die Mikromelanophoren sind spärlich vorhanden. Einen geringen Anteil dieser beiden Pigmentzellen erklären die schwächere Erscheinung des 1,5 kb Transkripts.

Eine Vergrößerung der Rückenflosse eines Rückkreuzungsbastards mit *Dr* (siehe Abb. 66B, S. 191) zeigt ein anderes Pigmentzellmuster, als das von der Rückenflosse von *X. helleri* (siehe Abb. 66A, S. 191) und Rückkreuzungsbastarden mit *DySp*. Die Flosse ist mit rot pigmentierten Zellen, meistens Xanthoerythrophoren, besiedelt. Keine Xanthophoren können beobachtet werden. Die Melanophoren sind von mittlerer Größe, etwas kleiner oder gleich groß wie die Xanthoerythrophoren. Diese beide Zelltypen gehören einer mittel-differenzierten Form an, die zwischen Mikromelanophoren und Xanthophoren und den terminal differenzierten Makromelanophoren und Erythrophoren stehen. Auffallend sind die freien Regionen, die die gut verteilten Melanophoren umgeben. Die Xanthoerythrophoren füllen die restlichen Areale aus. Die proximalen Regionen der Flossen sind durch stärker rot pigmentierte Zellen charakterisiert und die distalen Regionen besitzen mehr Melanophoren. Die beobachteten 1,5 kb und 2,3 kb-Transkripte in den *Dr*-Flossen könnten beide sowohl auf die Melanophoren, als auch auf die Xanthoerythrophoren zurückzuführen sein. Die geringe Intensität des 1,5 kb

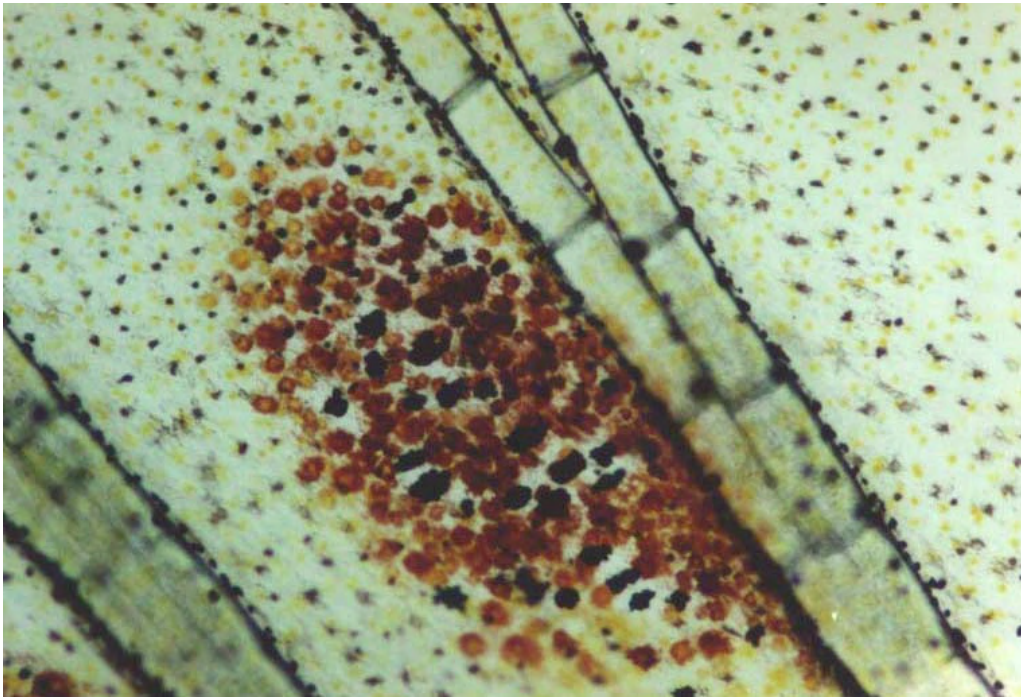
Transkripts in *Dr*-Flossen verglichen mit *X. helleri*-Flossen kann durch die Abwesenheit der Xanthophoren bzw. Mikromelanophoren in den *Dr*-Flossen hervorgerufen sein. Durch die weitere Differenzierung dieser Zellen kann die Konzentration der 1,5 kb Transkripte in den Zellen abgenommen haben.

***Xi-X* Expression in sich regenerierenden Rückenflossen**

Nach dem Abschneiden der Rückenflossen regenerierte diese vollständig während einer Periode von ca. zwei Monaten (siehe Abb. 67, S. 192). Die sich **regenerierenden Flossen** erschienen zuerst weiß, ohne die charakteristische Grundfärbung oder spezifische Färbung der ursprünglichen Flossen. Nach ca. 2-3 Wochen wurden die neuen Flossen mit Pigmentzellen besiedelt, die anfangs nur mikroskopisch zu beobachten waren. Nach vier bis fünf Wochen wurde auch die Färbung ohne Mikroskop sichtbar. Bei den ca. 2 Wochen alten Flossen von *X. helleri* konnten an den distalen Enden der Flossenstrahlen große Bereiche mit wuchernden Zellen beobachtet werden (nicht gezeigt). Anscheinend werden die neuen Flossen von diesen Bereichen wieder aufgebaut, hier proliferieren die Zellen und vermutlich wandern die Zellen, wie für die Pigmentzellen durch ihre langgestreckte Form zu entnehmen ist, von diesen proliferativen Bereichen den dorsalen Rand entlang und besiedeln die Areale zwischen den Flossenstrahlen.

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit RNA aus 2-3 Wochen alten, sich regenerierenden Flossen von *X. helleri* und von Rückkreuzungsbastarden mit *Dr* isoliert. Die sich regenerierenden Flossen hatten zu dieser Zeit eine Länge von 2-3 mm. Die RNA, isoliert aus den sich regenerierenden Flossen von *Dr*, zeigte die beiden Transkripte von 1,5 kb und 2,3 kb, die auch in den ursprünglichen, voll ausgewachsenen Flossen zu beobachten waren. Die relativen Intensitäten der beiden Banden waren auch vergleichbar mit den relativen Intensitäten der Banden, nachgewiesen in der RNA der ursprünglichen Flossen. Die Expression insgesamt lag dagegen etwas höher bei den sich regenerierenden Flossen. Bei *X. helleri* war in den sich regenerierenden Flossen nur das Transkript von 1,5 kb sehr schwach zu sehen, das 2,3 kb Transkript kam überhaupt nicht zum Vorschein. Diese Befunde zeigen deutlich, dass schon bei der Bildung der Flossen Unterschiede in bezug auf Pigmentzellen bestehen. Wie auch mikroskopisch beobachtet werden konnte, waren die sich regenerierenden *Dr*-Flossen in den verwendeten Stadien mit sehr schwach, rötlich gefärbten Zellen besiedelt. Wahrscheinlich sind die beiden observierten Transkripte auf diese frühen Differenzierungsstufen der roten Pigmentzellen zurückzuführen. In den sich regenerierenden Flossen von *X. helleri* konnten entsprechende, schwach gefärbte, rote Zellen nicht auffindig gemacht werden, was die Abwesenheit des 2,3 kb Transkripts erklärt. Bei *X. helleri* konnten nur wenige, kleine Mikromelanophoren in den Flossen beobachtet werden, die wahrscheinlich für die Anwesenheit des sehr schwachen 1,5 kb Signals verantwortlich sind.

A



B

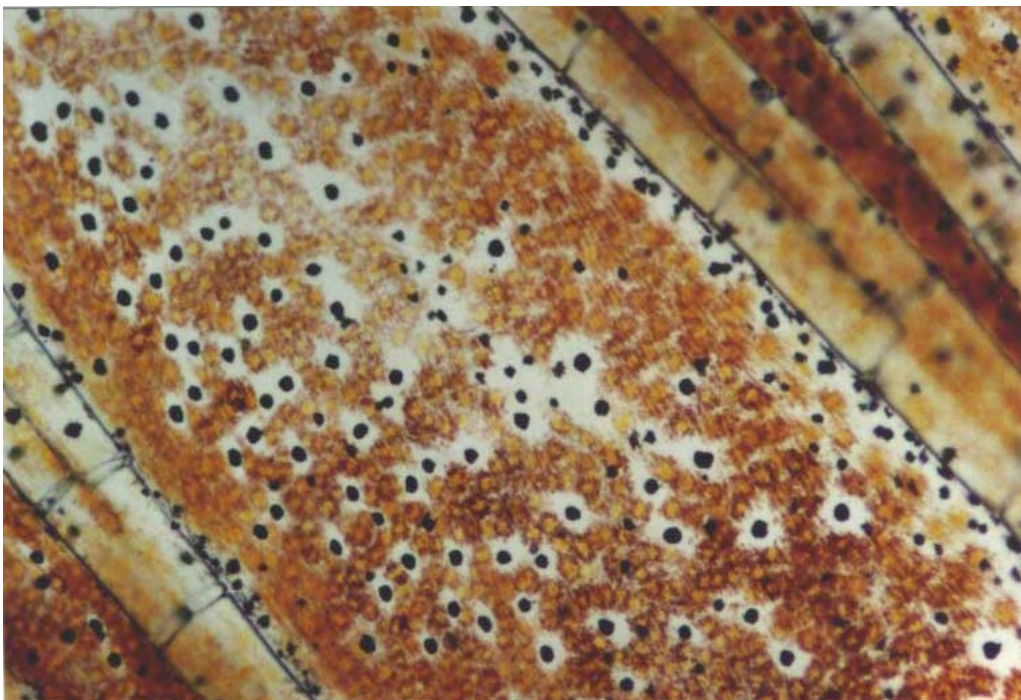


Abb. 66

Ausschnitte aus Rückenflossen von:

A) *X. helleri*

B) Rückkreuzungsbastard mit *Dr*

Vergrößerung 100x.

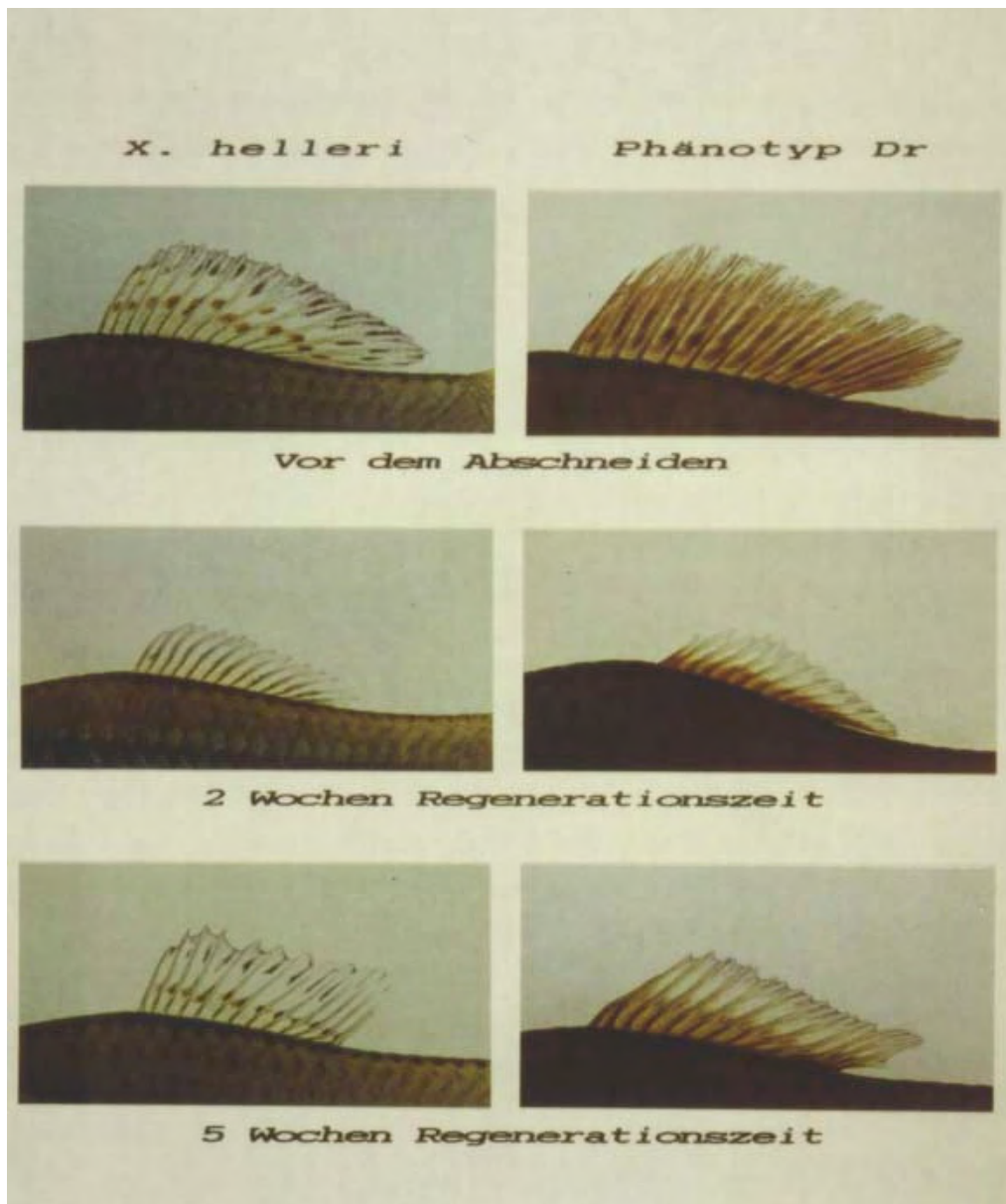


Abb. 67

Sich regenerierende Flossen von *X. helleri* und von Rückkreuzungsbastarden mit dem Pigmentzellmuster *Dr*.

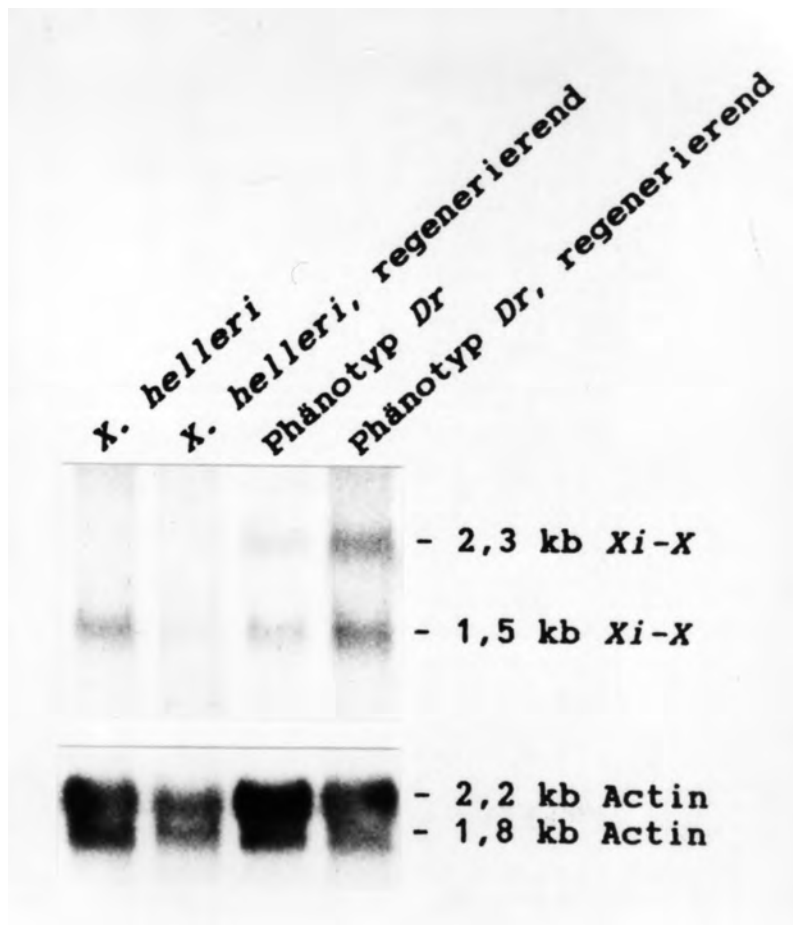


Abb. 68

Xi-X- und Aktin-Transkripte in den sich regenerierenden Flossen von *X. helleri* und von Rückkreuzungsbastarden mit dem Pigmentzellmuster *Dr*.

Die Subsonde *Xi-X_B* wurde für den *Xi-X* Nachweis eingesetzt.

***Xi-X* Expression im Melanom und in melanomtragenden Flossen**

RNA, isoliert aus **melanomtragenden Flossen** der Rückkreuzungsbastarde mit den Phänotypen *DrSd* bzw. *Sd^T*, zeigten mit der Sonde *Xi-X_B* Transkripte von 2,3 kb und 1,5 kb, sowohl für die Flossen mit benignem als auch für die Flossen mit malignem Melanom (siehe Abb. 69, S. 195). Die Intensität der beiden Banden für Flossen mit benignem Melanom war gleich der für die entsprechenden Flossen ohne Melanom, d.h. von Fischen mit dem Phänotyp *Dr* bzw. *X. helleri* und PSPM-freien Bastarden (siehe Abb. 69A, S. 195). Von *DrSd*-Flossen, die mit benignem Melanom besiedelt waren, wurden die melanomtragenden Regionen herausgeschnitten und getrennt untersucht. Die Intensitäten der beiden Banden in den isolierten Melanombereichen waren gleich denen, die für gesamte melanomtragende Flossen nachgewiesen worden waren (nicht gezeigt). Anscheinend tragen die zusätzlichen Melanomzellen, die in den Flossen mit einem benignem Melanom vorhanden sind, äußerst spärlich zu den beiden Transkripten bei (siehe auch unten).

Die *DrSd*-Flossen mit malignem Melanom zeigten eindeutig eine schwächere 2,3 kb Bande und eine stärkere 1,5 kb Bande als Flossen mit benignem Melanom (siehe Abb. 69B, S. 195). Spektrofotometrische Messungen ergaben in zwei unabhängigen, parallelen Analysen einen Unterschied mit dem Faktor 2,2 bzw. 4,0 zugunsten der 1,5 kb Transkripte in Flossen mit malignem Melanom; dagegen, in Flossen mit benignem Melanom war das Verhältnis 0,9 oder 0,4 betragend. Hiermit könnte Hinweise gegeben werden, dass die beiden Transkripte von 1,5 und 2,3 kb in den transformierten Melanocyten produziert werden. Die Konzentration der beiden Transkripte hängt mit dem Differenzierungsgrad der Zellen zusammen. Die undifferenzierten Stadien der bösartigen Zellen (vorwiegend Melanoblasten) produzieren hauptsächlich das 1,5 kb Transkript. Die mehr differenzierten Formen (vorwiegend Melanocyten) produzierten viel vom 2,3 kb Transkript. Wenn beim benignen Melanom kein Intensitätsunterschied im Vergleich zu nicht-melanomtragenden Flossen zu sehen ist (siehe oben), könnte dieses eine Mischung aus undifferenzierten und differenzierten Stadien, die beiden Transkripte in der gleichen Intensität produzieren, bedeuten. Diese Abhängigkeit der Produktion der jeweiligen Transkripte mit dem Differenzierungsgrad der Zellen, stimmt mit den Analysen der Zelllinie DRLI überein, bei der das 1,5 kb Transkript in den retinsäure-stimulierten, differenzierten Zellen abwesend ist.

Da das Gen *R_{Diff}* die Differenzierung der Melanocyten fördert, muss die Frage gestellt werden, ob das Genprodukt von *R_{Diff}* direkt mit der Genregulation bzw. dem differentiellen Spleißen des Gens *Xi-X* involviert ist, oder die verschiedene Transkripte nur indirekt durch den Differenzierungszustand der Zellen gespiegelt wird.

Sehr maligne Melanome, die dichte, dreidimensionale Wachstüme zeigten, wurden vorsichtig von den Rückenflossen der Rückkreuzungsbastarde mit *DrSd* bzw. *Sd^T* abgeschabt, damit eine Kontamination mit Flossenmaterial möglichst vermieden wurde. Die Masse war so groß, dass das Melanom von nur zwei bzw. einem Fisch für die Untersuchungen ausreichte. Dieser Versuch wurde unternommen, um die Transkription im Melanom *per se* zu untersuchen, was in den gesamten melanomtragenden Flossen nicht möglich war. Dass das Material hauptsächlich aus Melanomzellen bestand, wurde durch die ausschließliche Anwesenheit des 2,2 kb Aktin-Transkripts bestätigt; das 1,8 kb Aktin-Transkript, das in den ganzen Flossen vorhanden ist, war nicht nachweisbar. Die beiden sehr bösartigen Melanome zeigten Transkripte von 1,5 kb, die an Intensität

vergleichbar oder etwas schwächer waren als die Intensität, beobachtet in den *Dr*-Flossen (siehe Abb. 69C, unten). Dieser Befund bestätigte die Annahme, dass die Melanocyten-Reihe der Pigmentzellen das *Xi-X* Transkript von 1,5 kb produziert. Das Transkript von 2,3 kb kam nicht zum Vorschein. Obwohl der Anteil an schwarzen Pigmentzellen im Vergleich zu den Untersuchungen an ganzen Flossen erhöht war, war die gesamte Transkription von *Xi-X* nicht erhöht, sondern eher reduziert. Anscheinend ist die Funktion der *Xi-X* Transkripte nicht mit der Transformation oder Proliferation der Melanoblasten verbunden.

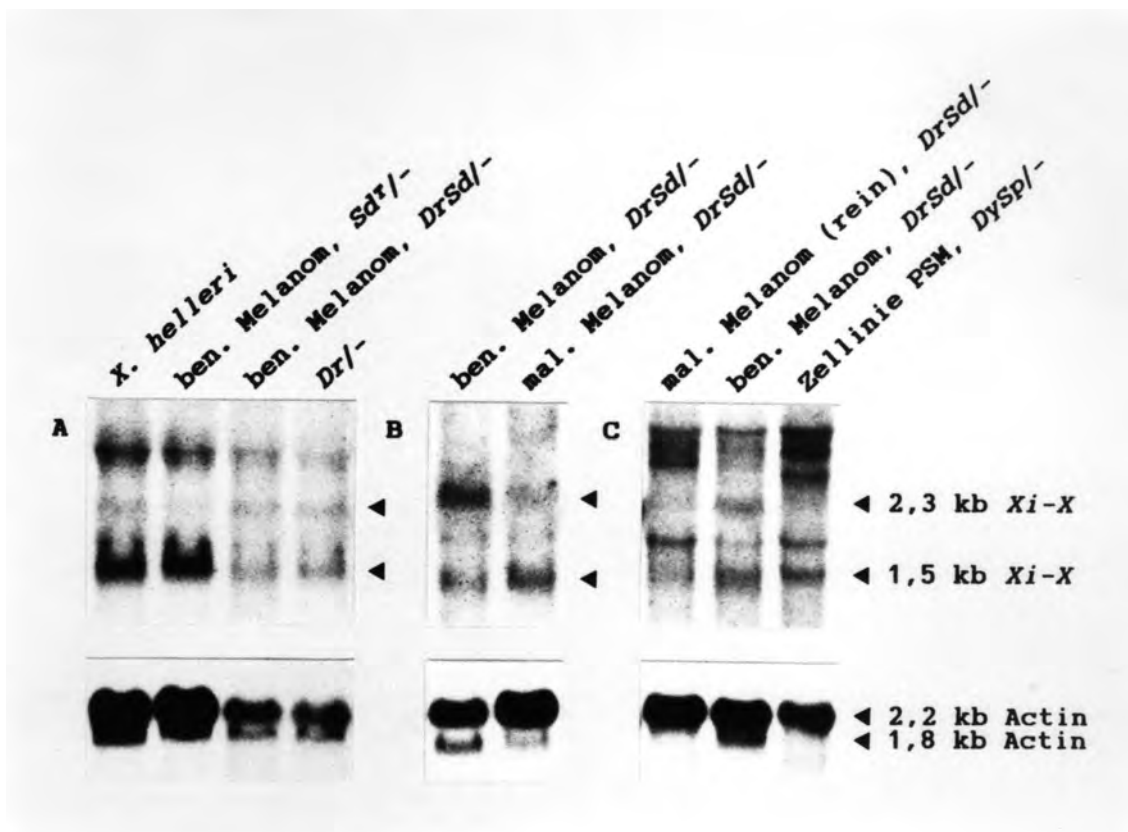


Abb. 69

***Xi-X* Expression im Melanom, in melanomtragenden Flossen und in der aus einem Melanom angelegte Zelllinie PSM.**

Die Subsonde *Xi-X_B* wurde für den *Xi-X* Nachweis eingesetzt.

A) Vergleich der Rückenflossen mit benignem (ben.) Melanom von Rückkreuzungsbastarden mit den Phänotypen *Sd^T* und *DrSd* mit den entsprechenden melanomfreien Flossen von *X. helleri* bzw. Rückkreuzungsbastarden mit dem Phänotyp *Dr*.

B) Vergleich der *Xi-X* Expression in Rückenflossen von Rückkreuzungsbastarden mit dem Phänotyp *DrSd* mit benignem (ben.) bzw. malignem (mal.) Melanom.

C) Die *Xi-X* Expression im reinen, sehr bösartigen Melanom, in Rückenflossen mit benignem Melanom und in der Zelllinie PSM. Die Zelllinie stammt aus einem Melanom eines Rückkreuzungsbastards mit dem Phänotyp *DySp*, die beiden anderen Melanome aus Rückkreuzungsbastarden mit dem Phänotyp *DrSd*.

***Xi-X* Expression im Peritoneum**

Um die *Xi-X* Transkription in den Pigmentzellen nachzuprüfen, wurde die RNA-Expression in Peritoneum, das ein schwarz-silberndes Aussehen hat, untersucht.

Bei großen Fischen von *X. helleri*, Männchen, und von Rückkreuzungsbastarden mit den Pigmentzellloci *DrSd* und *Sd^T* wurde das Peritoneum vorsichtig abpräpariert. Das Peritoneum war hier leicht anhaftend, so dass es ohne sichtbare Gewebe-Kontamination abgezogen werden konnte. Die aus Peritoneum isolierte RNA zeigte nur für die Präparation von den Rückkreuzungsbastarden mit *DrSd* und *Sd^T*, die zusammen untersucht wurden, ein Transkript von 2,3 kb, wenn mit der Sonde *Xi-X_B* hybridisiert wurde (siehe Abb. 70, S. 198). Die anderen Sonden riefen keine Hybridisierungssignale hervor. Das Präparat von *X. helleri* zeigte, trotz wiederholter Hybridisierungen, niemals ein positives Ergebnis (siehe Abb. 57, S. 172). Es war für die Interpretation dieser Ergebnisse wichtig, herauszufinden, ob das für Muskelzellen nachgewiesene 2,3 kb *Xi-X* Transkript von Muskelzellen des präparierten Gewebes der Rückkreuzungsbastarde abstammte. Durch die Hybridisierung mit Aktin konnte nur das 2,2 kb Transkript auffindig gemacht werden, und somit konnte die *Xi-X* Expression nicht kontaminierender Skelettmuskulatur, die ausschließlich ein 1,8 kb Aktin-Transkript produziert, zugeordnet werden. Die *Xi-X* Transkripte müssen im Peritoneum von Zelltypen abstammen, die von Skelettmuskelzellen verschieden sind.

Der Unterschied im Expressionsmuster zwischen Peritoneum, isoliert aus *X. helleri* und den Rückkreuzungsbastarden mit *DrSd* und *Sd^T*, könnte auf die unterschiedlich eingesetzte Menge an RNA in den Analysen zurückzuführen sein. Für *X. helleri* wurde ca. 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt, für die Rückkreuzungsbastarde ca. 10 µg. Dieser Unterschied an RNA-Menge wird auch an der unterschiedlichen Intensität des 2,2 kb Aktin-Transkripts erkennbar. Möglicherweise ist die eingesetzte RNA-Menge aus Peritoneum, isoliert aus *X. helleri*, zu gering und liegt damit, für das angewandte Analyseverfahren, unter der Detektionsgrenze.

Das Peritoneum ist mit einem hohen Anteil an Guanophoren und Makromelanophoren besiedelt, keine Pterinophoren sind hier anwesend. Das Auftreten eines 2,3 kb *Xi-X* Transkripts im Peritoneum spricht somit dafür, dass es auch in Zellen auftritt, die nicht aus der roten Differenzierungsreihe der Pigmentzellen stammen, worauf Studien der Flossen Hinweise gegeben hatten (siehe S. 186ff.). Das Peritoneum besitzt große, gut differenzierte Makromelanophoren. Wie Analysen der Zelllinie DRLI gezeigt hatten (siehe S. 183), produzieren vermutlich große, epitheloide Zellen mit melanocytenspezifischen Antigenen ein Transkript von 2,3 kb. Das 2,3 kb Transkript im Peritoneum könnte somit von den Makromelanophoren in diesem Gewebe abstammen. Eine andere Möglichkeit bestände darin, dass auch die Guanophoren im Peritoneum *Xi-X* exprimieren. Eine sehr schwache Bande, einem Transkript von 1,5 kb entsprechend, kann eventuell auch bei Peritoneum beobachtet werden. Dieses Transkript könnte von anderen Differenzierungsstadien der Pigmentzellen abstammen (siehe S. 186ff.).

***Xi-X* Expression im Kopfbereich**

Es wurde RNA aus präparierten Augen (von *X. helleri*, Männchen), sowie aus den Kopfstücken ohne Gehirn und Augen (von *X. helleri*, Männchen, *X. maculatus DrSd/ArSr*, Rückkreuzungs-bastarden mit *Dr* bzw. PSPM-freien Rückkreuzungsbastarden mit *Golden*) isoliert. Die beiden Gewebearten zeigten ein ähnliches *Xi-X* Expressionsmuster (siehe Abb. 57, S. 172). Ausschließlich mit der Sonde *Xi-X_B* wurden zwei Transkripte von 2,3 kb und 1,5 kb detektiert. Das 1,5 kb Transkript hatte für beide RNA-Isolate eine sehr schwache Erscheinung. Die 2,3 kb Bande war für die Augen relativ schwach, für die Kopfstücke etwas stärker. Das 2,3 kb Transkript ist wahrscheinlich auf die anwesenden Muskelzellen zurückzuführen. Der Kopf hat eine relativ große Menge an Muskelfasern, Augen eine geringe, sich auch in der Intensität der 1,8 kb Aktin-Bande widerspiegelnd. Das 1,5 kb Transkript ist wahrscheinlich auf die schwarzen Pigmentzellen, die in beiden Gewebearten zahlreich vorkommen, zurückzuführen.

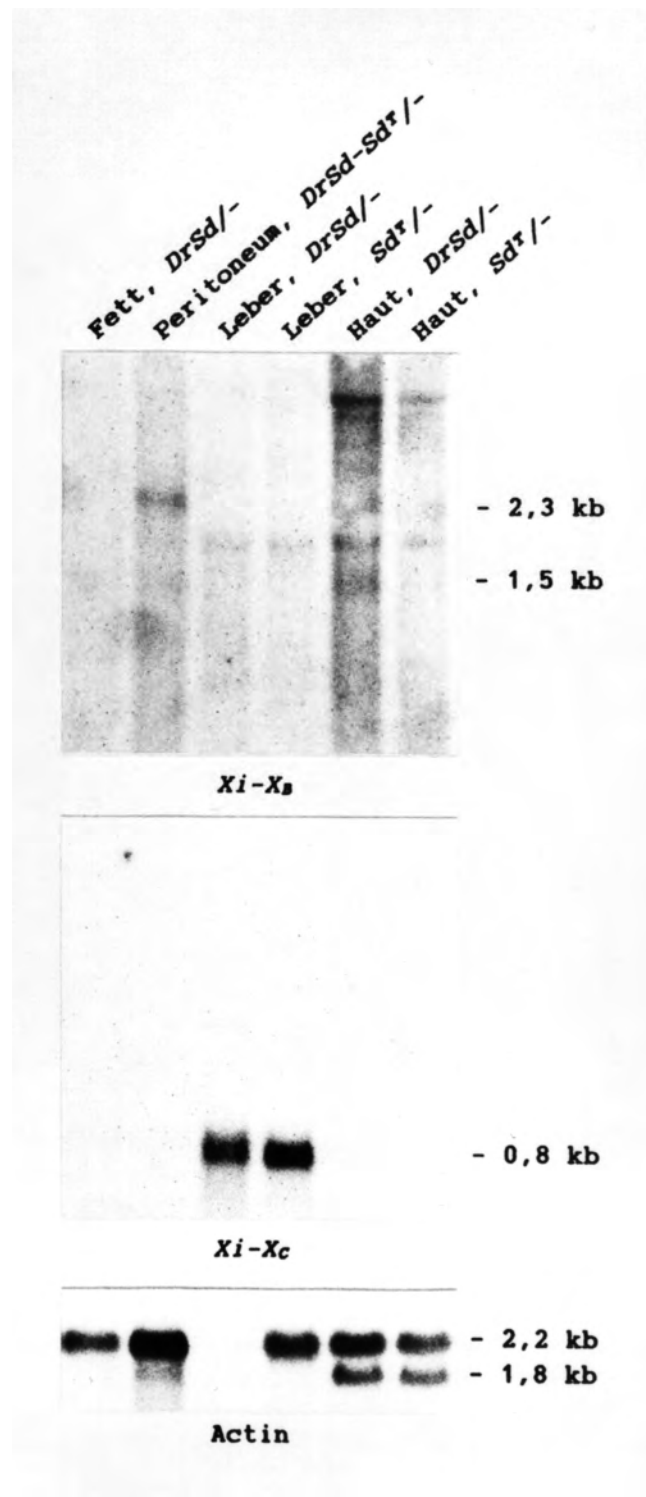


Abb. 70

Die Expression von *Xi-X* und Aktin in verschiedenen Geweben von Rückkreuzungsbastarden von *Xiphophorus* mit *DrSd* und/bzw. *Sd^T*.

Die Subsonden *Xi-X_B* und *Xi-X_C* wurden für den *Xi-X* Nachweis eingesetzt.

Die RNA, eingesetzt für Analysen des Peritoneums, betrug 10 µg, alle anderen Gewebearten wurden mit 20 µg untersucht.

Expressionsmuster von *Xi-X* während der Entwicklung

Es wurden die ontogenetischen Entwicklungsstadien 13, 15, 22 und 25 (Tavolga, 1949) von *X. helleri* untersucht (siehe Abb. 71, S. 201; Abb. 72, S. 202). Mit der angewandten Methode war es nicht möglich, RNA aus den früheren Stadien zu isolieren. Wahrscheinlich ist dieses auf die geringe Transkriptzahl pro Gewichtseinheit, maximal 0,5 g Gewebe konnte bei dem angewandten Extraktionsverfahren eingesetzt werden, zurückzuführen. Einige Experimente mit Embryonen von *X. maculatus*, die Untersuchungen wurden durch die geringe Zahl von Embryonen pro Wurf begrenzt, bestätigte die Ergebnisse gefunden für *X. helleri*. Keine artspezifische Unterschiede konnten nachgewiesen werden. Von *X. maculatus*, eine Mischung verschiedener Phänotypen wurde verwendet, wurden einerseits die Stadien 11-17 (siehe Abb. 72, S. 202), andererseits das Stadium 22 (nicht gezeigt) untersucht. Aus *X. helleri* wurde mRNA aus den Stadien 22 und 25 zusammen isoliert (siehe Abb. 71, S. 201). Es muss betont werden, dass die Embryonen eines Weibchens sich mit etwas unterschiedlicher Geschwindigkeit entwickeln. So sind z.B. für das angegebene Stadium 13 auch Embryonen dabei, die sich im Stadium 14 befinden. Stadium 13 ist aber das dominierende Stadium in dieser Untersuchung, und die relative Einteilung der Embryonen in Stadien entspricht dem sukzessiven Entwicklungsvorgang.

Im Vergleich zu den Analysen an isolierten Organen und Geweben der adulten Fische wurden keine neuen *Xi-X*-Transkriptlängen in den Embryonen verschiedener Stadien beobachtet:

0,8 kb *Xi-X* Transkripte, die in der Leber, im Gehirn und in den Herzen adulter Tiere zum Vorschein kamen, sind auch in den Embryonen zu beobachten (siehe Abb. 71, S. 201; Abb. 72, S. 202). Die Sonde *Xi-X_C*, die ausschließlich in der Leber und dem Herzen ein Transkript ausfindig macht, detektiert nur im Stadium 25, durch ein sehr schwaches Signal, das Transkript, die früheren Entwicklungsstadien sind negativ (siehe Abb. 72, S. 202). Dagegen zeigt die Sonde *Xi-X_B*, die Transkripte aller drei Organe detektiert, schon ab Stadium 15 ein sehr schwaches Transkript, das mit der weiteren Entwicklung an Intensität zunimmt (siehe Abb. 72, S. 202).

Wahrscheinlich detektiert die Gensonde *Xi-X_C* hauptsächlich die Transkripte von *Xi-X* in der Leber; die Herzsignale sind im Vergleich zu den meisten Lebersignalen verschiedener Präparate sehr schwach. Lebergewebe wird ab Stadium 14 in den Embryonen gebildet. Die ersten Herzanlagen werden im Stadium 10 angelegt und im Stadium 12 besteht einen kräftigen Herzschlag. Die Abwesenheit der Signale in den untersuchten Stadien 15 und 22 könnte auf die relativ wenigen Leberzellen bzw. Herzzellen in den frühen Stadien oder auf ein inaktives Gen dieser embryonalen Stadien zurückzuführen sein.

Mit der Sonde *Xi-X_B*, die zusätzlich zu den Transkripten von *Xi-X* in der Leber und im Herzen auch eine Transkription von *Xi-X* im Gehirn ausfindig macht, wird schon im Stadium 15 ein Transkript von 0,8 kb detektiert. Das frühere Erscheinungsbild der 0,8 kb Bande mit der Sonde *Xi-X_B* ist möglicherweise zum Einen durch die höhere Gesamttranskription von Leber, Herzen und Gehirn und zum Anderen durch die frühe Bildung des zentralen Nervensystems mit z.B. der Bildung des Neuralrohrs und Metencephalons ab Stadium 8 und des Hypothalamus ab Stadium 12 zu erklären.

Wie nachgewiesen werden konnte, detektiert in der Leber die Sonde *Xi-X_C* ein anderes Transkript, das Transkript *Xi-X^{LeberC}*, als die Sonde *Xi-X_B*, die das Transkript *Xi-X^{LeberB}* ausfindig macht (siehe S. 166). Eventuell werden die *Xi-X^{LeberB}*.

Transkripte früher in der Entwicklung als die *Xi-X^{LeberC}*-Transkripte gebildet, was den beobachteten Unterschied in Signalintensität, detektiert mit den beiden Sonden, erklären könnte. Nach dieser Hypothese übt das Transkript C anscheinend zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung als das Transkript B seine Funktion aus. Abb. 71 (siehe S. 201) zeigt sehr deutlich den Konzentrationsunterschied der beiden eventuellen Leber-Transkripte, detektiert in einem Leber-Präparat und in einem Präparat aus ganzen Embryonen Stadium 22/25; obwohl das Leber B Transkript eine gleiche Intensität der beiden Präparate aufweist, ist das Leber C Transkript in den Embryonen nicht nachweisbar und die Erscheinung in der Leber sehr stark.

Ein Transkript von **2,3 kb**, das in einer hohen Konzentration in der Skelettmuskulatur, aber wahrscheinlich auch in den Pigmentzellen, zu beobachten ist, ist ab Stadium 15 mit *Xi-X_B* detektierbar (siehe Abb. 72, S. 202). Die Intensität des Hybridisierungssignals steigt mit den weiteren Entwicklungsstadien.

Die ersten quergestreiften Muskelzellen differenzieren im Stadium 12, im Stadium 15 sind 20 bis 21 myomere Einheiten von den insgesamt 28 myomeren Einheiten bei *X. helleri* angelegt worden. Die ersten Melanocyten treten in der Retina von *X. helleri* im Stadium 14 auf. Das Transkript, observiert im Stadium 15, ist wahrscheinlich hauptsächlich auf die Muskelzellen zurückzuführen, denn die quergestreiften Muskelzellen kommen in den Embryonen in einer relativ großen Menge vor, und die Expression von *Xi-X* ist in dieser Gewebeart sehr hoch. Außerdem sind auch andere Subregionen von *Xi-X* im Transkript anwesend (siehe Abb. 71, S. 201); dies konnte nur für die Muskelzellen positiv nachgewiesen werden. Wie in Abb. 72 (siehe S. 202) zu sehen, korreliert die Intensität des 2,3 kb Transkripts von *Xi-X* mit der des 1,8 kb **Aktin**-Transkripts in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Diese parallele Intensitätserscheinung der beiden Banden während der Entwicklung spricht für einen Ursprung des detektierten 2,3 kb *Xi-X* Signals aus den Skelettmuskelzellen. Das 2,2 kb Aktin-Transkript zeigt für alle Entwicklungsstadien eine niedrige Konzentration. Für die Stadien 22 und 25 ist das 2,2 kb Transkript kaum detektierbar, was wahrscheinlich durch die relativ hohen Mengen an Muskelzellen in den Embryonen zu erklären ist. Das Aktin-Transkript von 1,6 kb, das für die Herzmuskelzellen spezifisch ist, kann nicht detektiert werden.

Das Transkript von **1,5 kb**, dass wahrscheinlich auf die Pigmentzellen zurückzuführen ist, ist mit der Sonde *Xi-X_B* im Stadium 13 das einzig, aber durch ein sehr schwaches Signal, detektierbare Transkript (Abb. 72, S. 202).

Die Melanocyten treten im Stadium 14 in der Retina und in den späteren Stadien über den ganzen Körper verteilt auf. Die frühe Detektion dieser Zellen durch deren spezifischen Transkripte, trotz des sehr begrenzten Vorkommens der melaninhaltigen Zellen in diesen Stadien, entspricht möglicherweise dem Vorkommen von früheren Differenzierungsstadien der Zellen, die durch das Fehlen von Melanin nicht zum Vorschein treten. Die Chromatoblasten wandern aus der Neuralleiste in den Stadien 10-11 aus, und das detektierte 1,5 kb Transkript im Stadium 13 könnte von diesen frühen Blastenstadien der Pigmentzellen abstammen. Die Signalintensität nimmt mit den weiteren Entwicklungsstadien nicht zu, was auf die relativ geringe Zahl der Pigmentzellen in ganzen Embryonen zurückzuführen sein könnte. Das 1,5 kb Transkript ist mit den Sonden *Xi-X_A* und *Xi-X_C* nicht detektierbar.

ERGEBNISSE

Hoden und Kiemen der adulten Tiere zeigten beide mit *Xi-X_B* ein schwaches Transkript von 1,1 kb. Hoden zeigte zusätzlich ein Transkript von 1,4 kb und Kiemen Transkripte von 1,5 kb und 1,9 kb (siehe S. 171). In mRNA, isoliert aus Embryonen Stadium 22/25, konnte nur diffus eine Schwarzfärbung im Bereich von 1,1 bis 1,5 kb mit der Sonde *Xi-X_B* beobachtet werden (siehe Abb. 71, unten), die möglicherweise auf Signale der Gonaden-Anlagen, Kiemen und Pigmentzellen in den Embryonen zurückzuführen sind. Die Kiemen werden ab dem Stadium 15 von dem primitiven Darm gebildet, die Anlagen der Gonaden ab dem Stadium 16.

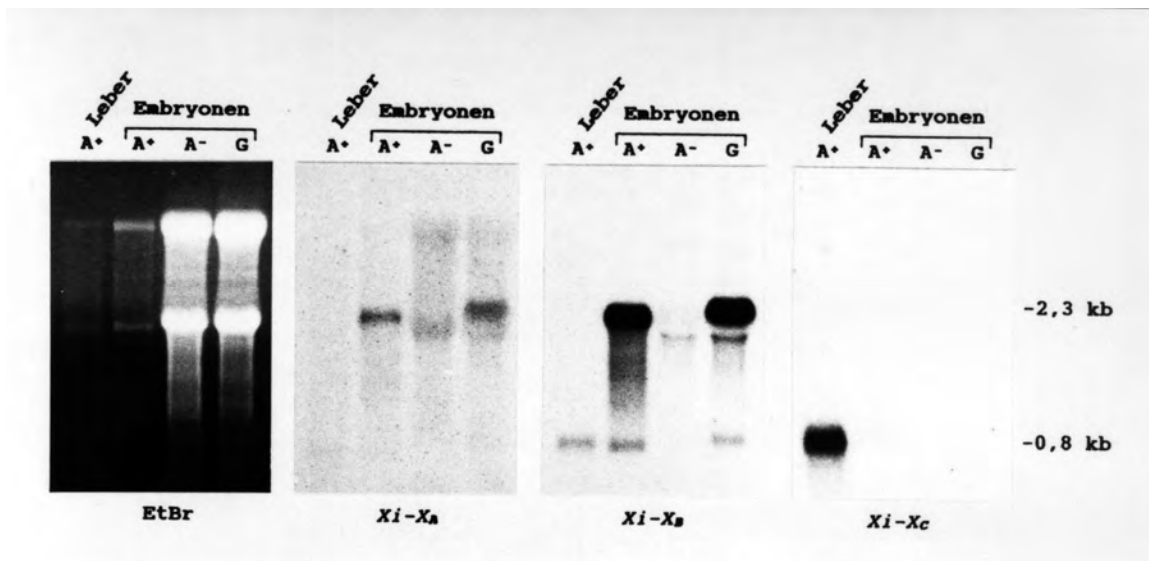


Abb. 71

Die Expression von *Xi-X*, nachgewiesen in RNA, isoliert aus der Leber und aus den Entwicklungsstadien 22/25 von *X. helleri*.

A⁺ entspricht Poly(A)⁺-RNA, A⁻ Poly(A)⁻-RNA und G die Gesamt-RNA.

Für die Poly(A)⁺-Fraktionen der RNA wurden für die Analysen ca. 2 µg eingesetzt.

Die Subsonden *Xi-X_A*, *Xi-X_B* und *Xi-X_C* wurden für den *Xi-X* Nachweis eingesetzt.

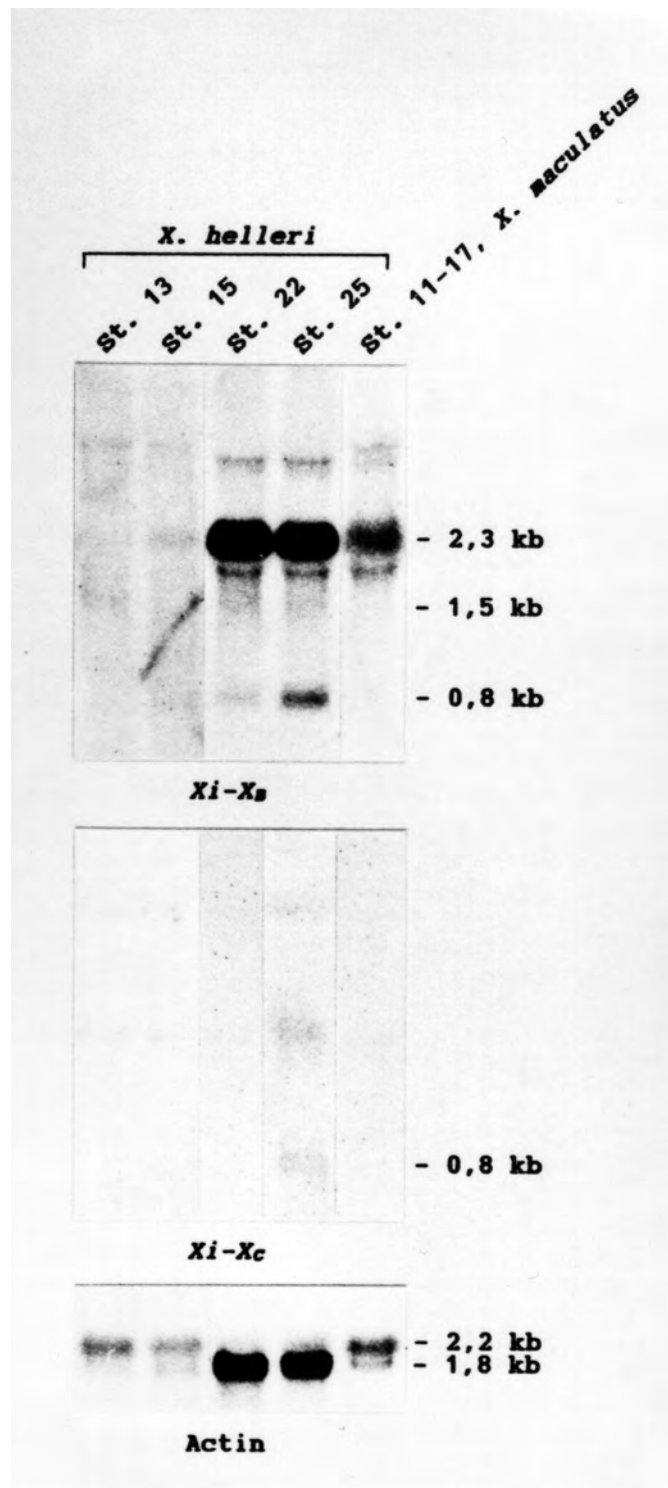


Abb. 72

Expression von *Xi-X* und Aktin in Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien von *X. helleri* und *X. maculatus*.

Die Subsonden *Xi-X_B* und *Xi-X_C* wurden für den *Xi-X* Nachweis eingesetzt.

ERGEBNISSE

Tab. 14

Transkripte, nachgewiesen mit verschiedenen Subregionen von *Xi-X* in unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen von *Xiphophorus*.

A: Die Transkripte nachgewiesen mit den Subregionen A, B und C von *Xi-X*.

B: Die Transkripte, nachgewiesen mit den Subregionen von *Xi-X_B* (*Xi-X_B-Hom*, *Xi-X_B-Spez1*, *Xi-X_B-Rep* und *Xi-X_B-Spez2*), bei denen Gewebe/Organe auch mit *Xi-X_A* oder *Xi-X_C* ein Signal ergaben.

Die Zahlen entsprechen den gefundenen Transkriptlängen in kb. Eine Reihe untersuchter Organe/Gewebe zeigten keine eigenartigen Transkripte, sondern bestanden wahrscheinlich aus Transkripten, produziert in anderen Zelltypen, wie Muskel- und Pigmentzellen; dieses galt für Haut, Augen, Kopfreist, Wirbelsäule und ganze Embryonen.

n.u.: nicht untersucht

* Nur die Transkripte, die auch in anderen Geweben/Organen nachzuweisen waren, werden für diese Zelllinie aufgeführt.

** Nur die Transkripte, die auch mit anderen Subsonden nachzuweisen waren, werden für die Sonde *Xi-X_B-Hom* aufgeführt.

| A | <i>Xi-X_A</i> | <i>Xi-X_B</i> | <i>Xi-X_C</i> |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Leber | 3,1/0,8 | 3,1/0,8 | 3,1/0,8 |
| Skelettmuskel | 2,3 | 3,1/2,3 | - |
| Herz | - | 1,5/0,8 | 0,8 |
| Gehirn | - | 0,8 | - |
| Hoden | - | 1,4/1,1 | - |
| Kiemer | - | 1,9/1,5/1,1 | - |
| Niere | - | - | - |
| Darm | - | - | - |
| Fett | - | - | - |
| Milz/Pankreas | - | - | - |
| Flossen | - | 2,3/1,5 | - |
| Zelllinie DRLI | - | 2,3/1,5 | - |
| Peritoneum | - | 2,3 | - |
| Zelllinie PSM* | n.u. | 1,5 | - |

| B | <i>Xi-X_B-Hom</i> ** | <i>Xi-X_B-Spez1</i> | <i>Xi-X_B-Rep</i> | <i>Xi-X_B-Spez2</i> |
|---------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Leber | 3,1/0,8 | 3,1/0,8 | 3,1/0,8 | 3,1/0,8 |
| Skelettmuskel | 2,3 | 2,3 | 3,1/2,3 | - |
| Herz | 0,8 | - | n.u. | - |

ERGEBNISSE

Tabelle 15

Übersicht über die nachgewiesene Anwesenheit der Subregionen von *Xi-X* in Transkripten der verschiedenen Gewebe- und Zellarten von *Xiphophorus*.

- ist nur für die Transkripte angegeben, bei denen mit ziemlicher Sicherheit davon ausgegangen wird, dass die Subregionen im Transkript abwesend sind.

| Gewebe/ Transkript | (kb) | Sonde: | | | | | | C |
|-----------------------|------|--------|----|-----|-------|-----|-------|---|
| | | A | B: | Hom | Spez1 | Rep | Spez2 | |
| Skelettmuskel | 3,1 | | + | | | | | |
| | 2,3 | + | + | + | + | + | - | - |
| Herz | 1,5 | | + | | | | | |
| | 0,8 | | + | + | | | | + |
| Leber | 3,1 | + | + | | | | | + |
| Leber B | 0,8 | + | + | + | + | + | + | ? |
| Leber C | 0,8 | - | - | - | - | - | - | + |
| Pigmentzellen | 2,3 | | + | | | | | |
| | 1,5 | | + | | | | | |
| Gehirn | 0,8 | | + | | | | | |
| Hoden | 1,4 | | + | | | | | |
| | 1,1 | | + | | | | | |
| Kiemen | 1,9 | | + | | | | | |
| | 1,5 | | + | | | | | |
| | 1,1 | | + | | | | | |

B-2) CHARAKTERISIERUNG DER ZELLINIE DRLI

Morphologie und Wachstum

Die meisten Zellen der Zelllinie DRLI zeigten unter guten Wachstumsbedingungen eine Spindelform, sogenannte fibroblastoide Zellen (siehe Abb. 74A, S. 208). Vereinzelt konnten große, abgeflachte Zellen, epitheloide Zellen, beobachtet werden. Das meist paarweise Auftreten der epitheloiden Zellen deutet auf eine Teilungsfähigkeit dieser Zellen hin, die Zellteilungs-Geschwindigkeit liegt auf einem viel langsameren Niveau als die der fibroblastoiden Zellen, die die epitheloiden Zellen völlig umgeben. Bei der Trypsinierung wurde deutlich, dass die epitheloiden Zellen eine viel stärkere Haftung als die fibroblastoiden Zellen an den Boden hatten. Sie verblieben zum Teil auch nach der Trypsinierung am Boden fest haften (siehe Abb. 74B). Dieses ermöglichte eine Selektion der epitheloiden Zellen: Nach der Trypsinierung und Entfernung der abgelösten Zellen konnte von den übriggebliebenen, epitheloiden Zellen eine Kultur angelegt werden. Diese Subpopulation der Zellen zeigte deutlich die langsam proliferativen Eigenschaften der epitheloiden Zellen, die vielleicht auch teilweise auf die geringe Zelldichte zurückzuführen ist. Die Zellen teilten sich kaum und verblieben einiger Zeit in sehr geringer Anzahl. Nach 3-4 Wochen traten wieder fibroblastoide Zellen auf, und das Zellwachstum nahm wieder zu. Die proliferative Subkultur zeigte nach einer gewissen Zeit eine Morphologie identisch mit der ursprünglichen Zellkultur, mit meist fibroblastoiden Zellen und sporadisch auftretenden, epitheloiden Zellen. Dieses Experiment zeigt, dass die epitheloiden Zellen nicht einen eigenen Zelltyp representieren, sondern, dass die fibroblastoiden und epitheloiden Zellen verschiedene Differenzierungszustände eines Zelltyps sind, die sich in bezug auf die Differenzierung in ein Gleichgewicht einstellen.

Die epitheloiden Zellen besaßen oft Granula, die in typischerweise die Zellkerne umgaben (siehe Abb. 74C). Wenn die epitheloiden Zellen relativ isoliert in der Kultur lagen, konnte die außergewöhnliche Größe dieser Zellen beobachtet werden. Einige der epitheloiden Zellen hatten einen Durchmesser von ca. dem drei- bis fünffachen der kleineren epitheloiden Zellen, sogenannte Makrozellen (siehe Abb. 75E, S. 209). Deutlich konnten bei diesen Zellen durch die Verteilung der cytoplasmatischen Granula oft mehrere Kerne beobachtet werden (siehe Abb. 75D).

Eine Wachstumskurve wurde von der Zelllinie DRLI erstellt (siehe Abb. 73, S. 206). 5×10^5 Zellen wurden in kleine Zellkulturflaschen ausgesät und jeden zweiten oder dritten Tag das Medium gewechselt. In der logarithmischen Phase zeigten die Zellen eine Verdopplungszeit von zwei Tagen. Die stationäre Phase mit 6×10^6 Zellen pro Zellkulturflasche, d.h. $2,4 \times 10^5$ Zellen/cm², wurde nach 6 Tagen erreicht.

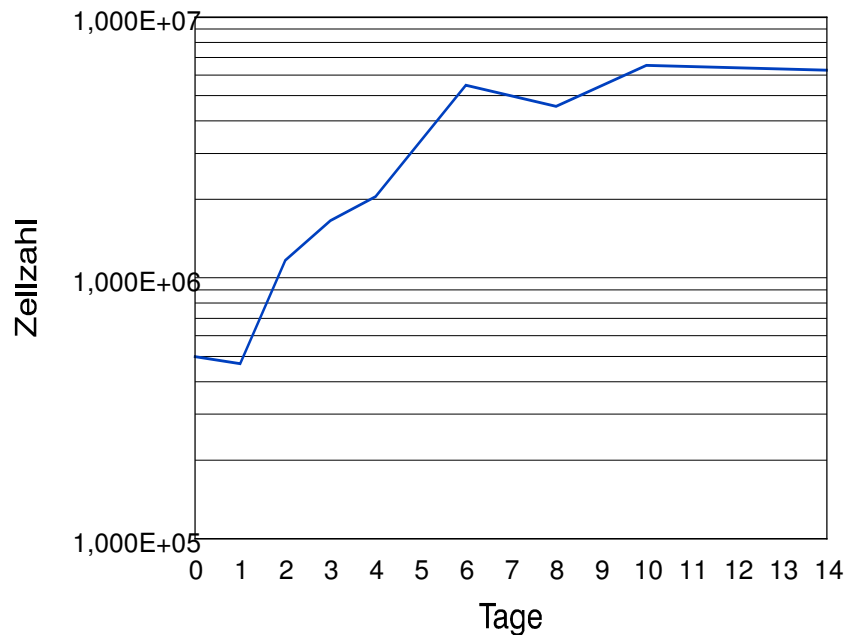


Abb. 73

Wachstumskurve der Zelllinie DRLI.

Die Werte beziehen sich auf den Durchschnitt von zwei parallelen Versuchen.

Differenzierungseigenschaften

Der Anteil an differenzierten Zellen und der Grad der Differenzierung dieser Zellen konnte durch verschiedene Reize variiert werden. So konnte eine pH-Verschiebung von 7,2, der den normalen pH-Wert in der Kultur representierte, auf 8,3 den Anteil an epitheloiden Zellen in der Kultur erhöhen. Eine Behandlung der Zellen mit 1 mg/ml Gentamycin im Nährmedium induzierte eine Zelldifferenzierung, die sich über Wochen, auch ohne weitere Behandlung, fortsetzte. Diese Zellen wurden flach und das Cytoplasma füllte sich mit Granula (siehe Abb. 74C, S. 208), manchmal schienen die Granula schwarz pigmentiert zu sein (siehe Abb. 75D/E, S. 209). Oft gab es größere Areale mit nur epitheloiden Zellen, die mit fibroblastoiden Zellen umgeben waren, als ob die Differenzierung in einer zentralen Zelle oder Zellbereich ein Signal zum Medium abgäbe und die Differenzierung umliegender Zellen beeinflusste. Auch eine Behandlung mit 10 µM Retinsäure induzierte eine Differenzierung der Zellen; eine Behandlung für einige Wochen führte hauptsächlich zu dendritischen Zellen (siehe Abb. 74D, S. 208; Abb. 75B, S. 209). Wurde die Behandlung fortgesetzt, wurde der Anteil an abgeflachten Zellen größer. Abb. 75C (siehe S. 209) zeigt deutlich die Anheftungspunkte der abgeflachten Zellen. Ein dritter Zelltyp, bei dem die Zelle wie eine Sichel geformt war, oft auf der konkaven Seite einen Fortsatz aufzeigend, trat ebenfalls nach längerer Behandlung auf (nicht gezeigt). Die dendritischen Zellen besaßen nur ausnahmsweise wenige Granula, die hauptsächlich für das epitheloide Zellstadium charakteristisch waren. Die retinsäure-induzierte Differenzierung schien, im Gegensatz zu der

Behandlung mit Gentamycin, reversibel zu sein. Wenn keine Retinsäure verabreicht wurde, nahmen die Zellen wieder eine fibroblastoide Morphologie an.

Untersuchungen zur Merkmale der Melanocytenreihe der Pigmentzellen

Aufgrund des Auftretens von Granula in den Zellen und die dendritischen und epitheloiden Zellformen war es interessant zu erfahren, ob diese Zellen der Zelllinie DRLI den Pigmentzellen zuzuordnen sind.

Die Zellen wurden freundlicherweise von dem Herrn Prof. Dr. M. Altmannsberger, Pathologisches Institut der Justus-Liebig-Universität, immunocytoologisch untersucht. Antikörper, die gegen humane Melanocyten gerichtet waren, zeigten eine positive Reaktion mit den großen, epitheloiden Zellen, die auch Granula besaßen. Dieses bestätigte die Annahme von Pigmentzellen in der Zelllinie. Die spindelförmigen Zellen waren negativ. Sie könnten frühe Stadien der Zellen, wie Chromatoblasten oder Melanoblasten, representieren, die noch nicht die entsprechenden Antigene exprimierten. Eine Färbung für Muskel-Aktin fiel negativ aus.

Die Zellen wurden in Zusammenarbeit mit dem Herrn Prof. Dr. H. Schmidt aus Halle auf Tyrosinase-Aktivität untersucht. Die Tyrosinase katalysiert den ersten Schritt in der Synthese von Melanin und stellt daher einen Marker der Melanocyten-Differenzierungsreihe dar. Die Zellen wurden auf Objektträger gezüchtet, fixiert und mit dem Substrat DOPA für eine Stunde unter Luft-Begasung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit Methylgrün gegengefärbt. Keine Zellen zeigten eine positive DOPA-Reaktion (Ergebnis nicht gezeigt). Dieses negative Ergebnis kann zweierlei begründet werden: Eine Erklärung ist, dass die Zellen nicht zu der Differenzierungsreihe der Melanocyten gehören. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Zellen, die sich in der proliferativen, spindelförmigen Phase befanden, in ihrer Differenzierung nicht so fortgeschritten waren, dass sie für die Melaninsynthese vorbereitet waren.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Zelllinie DRLI wahrscheinlich Pigmentzellen zuzuordnen sind, was durch die Expressionsbefunde des Gens *Xi-X* in der Kultur (siehe S. 183) und in anderen Gewebearten (siehe S. 159ff.) Unterstützung findet. Die fibroblastoiden, proliferativen Zellen könnten frühe Differenzierungsstadien entsprechen. Es kann nicht mit Sicherheit ausgesagt werden, was für Differenzierungsreihen der Pigmentzellen sich in der Kultur befinden. Die Reaktion mit Antikörpern gerichtet gegen humane Melanocyten und das Auftreten von wenigen, Melanin-enhaltenden Granula spricht für die Differenzierungsreihe der Melanocyten. Die Abwesenheit von Tyrosinase-Aktivität und das Erscheinen von meistens pigmentlosen Granula, spricht für eine Differenzierungsreihe der Pterinophoren oder Guanophoren. Möglicherweise besteht die Zellkultur aus Chromatoblasten, die sowohl in Richtung Melanophoren als auch in Richtung Pterinophoren, vielleicht auch in Richtung Guanophoren, differenzieren können.

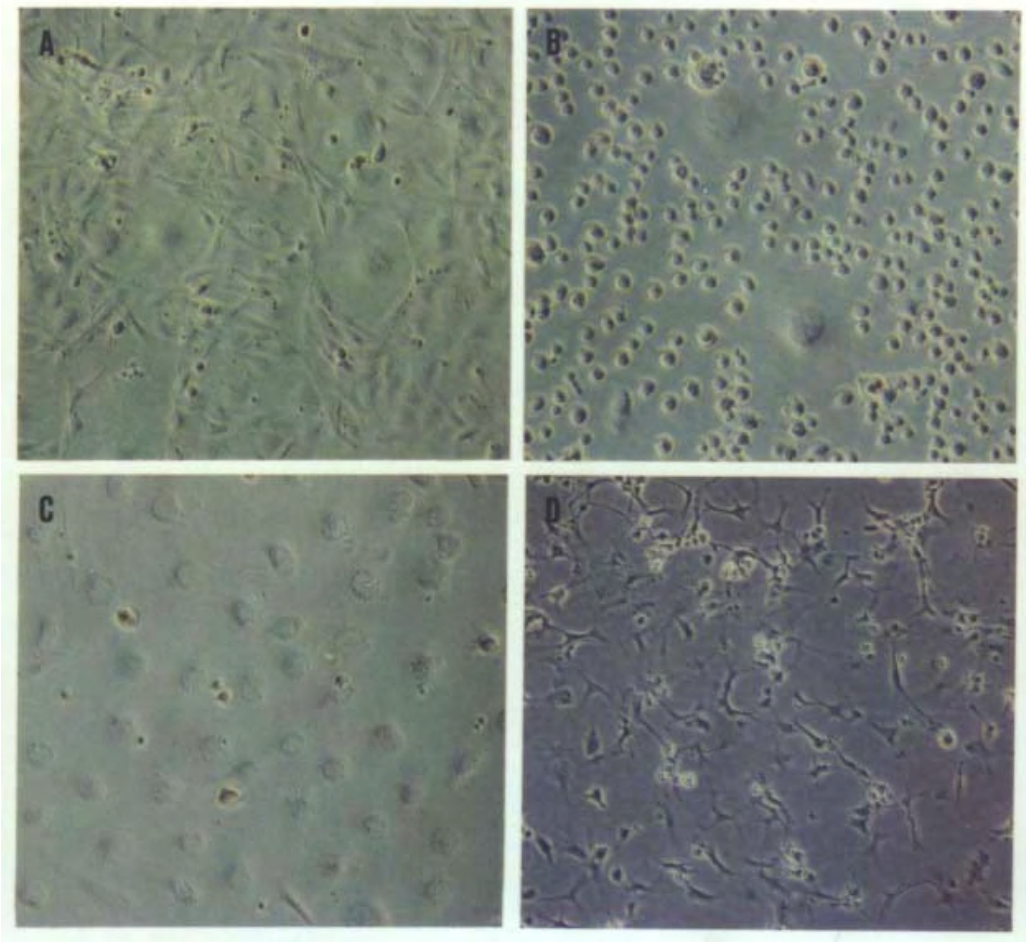


Abb. 74

Die Zelllinie DRLI.

- A) Das proliferative Stadium mit vorwiegend spindelförmigen und einigen, epitheloiden, großen Zellen.
- B) Trypsinierte Zellen, die die unterschiedliche Größe und die gute Anhaftung der epitheloiden Zellen zeigen.
- C) Durch Gentamycin induzierte, differenzierte Zellen. Siehe die pigmentlosen Granula, die sich um die Kerne befinden.
- D) Durch Retinsäure induzierte, differenzierte Zellen mit einer dendritischen Morphologie.

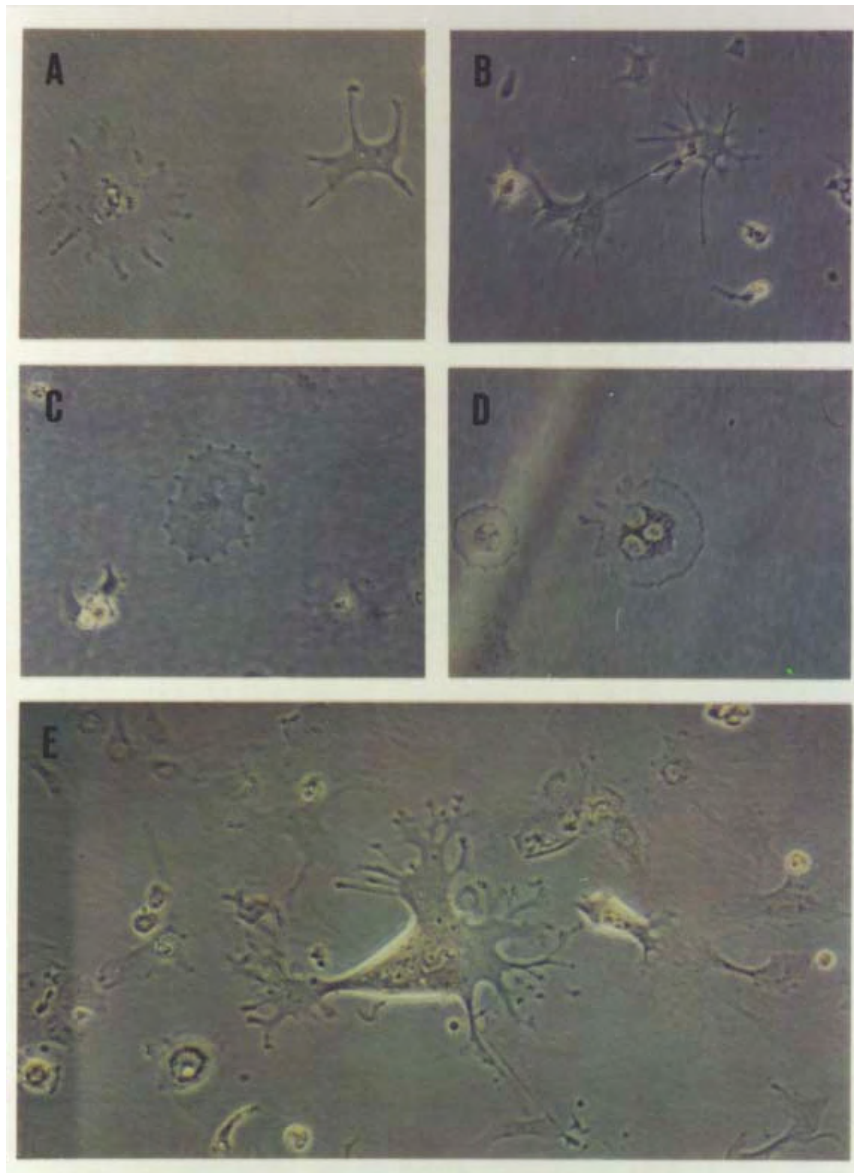


Abb. 75

Die Zelllinie DRL1 durch Retinsäure zur Differenzierung induziert. Einige Beispiele der verschiedenen morphologischen Phänotypen.

- A) Amorphe und dendritische Zellen.
- B) Zwei stark dendritische Zellen in Zellteilung.
- C) Eine Rosetten-förmige Zelle.
- D) Eine polynukleare Zelle mit Melanin-enthaltenden Granula.
- E) Eine dendritische Makrozelle.

B-3) ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG WEITERER HOMÖOBOX-ENTHALTENDEN GENE AUS VOLLSTÄNDIGEN, GENOMISCHEN GENBIBLIOTHEKEN

Homöobox-enthaltende Klone wurden aus vollständigen, genomischen Genbibliotheken, angelegt von *X. maculatus* aus dem Rio Usomacinta (die Klone 1-1, 1-3, 2-1, 2-2, 2-3) bzw. aus einem *X. maculatus*-Stamm mit dem mutierten Pigmentzellmuster *DrLi/ArSr'* (von der Diplomandin Sonja Straube, 1987, ausgeführt; die Klone 3-4, 4-1, 4-3, 4-4, 4-5, 5-1, 5-3, 5-4) in dem Phagen EMBL 4, isoliert. Insgesamt wurden 5 Klone aus dem Genom von *X. maculatus* aus dem Rio Usomacinta und 8 Klone aus dem Genom von *DrLi/ArSr'* durch eine Durchmusterung der Genbibliotheken gewonnen. Die jeweiligen Phagenklone wurden vermehrt, die DNA gereinigt und durch Restriktionsverdauung mit anschließender Gelelektrophorese und Hybridisierung der entsprechenden Southern Filter mit den Gensonden *Antp* und *ftz* von *Drosophila* charakterisiert:

Es zeigte sich, dass die gereinigte DNA von einem Klon (Klon 4-5), trotz der positiven Signale in der dreifachen Durchmusterung der Genbibliothek mit den homöobox-enthaltenden Gensonden *Antp* und *ftz*, keine Homologie zu den verwendeten Gensonden aufwies. Ein anderer Klon wies nur Homologie zu der *Antp*-Gensonde auf (Klon 1-1). Diese beiden Klone besitzen dementsprechend keine Homöobox in den Insertionen und wurden deswegen in dieser Studie nicht verfolgt. Weiter erwies sich die Insertionen von drei Klonen von *DrLi/ArSr'*, nach einer groben Restriktionskartierung, als identisch (Klon 4-1, 5-3 und 5-4). Diese Klone werden deswegen als Beispiel von dem Einen (Klon 4-1) beschrieben. Zwei Klone (die Klone 3-4 und 5-1) zeigen Insertionen, die identisch, aber kürzer, als die Insertionen anderer Klone (die Klone 4-4 bzw. 1-3) sind; hier werden nur die Klone mit den längsten Insertionen (die Klone 4-4 und 1-3) beschrieben.

Von 13 ursprünglich isolierten Klonen waren damit nur 7 Klone übrig, die unterschiedliche Teile der Genome enthielten, und neue Information über die Organisation der homöobox-enthaltenden Gene lieferten (siehe Tab. 18, S. 217). Für die Klone, die von gleichen Bereichen der zwei *Platy*-Genome isoliert wurden, wie für die Klone 2-3 und 4-1 bzw. 1-3 und 5-1 der Fall war, zeigten diese mit den verschiedenen Restriktionsenzymen ein identisches Fragmentenmuster; die Restriktionskarten der isolierten DNA-Bereiche der beiden *X. maculatus*-Genome werden deswegen gemeinsam in einer Karte dargestellt.

Die Restriktionskarten werden der Vollständigkeit halber nur für die Restriktionsenzyme *EcoRI*, *HindIII* und *BamHI* erstellt (siehe Abb. 77, S. 217; Abb. 78, S. 218; Abb. 79, S. 218). Teile der Klone wurden auch mit den Enzymen *PvuII*, *BglII*, *SphI*, *HpaI*, *AvaI*, *PstI*, *XbaI*, *XhoI* und *SalI* charakterisiert. Für die Zuordnung der Fragmente von *EcoRI*, *HindIII* und *BamHI* zu einander war es jedoch oft erforderlich, die Schnittstellen der anderen, verwendeten Restriktionsenzyme mit einzubeziehen. Für die Klone 1-3, 2-2, 2-3 und 4-1 wurden bestimmte Fragmente in pUC 18 subkloniert (Tab. 17, S. 216) und eine Restriktionskartierung dieser Subfragmente durchgeführt. Für Phagenklone, bei denen die Lokalisation der Schnittstellen schwierig war, konnte die Charakterisierung dieser Teilabschnitte der Insertionen die Zuordnung erleichtern.

Es wird in einer tabellarischen Form, die Fragmentenlängen, die mit den drei Restriktionsenzymen *EcoRI*, *HindIII* und *BamHI* erreicht wurden, aufgelistet (Tab. 16, S. 213-215). Auch Doppelverdaue mit jeweils zwei der drei erwähnten Enzyme wurden durchgeführt und in der Tabelle aufgeführt. Es ist durch die Verdaue unmöglich korrekte Fragmentlängen zu vermitteln. Parallele Versuche ergaben eine Schwankung von bis zu 100-200 Basenpaaren für die kleinen Fragmente (unter 3-4 kb), bis zu 0,5 kb für Fragmente mittlerer Länge und die Vermittlung der korrekten Länge von Fragmenten über 10 kb ist undenkbar. Trotzdem ist es, durch die Kombination verschiedener Enzyme und Doppelverdaue, möglich Restriktionskarten zu erstellen, die zumindest die relative Position der verschiedenen Enzymschnittstellen korrekt aufweisen. In den unten aufgeführten Tabellen (Tab. 16-18) werden die Fragmentlängen, die in den fertigen Restriktionskarten eingehen, aufgelistet. Die Restriktionsfragmente, die mit den homöobox-enthaltenden Gensonden hybridisieren, werden mit einem Stern angegeben. Beispiele der Analysen der Restriktionskartierung werden für die Phagenklone 2-2 und 2-3 in der Abb. 76 (siehe S. 212) gezeigt.

Homöobox-enthaltende Gene, die Homöoboxen mit hohen Homologien zu der Homöobox des Gens *Antp* besitzen, in Cluster lokalisiert sind und durch spezifische, embryonale Expressionsmuster gekennzeichnet sind, tragen bei den Vertebraten den Namen *Hox* (Scott, 1992). Bevor Sequenz- und Expressionsstudien von Homöoboxen anderer Spezies Homologien zu bekannten *Hox*-Loci von Maus und Mensch bestätigen, wird es empfohlen, diese Bezeichnung nicht zu benutzen. Die homöobox-enthaltende Gene gefunden für *Xiphophorus* wurden deswegen den Namen *Xiox* (*Xiphophorus* Homöobox) gegeben.

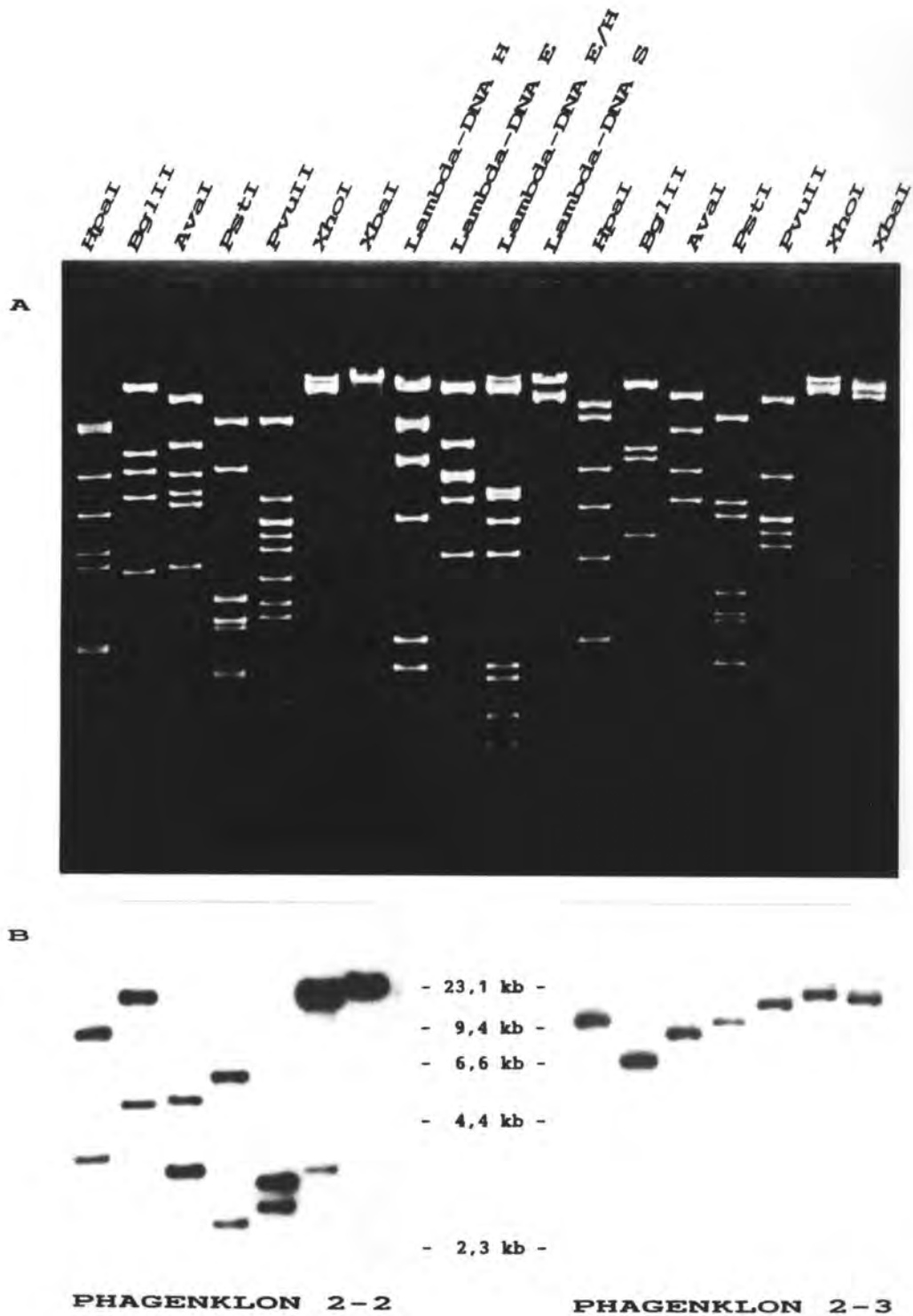


Abb. 76

Beispiele für die Analysen der Restriktionsenzymkartierungen für die Phagenklone 2-2 und 2-3.

- A) Die elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmente.
- B) Die entsprechenden Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit den Sonden *Antp* (für Klon 2-3) bzw. *ftz* (für Klon 2-2).

Tab. 16

Restriktionsfragmente, die mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *HindIII* und *BamHI*, und jeweils Doppelverdau dergleichen für die Klone 1-3, 2-1, 2-2, 2-3, 4-1, 4-3 und 4-4 vermittelt werden konnten.

Die Fragmentlängen sind in kb angegeben.

*: Die Fragmente, die mit den Gensonden *Antp* und *ftz* von *Drosophila* ein Hybridisierungssignal hervorriefen.

Eco, *EcoRI*; *Hind*, *HindIII*; *Bam*, *BamHI*

Die Genbibliotheken waren mit partiell *Sau3A*-verdauter, genomischer DNA, mit einer Durchschnittlänge von 15 kb, angelegt worden. Der Vektor, EMBL 4, war für die Klonierung mit *BamHI* geschnitten; die Enzyme *Sau3A* und *BamHI* sind kompatibel. Besitzt ein rekombinanter Klon eine *BamHI*-Schnittstelle direkt in der Einklonierungsstelle kann diese Schnittstelle eine reelle *BamHI*-Schnittstelle in der genomischen DNA sein, wie für Klon 1-3 der Fall ist, oder auf einen Zufall beruhen; statistisch gesehen, wird in einem Viertel der *Sau3A*-Schnittstellen sich hier die Base Cytosin befinden, was die *BamHI*-Erkennungssequenz vervollständigen würde. Dieses Phänomen wurde für den Klon 4-1 beobachtet; durch die Überlappung mit dem Klon 4-3 konnte gezeigt werden, dass die genomische DNA-Region keine *BamHI*-Schnittstelle besitzt. Mit der Ausnahme von der Einklonierungsstelle selbst, beinhalten die vektoriellen Arme keine Schnittstellen für *BamHI*. Die Phagen-Arme besitzen direkt neben der *BamHI*-Einklonierungsstelle, auf beiden Seiten, eine *EcoRI*-Schnittstelle. Wird der rekombinante Klon mit *EcoRI* geschnitten, wird die Insertion von den Phagenarmen getrennt: Der linke Arm beträgt 19,9 kb und der rechte Arm 9,2 kb. Wenn die Insertion auch hier eine *EcoRI*-Schnittstelle besitzt, beruht dieses auf ein Zufall. *HindIII* hat in der linken Arm keine und in der rechten Arm eine Schnittstelle; Fragmente von 4,4 kb und 4,8 kb entstehen vom rechten Arm. Die 19,9 kb und 4,8 kb Arm-Fragmente werden in *HindIII*-Verdauen der rekombinanten Phagen mit einem Stück der Insertion verbunden sein, die Länge der Insertion-DNA hängt von der Abstand zur nächsten *HindIII*-Schnittstelle in der Insertion ab.

Klon 1-3 (Insertion 13,4 kb)

| <i>EcoRI</i> | <i>HindIII</i> | <i>BamHI</i> | <i>Eco/Hind</i> | <i>Eco/Bam</i> | <i>Hind/Bam</i> |
|--------------|----------------|--------------|-----------------|----------------|-----------------|
| 19,9 | 21,1* | 19,9 | 19,9 | 19,9 | 19,9 |
| 9,2 | 6,8 | 18,0 | 4,8 | 9,2 | 6,8 |
| 8,5 | 5,0* | 2,8* | 4,4 | 8,5 | 4,4 |
| 4,0* | 4,4 | 1,8* | 3,3 | 2,2* | 3,6 |
| 0,9 | 3,2 | | 3,2 | 1,8* | 3,2 |
| | 2,0 | | 2,0 | 0,6 | 1,4* |
| | | | 2,0 | 0,3 | 1,4 |
| | | | 1,2* | | 1,2* |
| | | | 0,9 | | 0,6 |
| | | | 0,8* | | |

ERGEBNISSE

Klon 2-1 (Insertion 13,0 kb)

| <i>EcoRI</i> | <i>HindIII</i> | <i>BamHI</i> | <i>Eco/Hind</i> | <i>Eco/Bam</i> | <i>Hind/Bam</i> |
|--------------|----------------|--------------|-----------------|----------------|-----------------|
| 19,9 | 22,3* | 20,9 | 19,9 | 19,9 | 20,9 |
| 9,2 | 7,9 | 10,7 | 4,8 | 9,2 | 6,3 |
| 7,0* | 4,4 | 5,9 | 4,4 | 4,4 | 4,4 |
| 2,4 | 3,6 | 2,8* | 2,4 | 3,0 | 3,6 |
| 2,0 | 2,0 | 1,8* | 2,3 | 2,2* | 1,6 |
| 0,9 | 1,9* | | 2,0 | 2,0 | 1,4* |
| 0,7 | | | 1,9* | 1,8* | 1,4 |
| | | | 1,3 | 1,5 | 1,2* |
| | | | 0,9 | 0,9 | 0,7 |
| | | | 0,8* | 0,7 | 0,6 |
| | | | 0,7 | 0,6 | |
| | | | 0,7 | 0,3 | |

Klon 2-2 (Insertion 15,2 kb)

| <i>EcoRI</i> | <i>HindIII</i> | <i>BamHI</i> | <i>Eco/Hind</i> | <i>Eco/Bam</i> | <i>Hind/Bam</i> |
|--------------|----------------|--------------|-----------------|----------------|-----------------|
| 19,9 | 21,8 | 21,1* | 19,9 | 19,9 | 20,4 |
| 9,8 | 14,3* | 20,4 | 4,8 | 9,8 | 9,9* |
| 9,2 | 5,0* | 2,8* | 4,4 | 9,2 | 4,4 |
| 2,7* | 4,4 | | 3,3 | 2,2* | 3,6 |
| 1,8* | 3,2 | | 3,3 | 1,8* | 3,2 |
| 0,9 | | | 3,2 | 0,6 | 1,4* |
| | | | 1,9 | 0,5 | 1,4 |
| | | | 1,8* | 0,3 | |
| | | | 0,9 | | |
| | | | 0,8* | | |

Klon 4-4 (Insertion 16,8 kb)

| <i>EcoRI</i> | <i>HindIII</i> | <i>BamHI</i> | <i>Eco/Hind</i> | <i>Eco/Bam</i> | <i>Hind/Bam</i> |
|--------------|----------------|--------------|-----------------|----------------|-----------------|
| 19,9 | 20,0 | 26,2* | 19,9 | 19,9 | 20,0 |
| 9,2 | 5,1 | 19,7 | 4,8 | 9,2 | 5,1 |
| 8,6* | 4,8 | | 4,4 | 7,3 | 4,4 |
| 7,3 | 4,4 | | 3,8* | 6,3* | 4,3 |
| 0,9 | 3,8* | | 3,4 | 2,3 | 3,8* |
| | 3,4 | | 2,8 | 0,9 | 3,4 |
| | 2,5 | | 2,5 | | 2,5 |
| | 1,9 | | 1,9 | | 1,9 |
| | | | 1,1 | | 0,5 |
| | | | 0,9 | | |
| | | | 0,3 | | |
| | | | 0,1 | | |

ERGEBNISSE

Klon 2-3 (Insertion 12,4 kb)

| <i>EcoRI</i> | <i>HindIII</i> | <i>BamHI</i> | <i>Eco/Hind</i> |
|--------------|----------------|--------------|-----------------|
| 19,9 | 21,8 | 41,5* | 19,9 |
| 9,2 | 8,6* | | 6,7 |
| 8,7 | 6,7 | | 4,8 |
| 3,7* | | | 4,4 |
| | | | 3,7* |
| | | | 1,9 |
| | | | 0,1 |

Klon 4-1 (Insertion 15,2 kb)

| <i>EcoRI</i> | <i>HindIII</i> | <i>BamHI</i> | <i>Eco/Hind</i> |
|--------------|----------------|--------------|-----------------|
| 19,9 | 22,8 | 24,4* | 19,9 |
| 9,2 | 9,7* | 19,9 | 5,4* |
| 5,4* | 6,4 | | 4,8 |
| 4,4* | 4,4 | | 4,4 |
| 3,0 | 1,0* | | 2,9 |
| 2,0 | | | 2,2 |
| 0,4 | | | 2,0 |
| | | | 1,2 |
| | | | 1,0* |
| | | | 0,4 |
| | | | 0,1 |

Klon 4-3 (Insertion 14,4 kb)

| <i>EcoRI</i> | <i>HindIII</i> | <i>BamHI</i> | <i>Eco/Hind</i> |
|--------------|----------------|--------------|-----------------|
| 19,9 | 20,1 | 43,5* | 19,9 |
| 9,2 | 7,6 | | 4,8 |
| 5,4* | 2,8 | | 4,4 |
| 4,4* | 2,5 | | 2,8 |
| 2,9 | 2,4 | | 2,5 |
| 1,1 | 1,4 | | 2,2 |
| 0,6 | 1,0* | | 1,4 |
| | 0,9 | | 1,2 |
| | 0,4* | | 1,1 |
| | | | 1,0* |
| | | | 0,9 |
| | | | 0,6 |
| | | | 0,4* |
| | | | 0,2 |
| | | | 0,1 |

Tab. 17

Restriktionsfragmente, die von den isolierten, rekombinanten Phagenklonen 1-3, 2-2, 2-3 und 4-1 in pUC 18 subkloniert wurden.

*: Die Fragmente, die mit den Gensonden *Antp* und *ftz* von *Drosophila* ein Hybridisierungssignal hervorriefen.

| 1-3/ <i>Bam</i> HI | 2-2/ <i>Eco</i> RI | 2-3/ <i>Eco</i> RI | 4-1/ <i>Eco</i> RI |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 2,8 kb*/1,8 kb* | 9,8 kb | 8,7 kb | 5,4 kb* |
| 1,8 kb* | 1,8 kb* | 3,7 kb* | 4,4 kb* |
| | 0,9 kb | | 3,0 kb |
| | | | 2,0 kb |

Aufgrund der oben genannten Daten konnten Restriktionskarten der isolierten DNA-Regionen aufgestellt werden (siehe Abb. 77-79, S. 217-218). Ein Übersicht über die Charakteristika der Klone mit Insertionslängen, Locus-Angehörigkeit und Inhalt von Homöoboxen werden in der Tab. 18 (siehe S. 217) gegeben. Fünf der charakterisierten Klone enthielten jeweils zwei Homöoboxen (1-3, 2-1, 2-2, 4-1 und 4-3), die restlichen zwei Klone (2-3 und 4-4) nur eine Homöobox. Viele der isolierten DNA-Abschnitte verschiedener Klone zeigten eine Übereinstimmung im Restriktionsmuster, was überlappende Genregionen entsprechen. Für die Klone 2-1 und 4-3 war die Orientierung der Insertionen in den Vektoren in bezug auf die anderen Klon-Insertionen, die für überlappende Teile der Gencluster zuständig waren (Klon 1-3 und 2-2 bzw. 2-3 und 4-1), verkehrt.

Insgesamt wurden 7 Homöoboxen durch die Durchmusterung von vollständigen, genomischen Genbibliotheken isoliert. Zwei Cluster von Homöoboxen, *Xiox-1* und *Xiox-2* genannt, die jeweils 3 Homöoboxen besitzen und von denen jeweils 3 Phagenklone DNA-Abschnitte enthielten, konnten ausfindig gemacht werden. Die Insertion eines Klons konnte keine der anderen Gencluster zugeordnet werden, der Locus wurde die Bezeichnung *Xiox-3* gegeben. Die isolierten Regionen der Cluster *Xiox-1* und *Xiox-2* decken 23,9 bzw. 29,9, des Locus *Xiox-3* 16,8 kb ab. Am Locus *Xiox-1* befinden sich die Gene *Xiox-1.1*, *Xiox-1.2* und *Xiox-1.3*, am Locus *Xiox-2* die Gene *Xiox-2.1*, *Xiox-2.2* und *Xiox-2.3* und am Locus *Xiox-3* das Gen *Xiox-3.1*. Die Homöoboxen werden in den Restriktionskarten (siehe Abb. 77-79, S. 217-218) in der Mitte der kleinst möglich eingrenzbaeren Fragmenten eingezeichnet, was auch durch andere Enzyme, als die, die hier dargestellt sind, gegeben wurde. Die Abstände der Homöoboxen im Cluster *Xiox-1* betragen 3,0 kb +/- 1,0 kb (*Xiox-1.1/1.2*) bzw. 12,0 kb +/- 1,3 kb (*Xiox-1.2/1.3*). Im Cluster *Xiox-2* betragen die Abstände 8,3 kb +/- 2,3 kb (*Xiox-2.1/2.2*) bzw. 10,7 kb +/- 0,7 kb (*Xiox-2.2/2.3*).

ERGEBNISSE

Tab. 18

Rekombinante Phagenklone, die aus den genomischen Genbibliotheken von *X. maculatus* aus dem Rio Usomacinta und aus der Pigmentzellmuster-Mutante *DrLi/ArSr'*, für die Restriktionskarten der homöobox-enhaltenden Genbereiche benutzt wurden.

Die Länge der Insertionen werden in kb angegeben.

| Uso macinta | | | | <i>DrLi/ArSr'</i> | | | |
|-------------|-------|---------------|----------|-------------------|-------|---------------|----------|
| Klon | Länge | Cluster | Homöobox | Klon | Länge | Cluster | Homöobox |
| 1-3 | 13,4 | <i>Xiox-1</i> | 1.1/1.2 | 4-1 | 15,2 | <i>Xiox-2</i> | 2.1/2.2 |
| 2-1 | 13,0 | <i>Xiox-1</i> | 1.1/1.2 | 4-3 | 14,4 | <i>Xiox-2</i> | 2.2/2.3 |
| 2-2 | 15,2 | <i>Xiox-1</i> | 1.2/1.3 | 4-4 | 16,8 | <i>Xiox-3</i> | 3.1 |
| 2-3 | 12,4 | <i>Xiox-2</i> | 2.1 | | | | |

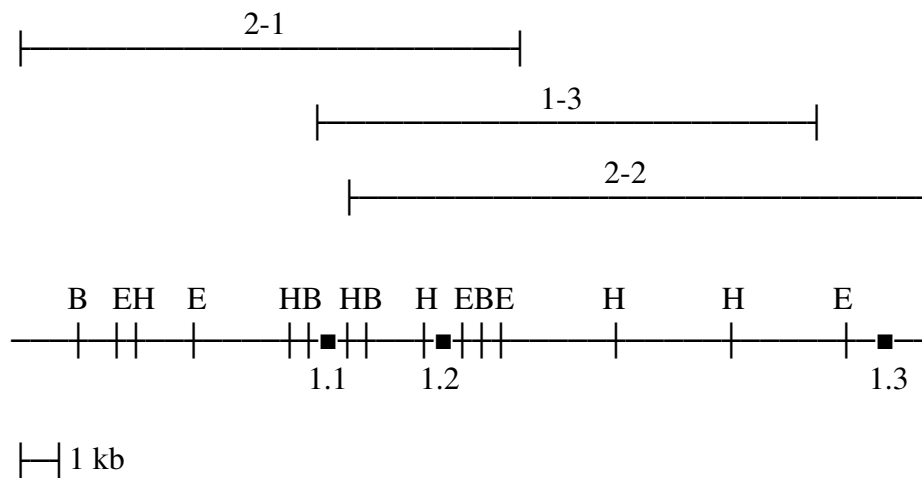


Abb. 77

Restriktionskarte des Homöoboxclusters *Xiox-1* (23,9 kb) mit den Homöoboxen *Xiox-1.1*, *Xiox-1.2* und *Xiox-1.3*.

Die Position der Insertionen der isolierten Phagenklone 1-3, 2-1 und 2-2 werden über die Restriktionskarte dargestellt. Die Homöoboxen sind mit schwarzen Boxen markiert.

E, *EcoRI*; H, *HindIII*; B, *BamHI*

ERGEBNISSE

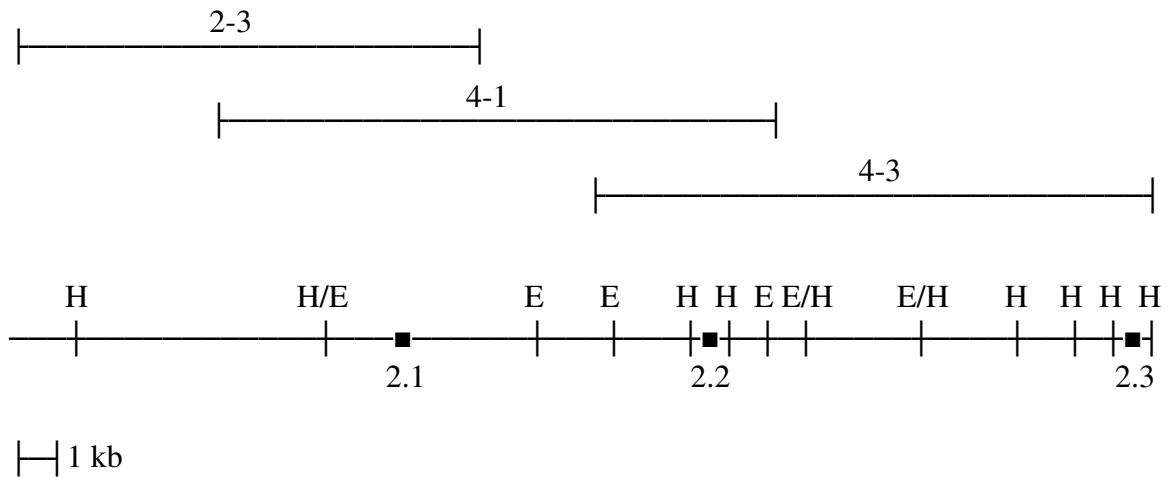


Abb. 78

Restriktionskarte des Homöoboxclusters *Xiox-2* (29,9 kb) mit den Homöoboxen *Xiox-2.1*, *Xiox-2.2* und *Xiox-2.3*.

Die Position der Insertionen der isolierten Phagenklone 2-3, 4-1 und 4-3 werden über die Restriktionskarte dargestellt. Die Homöoboxen sind mit schwarzen Boxen markiert. Dieser DNA-Abschnitt beinhaltet keine *Bam*HI-Schnittstellen.
E, *Eco*RI; H, *Hind*III

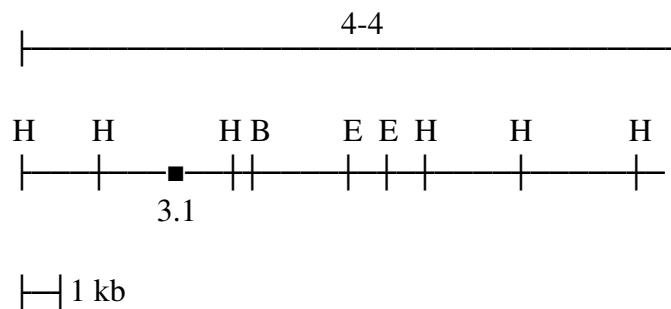


Abb. 79

Restriktionskarte des homöobox-Locus *Xiox-3* (16,8 kb) mit der Homöobox *Xiox-3.1*

Die Position der Insertion des isolierten Phagenklons 4-4 wird über die Restriktionskarte dargestellt. Die Homöobox ist mit einer schwarzen Box markiert.
E, *Eco*RI; H, *Hind*III; B, *Bam*HI

A-2) DIE ANORDNUNG UND ZAHL VON HOMÖOBOXEN IM GENOM VON *XIPHOPHORUS* (EINE ZUSAMMENSTELLUNG)

Die Studien über das Vorkommen von Homöoboxen, nachgewiesen durch Southern Analysen mit den Gensonden *Antp* und *ftz* von *Drosophila*, ergaben eine Zahl von 6-11 homöobox-enhaltenden Fragmenten, je nach verwendetem Restriktionsenzym, im Genom von *Xiphophorus* (siehe S. 65ff.). Es wurde im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 8 Homöoboxen vom *X. maculatus*-Genom isoliert; 7 durch die Durchmusterung von vollständigen Genbibliotheken (siehe S. 210ff.) und eine durch die Anlegung und Durchmusterung einer Teil-Genbibliothek von ca. 2,2 kb-langen *EcoRI*-Fragmenten (siehe S. 72ff.). Jeweils 3 Homöoboxen konnten 2 Genclustern zugeordnet werden. Die übrigen 2 isolierten Homöoboxen hatten, nach bisherigen Kenntnissen, zu keinem der Homöobox-Cluster eine sichere Zugehörigkeit. Somit wurde insgesamt 4 Loci für homöobox-enhaltende Gene bei *Xiphophorus* ausfindig gemacht, *Xiox-1*, *Xiox-2*, *Xiox-3* und *Xiox-4* (siehe die zusammenfassende Abb. 84, S. 227).

Die restriktionsenzymatische Charakterisierung der isolierten, homöobox-enhaltenden Phagenklone erlaubte die Zuordnung dieser Homöoboxen zu bestimmten *EcoRI*, *HindIII* und *BamHI*-Fragmenten, meistens definierter Längen (Tab. 19, siehe unten). Für die Homöobox von *Xi-X* wurden die Fragmentlängen durch Southern Analysen mit *Xi-X* als Sonde vermittelt (siehe S. 110ff.). Die isolierten Homöoboxen konnten damit zu den Fragmenten, detektiert mit den Gensonden *Antp* und *ftz* in Southern Analysen vollständiger, genomischer DNA, zugeordnet werden (siehe Tab. 20, S. 220; Abb. 81-83, S. 224-226).

Tab. 19

Die Tabelle gibt an, in wievielen der isolierten Phagenklone aus den vollständigen Genbibliotheken die jeweiligen Homöoboxen anwesend waren („Klone“), samt die Längen der homöobox-enhaltende Fragmente in kb, die für die Enzyme *EcoRI*, *HindIII* und *BamHI* vermittelt werden konnten.

| Homöobox | Klone | <i>EcoRI</i> | <i>HindIII</i> | <i>BamHI</i> |
|-----------------|-------|--------------|----------------|--------------|
| <i>Xiox-1.1</i> | 3 | 7,0 | 1,9 | 1,8 |
| <i>Xiox-1.2</i> | 4 | 7,0 | 5,0 | 2,8 |
| <i>Xiox-1.3</i> | 1 | >1,8 | >5,1 | >11,9 |
| <i>Xiox-2.1</i> | 4 | 5,4 | 9,7 | >29,9 |
| <i>Xiox-2.2</i> | 4 | 4,4 | 1,0 | >29,9 |
| <i>Xiox-2.3</i> | 1 | >5,4 | 0,4 | >29,9 |
| <i>Xiox-3.1</i> | 2 | >8,6 | 3,8 | >6,3 |
| <i>Xi-X</i> | - | 2,2 | 8,5 | 2,3 |

Tab. 20

Zuordnung der isolierten Homöoboxen und entsprechenden homöobox-enthaltenden Restriktionsfragmenten von *X. maculatus* zu den Restriktionsfragmenten von A) *EcoRI* B) *HindIII* und C) *BamHI* nachgewiesen in genomischen, xiphophorinen Southern Analysen mit den Homöoboxen aus den Genen *Antp* und *ftz* von *Drosophila* als Gensonden (siehe Abb. 81-83, S. 224-226).

*Der Übersicht halber ist die Homöobox *Xiox-3.1* dem 9,4 kb *BamHI*-Fragment zugeordnet worden; mit einer *BamHI*-Fragmentlänge von über 6,3 kb könnte sie auch dem Fragment von 7,1 kb entsprechen. Wenn *Xiox-3.1* dem Cluster *Xiox-2* als *Xiox-2.4* angeschlossen sein sollte (siehe „*EcoRI*-Verdau“, S. 221), wäre auch eine Zugehörigkeit zum *BamHI*-Fragment von über 25 kb möglich. **Für die Homöobox *Xiox-1.2* besteht im *HindIII*-Verdau ein RFLP mit Fragmenten von 4,5 und 5,2 kb.

| | genomische Southern Analysen | isolierte homöobox-enthaltende Fragmente |
|----------|------------------------------|--|
| A | <i>EcoRI</i> | |
| | 15 kb | >8,6 kb (3.1) >5,4 kb (2.3) |
| | 7,0 kb | 7,0 kb (1.1/1.2) |
| | 5,2 kb | 5,4 kb (2.1) |
| | 4,4 kb | 4,4 kb (2.2) |
| | 3,0 kb | >1,8 kb (1.3) |
| | 2,2 kb | 2,2 kb (<i>Xi-X</i>) |
| B | <i>HindIII</i> | |
| | 11,5 kb | >5,1 kb (1.3) |
| | 9,5 kb | 9,7 kb (2.1) |
| | 8,5 kb | 8,5 kb (<i>Xi-X</i>) |
| | 5,2 kb | 5,0 kb (1.2)** |
| | 4,5 kb | (1.2) |
| | 3,6 kb | 3,8 kb (3.1) |
| | 3,2 kb | - |
| | 2,6 kb | - |
| | 1,9 kb | 1,9 kb (1.1) |
| | 1,0 kb | 1,0 kb (2.2) |
| 0,4 kb | 0,4 kb (2.3) | |
| C | <i>BamHI</i> | |
| | 25 kb | >29,9 kb (2.1/2.2/2.3) |
| | 16 kb | >11,9 kb (1.3) |
| | 9,4 kb | >6,3 kb (3.1)* |
| | 7,1 kb | - |
| | 2,9 kb | 2,8 kb (1.2) |
| | 2,3 kb | 2,3 kb (<i>Xi-X</i>) |
| | 2,1 kb | - |
| 1,8 kb | 1,8 kb (1.1) | |

EcoRI-verdaute, genomische DNA von *X. maculatus* zeigt nur 6 hybridisierte Fragmente (siehe Abb. 81, S. 224), obwohl 8 Homöoboxen isoliert und bekannt sind. Die Homöoboxen *Xiox-2.3* und *Xiox-3.1*, die *EcoRI*-Fragmente von größer als 5,4 bzw. 8,6 kb haben, könnten zu dem selben Fragment von 15 kb lokalisiert sein. Das Fragment von 15 kb hat ein vergleichbar starkes Hybridisierungssignal wie das 7,0 kb Fragment, das die Homöoboxen *Xiox-1.1* und *Xiox-1.2* beherbergt, was die Anwesenheit von zwei Homöoboxen auch in diesem 15 kb-Fragment plausibel macht. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass ein zusätzliches Fragment von entweder ca. 7,0 oder 15 kb sich mit einem von den beschriebenen Fragmenten abdeckt. Wenn die Homöoboxen *Xiox-2.3* und *Xiox-3.1* beide in dem 15 kb Fragment lokalisiert sind, müsste der Homöoboxcluster *Xiox-2* eine vierte Homöobox, die *Xiox-3.1* besitzen. Die Position der *Xiox-3.1* Homöobox müsste sich rechts zu den drei anderen Homöoboxen in der aufgezeichneten Restriktionskarte befinden. Eine Umbenennung dieser Homöobox auf *Xiox-2.4* wäre damit angebracht. Zwischen den Clustern *Xiox-2* und *Xiox-3* sind keine gemeinsame Restriktionsschnittstellen bekannt. Als *Xiox-2.3* ein *EcoRI*-Fragment von über 5,4 kb und *Xiox-3.1* von über 8,6 kb am Ende der jeweiligen Insertionen besitzen, kann nur ein kleines Verbindungsstück von ca. 1 kb zwischen den beiden Loci in einem gemeinsamen *EcoRI*-Fragment von 15 kb fehlen. Der Abstand zwischen den Homöoboxen *Xiox-2.3* und *Xiox-3.1* liegt dadurch schätzungsweise bei ca. 5,5 +/- 2,2 kb. Für *X. variatus* konnte ein 5,8 kb *EcoRI*-Fragment beobachtet werden, das bei *X. maculatus* und *X. helleri* abwesend war. Dafür fehlte das 3,0 kb *EcoRI*-Fragment bei *X. variatus*, ein Fragment, das bei den beiden anderen Arten vorhanden war. Das *EcoRI*-Fragment von 3,0 kb bei *X. maculatus* und *X. helleri* entspricht dem Gen *Xiox-1.3*, und das 5,8 kb *EcoRI*-Fragment bei *X. variatus* könnte ein Allell des Gens *Xiox-1.3* in dieser Art entsprechen.

HindIII-verdaute, xiphophorine DNA ergab 11 Fragmente, die mit den homöobox-enthaltenden Gensonden *Antp* und *ftz* hybridisierten (siehe Abb. 82, S. 225). Mit der Ausnahme von dem 11,5 kb *HindIII*-Fragment, besitzt jeder der charakterisierten *HindIII*-Fragmente mit Sicherheit nur eine Homöobox (Tab. 20, S. 220). Die Homöobox *Xiox-1.3* ist Teil von einem *HindIII*-Fragment, das mehr als 5,1 kb beträgt, hier das Fragment von 11,5 kb zugeordnet, und könnte theoretisch noch Homöoboxen beinhalten.

Es konnte eine unterschiedliche Intensität der *HindIII*-Fragmente von 5,2 und 4,5 kb in den verschiedenen DNA-Isolaten beobachtet werden. Durch die Hybridisierung derselben Southern Filter, die zuerst mit der *Antp*-Sonde hybridisiert wurde, mit einer Sonde von der Homöobox *Xiox-1.2* (1,8 kb *EcoRI-EcoRI*-Insertion aus dem Subklon vom Phagenklon 2-2 in pUC 18) konnte gezeigt werden, dass diese beiden Fragmente verschiedener Allelle des Gens *Xiox-1.2* entsprechen (siehe Abb. 80, S. 222). Zwei der hybridisierten *HindIII*-Fragmente konnten keine der isolierten Homöoboxen zugeordnet werden.

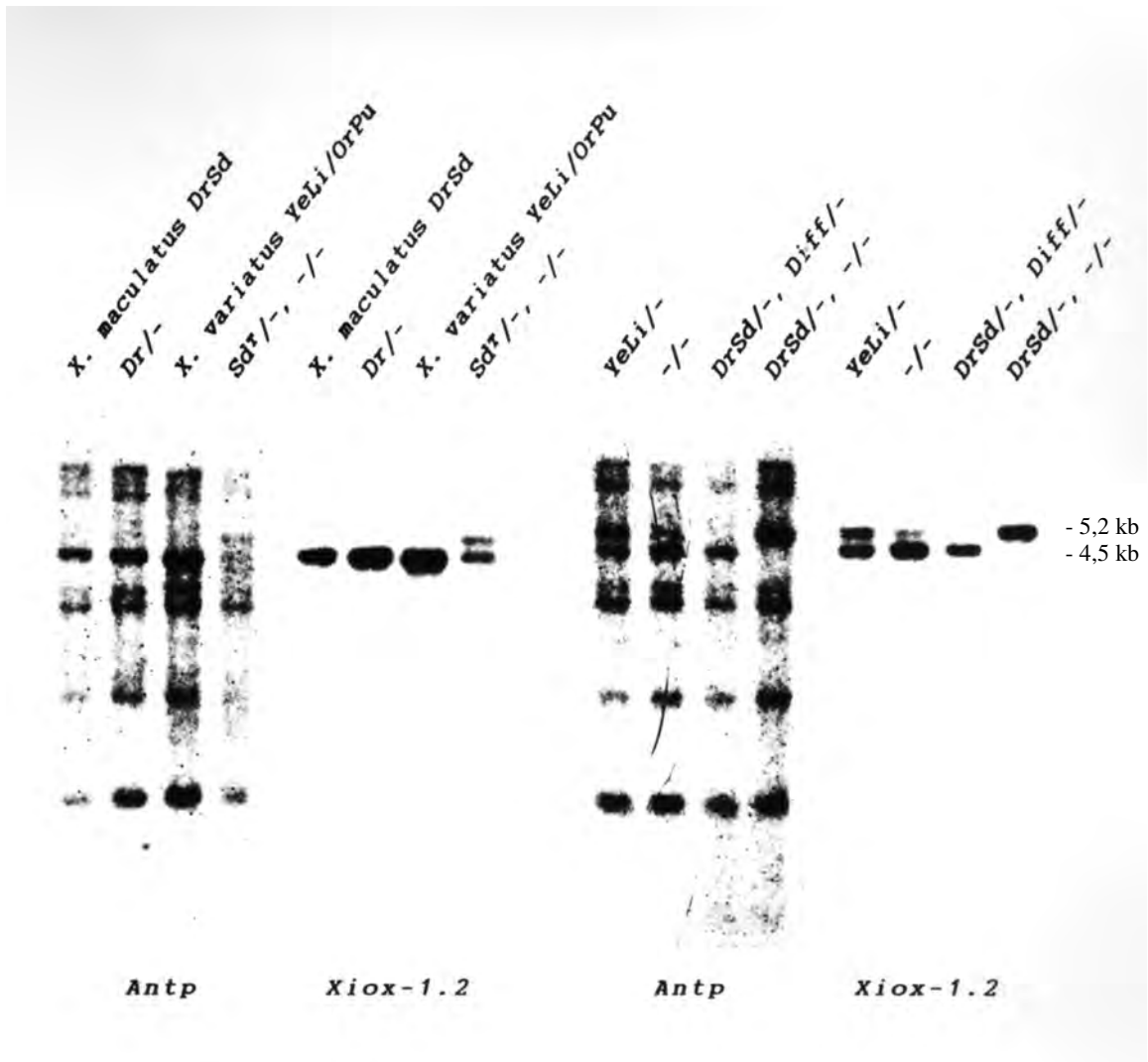


Abb. 80

Southern Analysen verschiedener Arten und Populationen von *Xiphophorus* mit der Gensonde *Antp* von *Drosophila* und mit der Sonde aus dem xiphophorinen Gen *Xiox-1.2*.

Die DNA wurde mit *Hind*III geschnitten. Für die Gensonde *Antp* wurde nicht-stringente, für die Gensonde *Xiox-1.2* stringente Bedingungen angewandt.

Die **BamHI**-Verdaue zeigen 9 homöobox-enhaltenden Fragmenten (siehe Abb. 83, S. 226). Das Fragment von ca. 25 kb beinhaltet mindestens 3 Homöoboxen, wie durch die Restriktionskarten der isolierten Homöoboxen gezeigt werden konnte. Für die Homöobox *Xiox-3.1* mit einem **BamHI**-Fragment von über 6,3 kb ist es ungewiss, ob das Fragment dem Fragment von 9,4 kb oder 7,1 kb in den Southern Analysen entspricht. In der Tab.20 (siehe S. 220) und Abb. 83 (siehe S. 226) ist sie, dem Übersicht halber, dem Fragment von 9,4 kb zugeordnet worden. Wenn *Xiox-3.1* dem Cluster *Xiox-2* als *Xiox-2.4* angeschlossen sein sollte (siehe „*EcoRI*-Verdau“, S. 221), wäre auch eine Zugehörigkeit zum **BamHI**-Fragment von über 25 kb möglich.

Zwei der hybridisierten Fragmente konnten keine der isolierten Homöoboxen zugeordnet werden.

Bei den Southern Analysen, wobei das Enzym *EcoRI* benutzt wurde, fehlen die zwei extra Banden, die in den **BamHI**- und **HindIII**-Verdauen vorhanden waren und keine Zuordnung zu den isolierten *Xiox*-Genen gefunden haben. Dieses könnte dreierlei zu begründen sein: 1) Aufgrund der Cluster-Anordnung von Homöoboxen könnte in den einzelnen *EcoRI*-Fragmenten mehrere Homöoboxen lokalisiert sein. Dieses ist nur für die Fragmente von 3.0 kb (*Xiox-1.3*) und 15 kb (*Xiox-2.3* und *Xiox-3.1*) möglich; die anderen Fragmente sind in bezug auf Fragmentlängen und Homöobox-Inhalt charakterisiert. 2) Unter den in den Southern Analysen verwendeten Bedingungen könnten, durch die begrenzte, elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente, mehrere Fragmente ähnlicher Länge sich gegenseitig abdecken. 3) Die Hybridisierungen mit den Homöoboxen *Xiox-1.2* (siehe Abb. 80, S. 222) und *Xi-X* (siehe S. 109ff., 123ff.) als Sonden verdeutlichen das Prinzip von Heterogenität der verschiedenen Gene. Die Existenz verschiedener Allelle, durch einen RFLP nachgewiesen, erhöht die Zahl der hybridisierten Banden bei Untersuchungen an vielen gemeinsam untersuchten Fischen. Die zwei Fragmente von **HindIII** und **BamHI**, die Signale mit den Homöoboxen als Sonden in den Southern Analysen hervorriefen, aber nicht isoliert wurden, könnten dementsprechend verschiedene Allelle der bereits isolierten Gene darstellen. Die vergleichbare Intensität der Hybridisierungssignale verschiedener DNA-Isolate spricht gegen dieser letzten Möglichkeit.

Die genomischen Southern Analysen xiphophoriner DNA und die Isolierung und Charakterisierung der homöobox-enhaltenden, genomischen Genfragmente, lässt im Genom von *Xiphophorus* eine Zahl von 8-10 Homöoboxen mit einer hohen Homologie zu den Homöoboxen der Gene *Antp* und *ftz* von *Drosophila* vermuten.

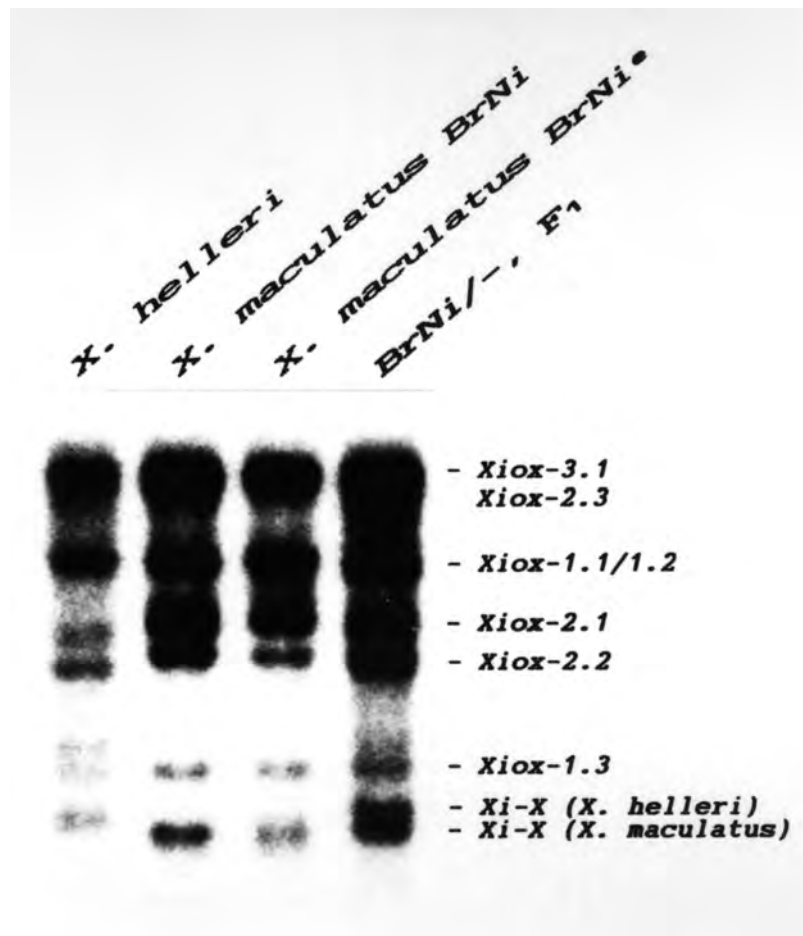


Abb. 81

Die Zuordnung der isolierten, homöobox-enthaltenden Gene von *Xiphophorus* zu den Restriktionsfragmenten von *EcoRI*, die in genomischen Southern Analysen mit der homöobox-enthaltenden Gensonde *Antp* von *Drosophila* nachgewiesen sind (siehe Text S. 221).

Die Hybridisierungsanalysen wurden unter nicht-stringenten Bedingungen durchgeführt. *BrNi*-, *F₁* bezeichnet ein *F₁*-Bastard von *X. maculatus BrNi* und *X. helleri*, der das Pigmentzellmuster *BrNi* trägt.

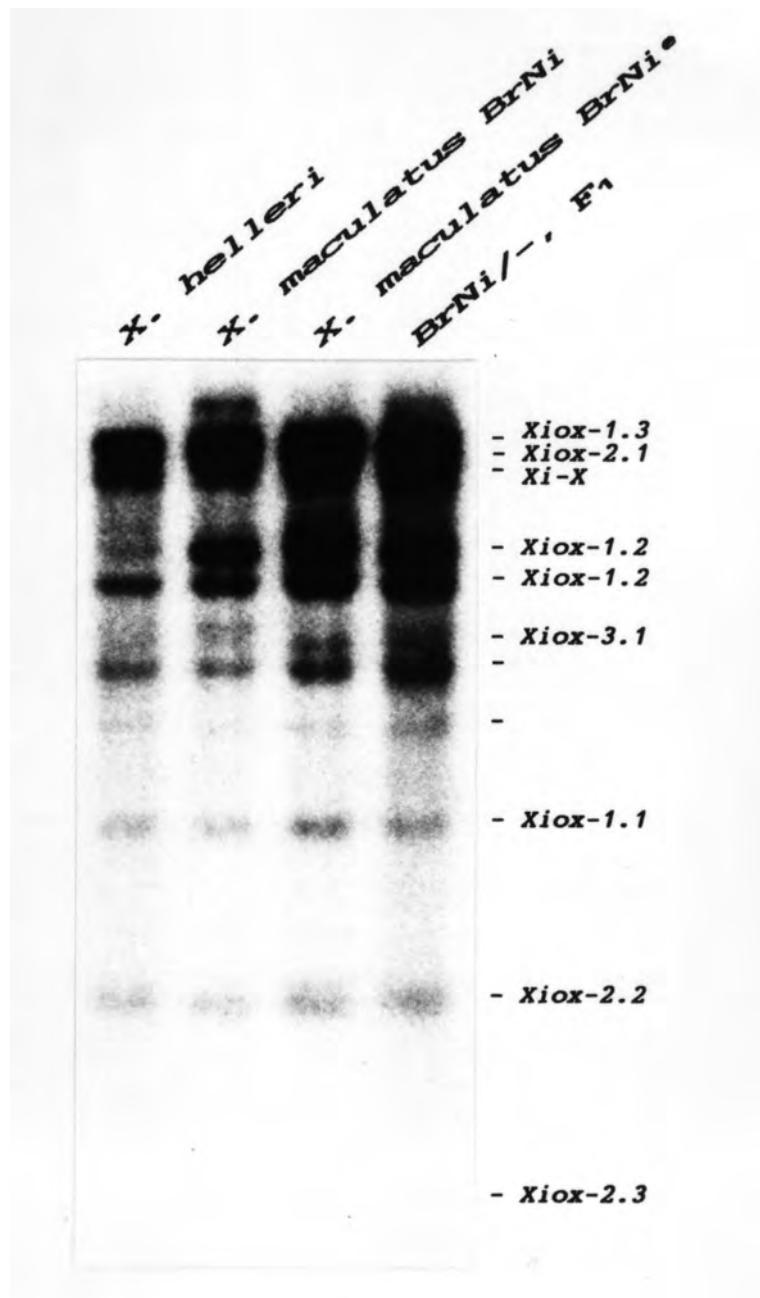


Abb. 82

Die Zuordnung der isolierten, homöobox-enthaltenden Gene von *Xiphophorus* zu den Restriktionsfragmenten von *HindIII*, die in genomischen Southern Analysen mit der homöobox-enthaltenden Gensonde *Antp* von *Drosophila* nachgewiesen sind (siehe Text S. 221).

Die Hybridisierungsanalysen wurden unter nicht-stringenten Bedingungen durchgeführt. *BrNi*-, F₁ bezeichnet ein F₁-Bastard von *X. maculatus BrNi* und *X. helleri*, der das Pigmentzellmuster *BrNi* trägt.

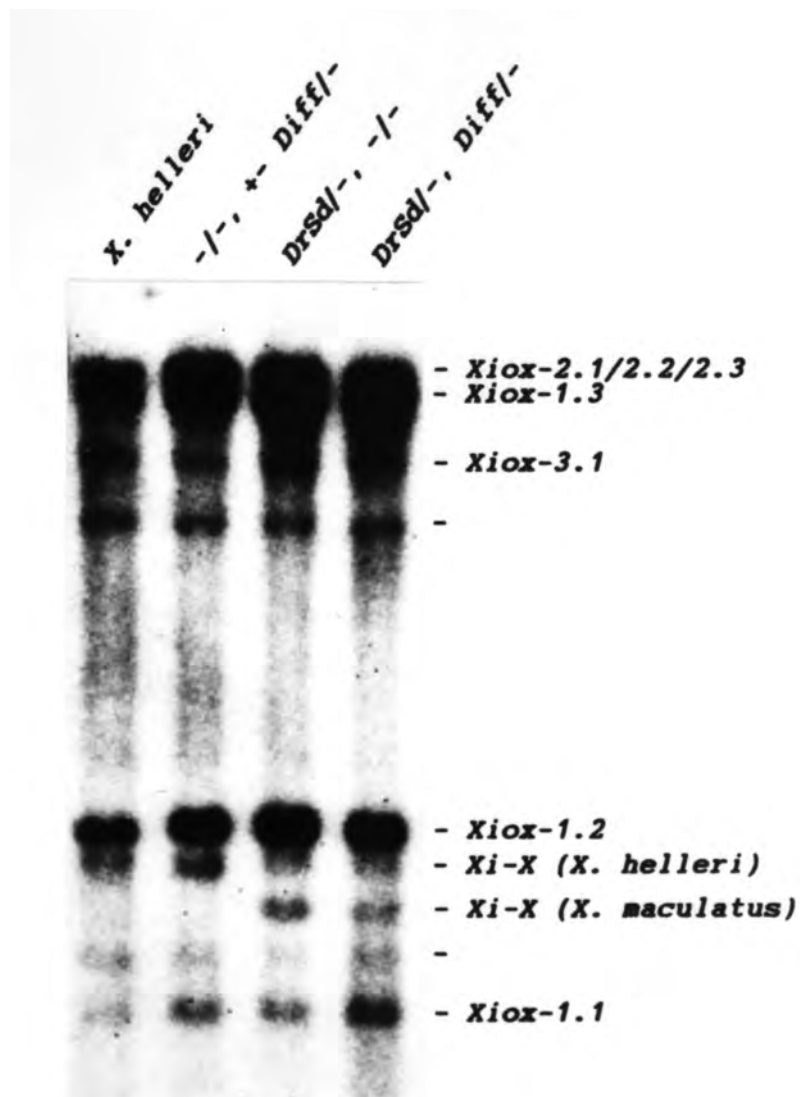


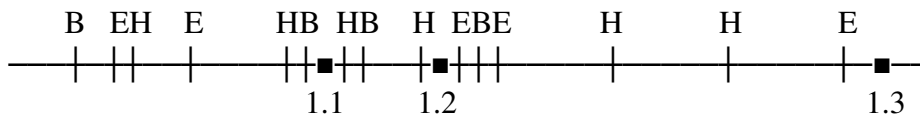
Abb. 83

Die Zuordnung der isolierten, homöobox-enhaltenden Gene von *Xiphophorus* zu den Restriktionsfragmenten von *Bam*HI, die in genomischen Southern Analysen mit der homöobox-enhaltenden Gensonde *Antp* von *Drosophila* nachgewiesen sind (siehe Text S. 223).

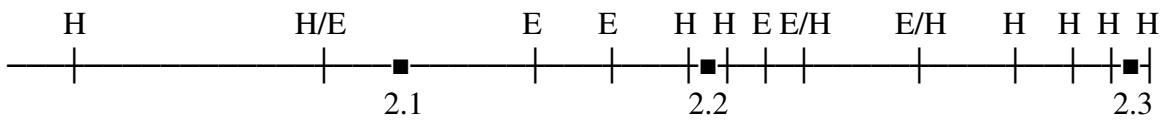
Die Hybridisierungsanalysen wurden unter nicht-stringenten Bedingungen durchgeführt. *DrSd* und *R_{Diff}* bezeichnen die Anwesenheit (+) bzw. die Abwesenheit (-) der entsprechenden Loci in Rückkreuzungs-Bastarden von *X. maculatus* *DrSd* mit *X. helleri*. Dem Übersicht halber ist die Homöobox *Xiox-3.1* dem 9,4 kb *Bam*HI-Fragment zugeordnet worden; mit einer *Bam*HI-Fragmentlänge von über 6,3 kb könnte sie auch dem Fragment von 7,1 kb entsprechen.

ERGEBNISSE

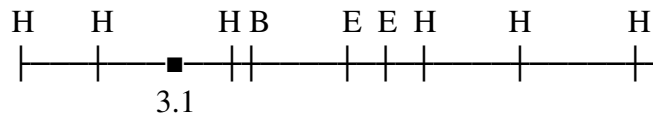
XIOX-1



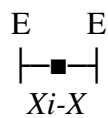
XIOX-2



XIOX-3



XIOX-4



—|— 1 kb

Abb. 84

Restriktionskarten der isolierten homöobox-enthaltenden Genloci *Xiox-1* (23,9 kb), *Xiox-2* (29,9 kb), *Xiox-3* (16,8 kb) und *Xiox-4* (2,2 kb) charakterisiert für *X. maculatus*.

Die Homöoboxen sind als schwarze Boxen dargestellt. E, *EcoRI*; H, *HindIII*; B, *BamHI*

5. DISKUSSION

HOMÖOBOXEN IM GENOM VON *XIPHOPHORUS*

Nachgewiesene Homöoboxen

Mit den homöobox-enthaltenden Gensonden der Entwicklungsgene *Antp* und *ftz* von *Drosophila* konnten Homöoboxen im Genom von *Xiphophorus* nachgewiesen werden. Die Zahl der hybridisierten Banden in Southern Analysen liegen, je nach verwendetem Restriktionsenzym, zwischen 6 und 11.

Bei *Xiphophorus* konnte durch das schwache Hybridisierungssignal und den inkonstanten Nachweis der *Xi-X* Homöobox in den genomischen Southern Analysen, sowie durch die bekannte Sequenzhomologie der *Xi-X*-Homöobox zu den Homöoboxen der Gensonden von 72%, die Detektionsgrenze der xiphophorinen Homöoboxen in den Southern Analysen dieser Arbeit bei ca. 70% zu den Homöoboxen der Gensonden vermutet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 8 homöobox-enthaltende Genfragmente mit Hilfe der homöobox-enthaltenden Sonden der Gene *Antp* und *ftz* vom xiphophorinen Genom isoliert. Die Fragmentlängen, die durch die Restriktionsanalysen isolierter homöobox-enthaltenden Genregionen ermittelt wurden, stimmen mit den Bandenlängen nachgewiesen in den genomischen Southern Analysen überein. Nach der Zahl der hybridisierten *Bam*HI- und *Hind*III-Fragmenten und der Charakterisierung isolierter homöobox-enthaltender Fragmente könnten 2 Homöoboxen mit einer hohen Homologie zu den Gensonden von einer gesamten Isolation der in den Southern Analysen nachgewiesener Homöoboxen eventuell noch fehlen. Eine Gesamtzahl von 10 Homöoboxen mit einer Homologie von über 70% zu den Homöoboxen der Sonden *Antp* und *ftz* im Genom von *Xiphophorus* würde sich dadurch ergeben.

Durch die Charakterisierung der 8 isolierten, homöobox-enthaltenden Genfragmente von *Xiphophorus* konnten 2 Gencluster, *Xiox-1* und *Xiox-2*, mit jeweils 3 Homöoboxen identifiziert werden. Die entsprechenden Gene wurden *Xiox-1.1*, *Xiox-1.2* und *Xiox-1.3* bzw. *Xiox-2.1*, *Xiox-2.2* und *Xiox-2.3* genannt. 2 weitere Homöoboxen, die Genloci wurden mit *Xiox-3* bzw. *Xiox-4* bezeichnet, konnten, nach bisherigem Kenntnistand, kein Gencluster mit Sicherheit zugeordnet werden. Der Vergleich von bekannten Restriktions-Fragmentlängen der isolierten Homöoboxen mit den Banden in den genomischen Southern Analysen gibt Hinweise darauf, dass die Homöobox *Xiox-3.1* am Locus *Xiox-3* dem Cluster *Xiox-2* als *Xiox-2.4* angeschlossen sein könnte. Für den Locus *Xiox-4*, mit dem Gen *Xi-X*, konnte die Lokalisation zu den Geschlechtschromosomen von *X. maculatus* bzw. den homologen Chromosomen von *X. helleri* festgelegt werden (siehe S. 238ff.). Die cluster-angehörigen, xiphophorinen Gene *Xiox-1.1/1.2/1.3*, *Xiox-2.1/2.2/2.3* und eventuell das Gen *Xiox-3.1*, im Falle einer Cluster-Lokalisation, sind sicherlich zu den geclusterten *Hox*-Genen der Vertebraten zu rechnen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass *Xiox-3.1* keinem *Hox*-Gen entspricht, sondern einem anderen Homöobox Gen mit einer hohen Homologie zu den *Hox*-Genen. 5 Gruppen von Genen, *Evx*, *Mox*, *Xlox*, *Gsx* und *Cdx*, haben eine hohe Homologie zu den *Hox*-Genen und sie teilen einen frühen evolutionären Ursprung (Brooke *et al.*, 1998;

DISKUSSION

Minguillon & Garcia-Fernández, 2003; siehe auch S. 230). Durch Analysen verschiedener Organismen mit HOM/*Hox*-Sonden sind häufig diese Gene charakterisiert worden. Diese Möglichkeit ergibt sich auch für die zwei, nicht-isolierten Homöobox Gene mit einer hohen Homologie zu den Sonden. Für das Gen *Xi-X* konnte eine Verwandtschaft mit der Familie *Xlox* der Homöobox Gene gefunden werden (siehe S. 233ff.).

Homöobox Gene, die in Cluster organisiert sind, sind eine erhebliche phylogenetische Entwicklung durchgelaufen, die vor allem an der Zahl der Gene in den jeweiligen Clustern und der Zahl der Cluster zu erkennen ist. Mit der Kenntnis über die strukturelle Organisation und phylogenetische Entwicklung von cluster-angehörigen Homöoboxen können die isolierten, cluster-lokalisierten Homöoboxen von *Xiphophorus* mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit bestimmten *Hox*-Genen zugeordnet werden:

Die cluster-angehörigen Homöobox Gene von HOM-C der Insekten und die 4 *Hox*-Cluster der Säuger zeigen eine Verwandtschaft, die in Form von Homologie, Reihenfolge in den Clustern und kolineares Expressionsmuster zu erkennen ist (Gaunt *et al.*, 1988; Graham *et al.*, 1989; Duboule & Dollé, 1989; Akam, 1989). Durch computervermittelte, vergleichende Sequenzanalysen bekannter Homöoboxen konnte die Zahl der Cluster-Homöoboxen in einem gemeinsamen Vorfahren der Arthropoden und Vertebraten auf 4-5 geschätzt werden, in der frühen Metazoen Evolution gab es vielleicht nur 3 Homöoboxen im Cluster (Kappen *et al.*, 1989; Schubert *et al.*, 1993; Zhang, J. & Nei, 1996). Porifera besitzt NK-ähnliche geclusterte Homöobox-Gene, aber *ProtoHox* (siehe S. 230) ist erst nach der Trennung der Eumetazoen von den frühen Metazoen entstanden (Larroux *et al.*, 2007). Nach der Trennung der Arthropoden und Chordaten haben lokale Genduplikationen innerhalb der respektiven Cluster unabhängig stattgefunden und zu erweiterten Genclustern geführt. Zwischen den Genen *Scr*, *Antp*, *Ubx* und *abd-A* bei *Drosophila* bzw. den Genen der paralogen Gruppen 5-8 der Säuger bestehen Homologien, die für ein gemeinsames Urgen dieser Gene in einem Vorfahren der Insekten und Vertebraten sprechen. Die Existenz eines einzigen Gens bei *Caenorhabditis elegans*, *mab-5*, mit einer gleich hohen Homologie zu den Genen *Antp*, *Ubx* und *abd-A* von *Drosophila* unterstützt diese Annahme (Bürglin & Ruvkun, 1993). Die respektiven Genduplikate zeigen alle eine hohe Verwandtschaft mit dem Gen *Antp* von *Drosophila*, aber keine konkrete Zuordnung der Gene dieser beiden phylogenetisch weit entfernten Organismen ist aufgrund der unabhängigen Genexpansionen möglich. Für die Säuger-DNA zeigen die paralogen Gruppen 5-7 die höchsten Homologien zur *Antp*-Homöobox. Die Gene der Gruppe 8 zeigen eine geringere Homologie zu der Homöobox selbst, aber aufgrund der flankierenden Sequenzen ist eine hohe Verwandtschaft zu den Gruppen 5-7 gegeben.

Die *Xiox*-Homöoboxen nachgewiesen für *Xiphophorus* beruhen daher vermutlich im Wesentlichen auf den Homöoboxen der paralogen Gruppen 5-7 in den Clustern *HoxA*, *HoxB* und *HoxC* mit den höchsten Homologien zu der Homöobox der Sonde *Antp*; in *HoxD* sind diese paralogen Gruppen nicht vertreten. Für die Säuger beträgt die Zahl in diesen Gruppen 8 (siehe Abb. 4, S. 25), für vier der charakterisierten Fischarten jeweils 9 (Hoegg & Meyer, 2005).

Während die horizontale Expansion der Homöobox-Cluster eine gewisse Freiheit der Sequenzabwandlung erlaubte, sind die kopierten Cluster in bezug auf Peptidsequenz der

Homöodomänen strenger konserviert (Kappen *et al.*, 1989). *Amphioxus* besitzt nur 1 *Hox*-Cluster, beinhaltet 14 paralogen Gruppen und stellt ein kritisches Intermediat in der *Hox*-Cluster Evolution dar (Ferrier, 2004; Ferrier *et al.*, 2000). In der Chordatenlinie ergaben Duplikationen des gesamten erweiterten Genclusters neue *Hox*-Cluster (Schughart *et al.*, 1989; Kappen *et al.*, 1989), die Clusterzahl 4 wurde bei Tetrapoden durch zwei Duplikationsrunden erreicht. Früh in der Fischevolution, hat eine weitere Duplikation stattgefunden, zu 8 *Hox*-Clustern führend (Hoegg *et al.*, 2004). Beim *Danio rerio* (Amores *et al.*, 1998) ist das eine *HoxD*-Cluster später eliminiert worden, beim *Fugu rubripes* (Amores *et al.*, 2004), *Tetradon rigovirides* (Jaillon *et al.*, 2004) und *Oryzias latipes* (Naruse *et al.*, 2000) ist nur ein *HoxC*-Cluster anwesend.

Es ist zu vermuten, dass bei *Xiphophorus*, wie bei den drei anderen charakterisierten Fischarten der Neoteleostei, die Cluster *HoxA*, *HoxB* und *HoxD* dupliziert vorliegen und vom *HoxC* eine Kopie verloren gegangen ist, wie auch für die nah verwandte Art *Medaka* der Fall ist (Naruse *et al.*, 2000; Hoegg & Meyer, 2005).

Die Cluster verschiedener Evolutionslinien gehen eine unterschiedliche Degeneration der Gene durch: Innerhalb der Teleostei wurde die Abwesenheit der paralogen Gruppe 7 in allen *Hox*-Clustern von *Fugu rubripes* beschrieben (Aparicio *et al.*, 1997), im Zebrafisch *Danio rerio* ist nur *Hoxb-7a* dieser Gruppe präsent (Amores *et al.*, 1998) und für *Morone saxatilis* ist *Hoxa-7* beschrieben worden (Snell, E.A. *et al.*, 1999). *Hoxc-1* und *Hoxc-3* sind bei *Danio rerio* aktiv (*Hoxc-1a*, *Hoxc-3a*), in *Fugu rubripes* sind sie als Pseudogene vorliegend und bei den Säugern fehlen sie vollständig. Das Gen *Hoxa-10* ist beim *Fugu rubripes* und Mensch aktiv während es beim *Danio rerio* (*Hoxa-10a*) als Pseudogen vorliegt. Diese Beispiele zeigen, dass eine gewisse Individualität der verschiedenen Organismen in bezug auf die Zahl und Aktivität von *Hox*-Genen vorliegen kann, und dass eine geschätzte Zahl der Gene und Gencluster erst durch genaue strukturelle Analysen Bestätigung finden müsste. Eine Sequenzierung der isolierten, xiphophorinen Homöoboxen, um eine sichere Zuordnung zu den einzelnen *Hox*-Genen treffen zu können, und eine nähere strukturelle Charakterisierung der Gencluster auf weitere Homöoboxen wäre für die evolutionären Aspekte interessant. Besonders interessant ist die Frage, ob die Gene *Hoxa-7*, *Hoxa-10*, *Hoxc-1* und *Hoxc-3*, die in verschiedenen Fischgenomen in einem unterschiedlichen Zustand vorliegen, im Genom von *Xiphophorus* präsent und aktiv sind.

Ein weiterer Cluster mit Homöoboxen konnte in *Amphioxus* festgestellt werden (Brooke *et al.*, 1998). Es besteht aus den Genen *Gsx*, *Xlox* und *Cdx*. Das charakterisierte, xiphophorine Gen *Xi-X* dieser Arbeit hat eine hohe Homologie zu den *Xlox*-Genen (siehe S. 233ff.). Durch molekular phylogenetische Analysen konnte eine Verwandtschaft dieser Gene mit den Genen im *Hox*-Cluster festgestellt werden, was auch durch das kolineare Expressionsmuster während der Entwicklung Bestätigung findet. Brooke *et al.* (1998) postulierten, dass der Cluster in der triploblastischen Linie durch eine Kopie eines „ProtoHox“-Clusters mit 4 Genen, auch der primitive Vorläufer der *Hox*-Cluster, entstanden ist. Dem Cluster wurde aufgrund der Paralogität zum *Hox*-Cluster der Name *ParaHox* gegeben. *ParaHox* ist somit eine evolutionäre Schwester der *Hox*-Cluster. Eine Übersicht über die Verwandtschaft und evolutionäre Entwicklung von *ProtoHox*, *Hox* und *ParaHox* wird von Garcia-Fernández (2005a) gegeben.

Man versucht, die Studien der Entwicklung und die Studien der Evolution zusammenzuführen, auch evo-devo genannt (Jenner & Wills, 2007). *Hox*-Gene sind bei der Spezifizierung der regionalen Identität vom Körperplan beteiligt, und Änderungen in der *Hox*-Genexpression könnte eine Rolle bei der Entstehung der enormen Diversität der Organismen ausgeübt haben. Marx stellte schon 1992 die Hypothese auf, dass man vielleicht eines Tages durch die Analysen der Homöoboxen in Organismen verschiedener Evolutionsstufen erklären kann, wie neue Arten entstanden sind. Durch vergleichende Studien der *Hox*-Genexpression bei verschiedenen Organismen und die Herstellung von transgenen Tieren hat man hierfür schon konkrete Anhaltspunkte finden können (Kenyon, 1994; Abzhanov & Kaufman *et al.*, 1999; Gibson, 1999; Carroll *et al.*, 2005). Vergleichende Analysen der Wingmorphologie von Insekten mit der Aktivität des HOM-Gens *Ubx* weisen auf komplexe, mehrstufige Prozesse der Arten-Evolution hin, wobei die unterschiedliche Regulation von Zielgenen eine kritische Rolle spielt (Weatherbee *et al.*, 1999; Hersh *et al.*, 2007). Die Augenflecken der Schmetterlingsflügel, die in Position, Zahl, Größe und Farbe variieren können, sind auf wenige Änderungen von regulatorischen Genen zurückzuführen (Brakefield *et al.*, 1996). Auch für einen Fischart konnte die unterschiedliche Regulation eines Homöobox Gens (*pitx-1*) für die Reduktion von pelvischen Strukturen gezeigt werden (Shapiro *et al.*, 2004). Wray (2003) fasst die Bedeutung der transkriptionellen Regulation für die Evolution der Entwicklung zusammen. Viele konservierte nicht-kodierende Sequenzen in den *Hox*-Clustern sind ausfindig gemacht worden, von denen die Autoren sich wichtige Aufgaben für die funktionelle und phänotypische Unterschiede versprechen (Hoegg & Meyer, 2005). Auch microRNA Gene sind in den *Hox*-Clustern entdeckt worden, sie üben vermutlich Funktionen bei der post-transkriptionellen Regulation der *Hox* Gene während der Entwicklung und Evolution aus (Pearson *et al.*, 2005).

Die Evolution der *Hox*-Gene in Fischen, die Vertebraten mit der höchsten Zahl verschiedener Arten und einer großen morphologischen Diversität, ist für die Korrelation der einzelnen *Hox*-Gene mit Funktionsbereichen interessant (Holland, 1997; Finnerty & Martindale, 1998; Meyer, M., 1998). Die Duplikation des Genoms in der frühen Fischevolution korreliert mit der Artenvielfalt dieser Evolutionslinie (Hoegg *et al.*, 2004). Die Akzeleration der genomischen Evolution könnte mit der akzelerierten morphologischen Evolution entlang der Evolutionslinie vom *Fugu rubripes* korrelieren (Aparicio *et al.*, 1997). Dieser Art fehlen Bauchflossen und Rippen, und Knochen im Kopfbereich sind fusioniert. Sind die fehlenden *Hox*-Gene diejenige, die aufgrund des Verlustes von Strukturen nicht länger erforderlich sind? Sind diese oder andere *Hox*-Gene auch in anderen Fischarten, die bestimmte Strukturen verloren haben, wie z.B. die Bauchflossen der Aale oder die Schwanzflosse von *Mola mola*, auch abwesend? Könnte die Zurückbildung oder der Verlust von Extremitäten bei Landvertebraten, wie bei einigen Amphibien, Reptilien, und auch den Whalen, mit dem Verlust von *Hox*-Genen korreliert werden?

Ein Vergleich der Organisation und Aktivität der *Hox*-Gene mit morphologischen Eigenschaften verschiedener Fischarten könnte auf Funktionen der *Hox*-Gene bei morphologischen Prozessen und die Entwicklung der Artenvielfalt hinweisen. Für das xiphophorine Melanom-Modell wäre es besonders interessant die Gene aufgrund der unterschiedlichen Pigmentierung und Tumorgenese der Organismen zu vergleichen. Viele Arten von z.B. Fischen, Amphibien und Reptilien haben ausgeprägte Farbmuster,

deren Compartmentierung, Pigmentierung und Intensität möglicherweise über Homöobox Gene reguliert werden könnten (siehe auch Diskussion S. 276ff.).

Zusammenfassung/weitere Fragestellungen

10 Homöoboxen mit einer Homologie von über 70% zu den eingesetzten Sonden konnten im Genom von *Xiphophorus* nachgewiesen werden, davon wurden 8 isoliert. Die eine Homöobox, *Xi-X*, gehört zu den *ParaHox*-Genen und wurde in dieser Arbeit ausführlicher untersucht. 7 weitere Homöoboxen konnten isoliert werden und sind vermutlich Bestandteile von zwei *Hox*-Clustern, *Xiox-1.1/1.2/1.3* und *Xiox-2.1/2.2/2.3/(3.1)*, vorwiegend der paralogen Gruppen 5-7 zugehörend.

Eine genauere Charakterisierung der isolierten homöobox-enthaltenden Fragmente könnte die Identität der Gene festlegen und für Studien zur Evolution als Grundlage dienen. Ein Vergleich der Organisation und Aktivität der *Hox*-Gene mit morphologischen Eigenschaften verschiedener Fischarten könnte auf Funktionen der *Hox*-Gene bei der Entwicklung der Artenvielfalt hinweisen.

STRUKTURELLE ASPEKTE VON XI-X

Southern Analysen xiphophoriner DNA, hybridisiert mit den homöobox-enthaltenden Gensonden der Gene *Antp* und *ftz* von *Drosophila*, ergaben Hinweise auf eine Kopplung einer Homöobox mit den spezifischen Pigmentzellloci auf dem X- bzw. Z-Chromosomen von *X. maculatus*. Diese Homöobox *Xi-X* (*Xiphophorus*, X-Chromosom) wurde durch die Isolation eines 2,2 kb *EcoRI*-Fragments von *X. maculatus DrSd* in dieser Arbeit genauer charakterisiert; die Sequenz des isolierten Genfragments wurde ermittelt (siehe S. 233ff.) und durch Southern Analysen die Organisation in verschiedenen Tieren verglichen (siehe S. 240ff.). Eine 3'-liegende Region des Genfragments (*Xi-X_C*), die als einzelne Kopie im Genom von *Xiphophorus* vorliegt, wurde für die Vergleiche der strukturellen Beschaffenheit des Gens in den verschiedenen Arten, Rassen und Populationen von *Xiphophorus* eingesetzt. Um die strukturelle Beziehung zwischen den für die Tumorentwicklung relevanten Genen und der Homöobox zu erkunden, wurden Southern Analysen von DNA, isoliert aus den Rückkreuzungsbastarden von *X. maculatus* und *X. variatus* mit *X. helleri*, durchgeführt (siehe S. 238ff.). Eine parallele Vererbung der PSP-Loci und der PS-*Xi-X*-Fragments würde auf eine Kopplung von *Xi-X* und der Pigmentzellloci hinweisen.

Analysen von DNA, isoliert aus mehreren Fischen gemeinsam, ergaben eine Vielfalt verschiedener *Xi-X*-Fragments ähnlicher Länge und außerdem keine eindeutige Aussage über die Kopplung. Um die Vererbung der PS- und HS-*Xi-X*-Fragments zu beurteilen, mussten zuerst Untersuchungen der strukturellen Organisation von *Xi-X* an Einzelindividuen der parentalen Arten durchgeführt werden. Weiter musste die Vererbung dieser Fragmente in Einzelindividuen der Rückkreuzungsbastarde verfolgt werden. Die scheinbar einfache Frage über eine eventuelle Kopplung der Loci führte zu einer ausführlichen Studie der strukturellen Organisation von *Xi-X* in den parentalen Wildtyp-Genomen und in den Rückkreuzungsbastarden verschiedener, xiphophoriner

Arten, Rassen und Populationen, wobei über 600 Fische in der Studie eingingen. Diese Untersuchungen lieferten zusätzlich zu einer Antwort auf die gestellte Frage nach der chromosomalen Lokalisation von *Xi-X* (siehe S. 238ff.) indirekt eine Analyse der Verwandtschaft der verschiedenen Arten von *Xiphophorus* (siehe S. 242) und eine Charakterisierung der mutierten Geschlechtschromosomen (siehe S. 241). Durch Analysen der Pigmentzellmuster-Mutanten konnte eine eventuelle Beziehung der unterschiedlichen PS-*Xi-X*-Organisation zu der Entstehung der PSPM nachgegangen werden (siehe S. 240). Die Studien konnten außerdem einen untypischen Erbgang der parentalen *Xi-X*-Organisationen in den Bastarden feststellen (siehe S. 251ff.), was Hinweise auf eine Bedeutung der tumorrelevanten Gene, der *Tu*-Komplex und das Gen *R_{Diff}* bzw. an diese Loci gekoppelten Gene, für die DNA-Instabilität ergab. Weiter wiesen diese Untersuchungen auf geschlechts-determinierende Eigenschaften der *Xi-X*-Region hin (siehe S. 245ff.). Die repetitive Sequenz Poly(GTCT/GACA), die sich in dem isolierten Genabschnitt befindet, bietet für Kopplungsfragen und Analysen der Populationsgenetik zusätzliche Informationen und ist möglicherweise ein Faktor zur Instabilität der untersuchten *Xi-X*-Genregion (siehe S. 242 und S. 252) und könnte für eine röntgenstrahl-induzierte, transgenerationelle, nicht-mendelsche Vererbung eines verstärkten Pigmentzellmusters verantwortlich sein (siehe S. 263).

Strukturelle Beschaffenheit und Konservierung

Die isolierte Genregion *Xi-X* von 2,2 kb wurde in ihrer Vollständigkeit sequenziert und die Sequenz mit der Gendatenbank von NCBI verglichen. Wie durch die Hybridisierungsanalysen mit den dipteren Homöoboxen auch zu erwarten war, wurde in *Xi-X* eine Homöobox mit hoher Homologie zu den eingesetzten Sonden detektiert (siehe "Das Homöobox Gen, *Xi-X-HB*", unten). Eine Region, 3'-liegend im isolierten *Xi-X*-Bereich, aber nicht die Homöobox, ist in einem Leber-Transkript präsent (siehe „Gen unbekannter Motive, *Xi-X-LC*“, S. 236). Zusätzlich konnten die drei einfachen, tandemwiederholten Einheiten (T)₂₁, (TA)₁₄ und (GTCT)₁₅ in *Xi-X* ausfindig gemacht werden (siehe "SSRs in der isolierten *Xi-X* Region", S. 237).

Das Homöobox Gen, *Xi-X-HB*

Die Homöobox von *Xi-X* weist eine Homologie von 72% zu den Homöoboxen der eingesetzten Gensonden von *Antp* und *ftz* (Scott & Weiner, 1984) auf. Die höchste Homologie konnte zu den Genen der *Xlox* Familie (Bürglin, 1993) der Homöobox Gene gefunden werden, die u.a. durch einen charakteristischen Histidin-Aminosäurerest in der Position 44 der Homöobox gekennzeichnet ist. Mitglieder der *Xlox*-Familie sind für u.a. Mollusken (Canapa *et al.*, 2005), Anneliden (Wedeen *et al.*, 1990; Wysocka-Diller *et al.*, 1995; Irvine *et al.*, 1997), Fische (Milewski *et al.*, 1998), Amphibien (Wright *et al.*, 1988), Vögel (Gerrish *et al.*, 2000) und Säuger (Ohlsson *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 1994; Offield *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1994; Leonard *et al.*, 1993) beschrieben worden, aber kein Nachweis konnte für die Arthropoden geführt werden (Garcia-Fernández, 2005a). In der Literatur werden verschiedene Gennamen der *Xlox*-Mitglieder verwendet. Nach Konvention wurde die Bezeichnung *pdx-1* („pancreatic-duodenal homeobox gene“) für die charakterisierten *Xlox*-Gene der Vertebraten vorgeschlagen (von Offield *et al.*,

DISKUSSION

1996 und Peshavaria *et al.*, 1997), aber IPF-1 („insulin promoting factor“) wird häufig für das humane Gen angewandt.

Es besteht ein Homologiegrad von *Xi-X* zu anderen *pdx*-Genen, der mit dem evolutionären Verwandtschaftsgrad der Organismen korreliert: Die höchste Homologie kann für *Xi-X* zu den piscinen *pdx*-Genen gefunden werden. Zum Zebrafisch, *Danio rerio* (Milewski *et al.*, 1998), beträgt sie 82% in einer Region von 259 nt, wobei 85% Homologie sich in der Homöobox selbst befindet und 14 von 18 nt in der 5'-Region und 47 von 61 nt in der 3'-Region zur Homöobox identisch sind. Für den Medeka-Fisch, *Oryzias latipes* (NCBI; Accession number AB026976), sind nur 121 nt der Homöobox publiziert worden, 94% sind mit denen von *Xi-X* identisch. Zusammen mit 182 nt 3' zur Homöobox beider Fischarten, wobei 77% identisch sind, beträgt die Homologie 84% in 303 nt. *Oryzias latipes* braucht hierfür eine Lücke von 3 nt in der 3'-Region. Zum Frosch (Wright *et al.*, 1988) existiert eine Homologie von 78% zwischen den Homöoboxen, 11 von 18 nt strangaufwärts und 35 von 60 nt strangabwärts zu den Homöoboxen sind identisch; insgesamt eine Homologie von 72% in 258 nt. Zum *pdx-1* Gen der Ratte (Leonard *et al.*, 1993) ist die Homologie geringer, es besteht eine Gesamthomologie von 76% in einer Region von 213 nt; 79% Homologie befindet sich in der Homöobox, und 8 von 12 nt strangaufwärts und 11 von 21 nt strangabwärts sind identisch. Zu den Homöoboxen der evolutionär niedrigeren Organismen begrenzen sich die Homologien auf die Homöoboxen, und der Homologiegrad ist geringer, z.B. zur Homöobox vom Gen *Htr-A2* des Blutegels *Helobdella triserialis* (Wedeen *et al.*, 1990) beträgt sie 64%.

Ein Exon-Intron Spleißsignal, das bei sehr vielen Familien der Homöobox Gene sich kurz strangaufwärts zur Homöobox befindet, scheint auch bei *Xi-X* konserviert zu sein. 29 bp strangaufwärts befindet sich ein Spleißakzeptorsignal mit einem hohen Homologiegrad zum Konsensus einer Intron-Exon Verbindungsstelle. Keine Expression der benachbarten 5'-Region konnte nachgewiesen werden (siehe S. 266ff.), und in allen drei Leserastern dieser Region befinden sich Stop-Codons; alles Tatsachen, die für einen Intronbereich strangaufwärts zum isolierten Homöobox-Bereich sprechen. Ein Intron kurz strangaufwärts zur Homöobox erklärt die begrenzte Homologie zu anderen Genen in diesem Bereich. Auch bei den drei Mitgliedern des LOX3-Clusters von der Blutegel *Hirudo medicinalis* befinden sich Spleißakzeptorsignale 26 nt strangaufwärts zu den Homöoboxen (Wysocka-Diller *et al.*, 1995). Nach meinen Kenntnissen ist diese Fragestellung für keine der anderen *Xlox*-Mitglieder besprochen worden. Durch Vergleiche von genomischer DNA und cDNA kann auch für das humane Gen ein Spleißpunkt in diesem Bereich entnommen werden.

Auf der Aminosäureebene besteht zu dem *pdx-1*-Gen der Ratte 74% identische und 84% positive (identische und konservierte) As in einer Region von 93 As, in der C-terminalen Region zur Homöodomäne ist eine Lücke von 8 As bei *Xiphophorus* eingebaut worden. Im Vergleich zu dem Gen des Frosches braucht das xiphophorine Gen eine Lücke von 10 As in dieser Region, um es auf eine Homologie von 65% identische und 75% positive As in einer Region von 123 As zu bringen. Der Homologiegrad zwischen Frosch und *Xiphophorus* ist zwar kleiner als zwischen *Xiphophorus* und Ratte, die Ratte steht dem Fisch weiter entfernt als der Frosch, aber dafür erstreckt sich die Homologie über weitere 30 As zwischen den Genen vom Fisch und Frosch. Zu dem piscinen Gen von *Danio rerio* besteht ein Homologiegrad von 76% identische und 82% positive Aminosäuren in einer

DISKUSSION

Region von 117 As; hierfür wurde eine Lücke von 6 As beim Zebrafisch benötigt. Die höchste Homologie konnte zu dem Gen von Medeka (*Oryzias latipes*) gefunden werden, innerhalb der 40 publizierten As der Homöodomäne gibt es eine 100%-ige Identität. Nur eine Lücke von einer As wird in der Medeka-Sequenz benötigt, um 83% Identität und 88% positive As von 59 As in der C-terminalen Region zur Homöodomäne ausfindig zu machen. Insgesamt beträgt die Homologie 89% identische bzw. 92% positive As in einer Region von 99 As zwischen den beiden Sequenzen von *Oryzias* und *Xiphophorus*.

Die zwei nah verwandten Fischgattungen *Oryzias* und *Xiphophorus* zeigen einen auffallend hohen Homologiegrad, sowohl in der Homöodomäne, als auch im C-terminalen Bereich der Gene *pdx* und *Xi-X*. Zusätzlich ist die Differenz zwischen den identischen und positiven Aminosäuren sehr klein; die Homologie beruht weitgehend auf identische Aminosäuren. Die beschriebenen Gene der Fische *Oryzias* und *Xiphophorus* sind beide zusätzlich durch die Aminosäure Arg (Codon CGC) in Position 24 der Homöodomänen im Gegensatz zu Lysine (Codon AAA) bei den anderen beschriebenen *pdx-1*-Genen, auch vom Zebrafisch, zu charakterisieren. Die Homologie hört für beide Gattungen mit einem Stop-Codon auf, was für die C-terminalen Regionen der Gene spricht. Bei *Xiphophorus* wird die kodierende Sequenz mit 399 nt bis zum Polyadenylierungssignal gefolgt, die vermutlich nicht translatiert werden. Diese Region enthält die simplen repetitiven Sequenzen (T)₂₁ und (GTCT)₁₅, die eventuell bei der komplexen, reziproken Regulation der Expression von LeberB- und LeberC-Transkripten in Abhängigkeit von der Nahrungseinnahme beteiligt sein könnten (siehe Diskussion zur Expression, S. 271).

Das Expressionsmuster der Gene weist darauf hin, dass *Xi-X*, trotz des hohen Homologiegrades, nicht das Ortholog des *pdx-1*-Gens sein kann (siehe S. 266ff.). Die Erscheinung von einer extra Bande in Southern Analysen mit *Xi-X_{B-Hom}* als Sonde spricht für zwei Gene mit einer hohen *pdx-1* Homologie im Genom von *Xiphophorus*. Die Homologie der Sonde *Xi-X_{B-Hom}* zu dem *pdx-1*-Gen von *Danio rerio* beträgt 83% (83 von 100 nt), wobei 90% sich in der Homöobox-Region (37 von 41 nt) und 78% (46 von 59 nt) sich strangabwärts befindet. Die Homologie von *Xi-X* zum xiphophorinen *pdx-1* Gen in der charakterisierten Region müsste damit vermutlich auch so hoch sein, dass das Gen unter den angewandten Hybridisierungsbedingungen nachweisbar wäre. Keine andere *Xi-X*-Subsonde detektiert das zusätzliche Fragment unter stringenten Bedingungen. Vermutlich besitzt *Xiphophorus* ein zu *Xi-X* zusätzliches Gen mit einer hohen *pdx-1* Homologie, das dem *pdx-1* Gen von *Xiphophorus* entspricht. Die Frage nach einem zweiten Gen mit einer hohen *pdx-1* Homologie im Genom vom *Xiphophorus* würde durch die Charakterisierung des 2,9 kb *Bam*HI-Fragments mit einer hohen Homologie zu der Subregion *Xi-X_{B-Hom}* vermutlich beantwortet werden.

Studien zur evolutionären Konservierung von *Xi-X*, durchgeführt mit den Sonden *Xi-X_{B-Spez1}* und *Xi-X_C*, konnten in Southern Analysen eine Homologie nur unter den Zahnkarpfen nachweisen. Dieses galt sowohl für die eierlegenden Zahnkarpfen *Aplocheilichthys lineatus*, als auch für die lebendgebärenden Zahnkarpfen *Poecilia sphenops*, *Poecilia reticulata* und *Heterandria bimaculata*. Die anderen untersuchten Fischordnungen Cypriniformes (*Cheirodon axelrodi*, *Danio rerio*), Siluriformes (*Corydoras paleatus*) und Perciformes (*Pelvicachromis pulcher*), sowie die evolutionär niedrig und höher stehenden Tiergruppen, vertreten durch die Mollusken (*Planorbis corneus*, *Sepia officinalis*), Vögel (*Columba livia*) und Säuger (*Ovis ammonis*, *Mus*

musculus, *Homo sapiens*), waren negativ. Es muss in Frage gestellt werden, ob das Gen *Xi-X* nur unter den Zahnkarpfen präsent ist und eine Funktion ausübt.

Ein Gen *Xlox* wurde in dem Cluster *ParaHox*, eine evolutionäre Schwester der *Hox*-Cluster, von *Amphioxus* beschrieben (Brooke *et al.*, 1998; siehe auch Diskussion S. 230). Nach einer Entwicklung aus einem ProtoHox-Cluster haben sich vermutlich 4 *Hox*- und 4 *ParaHox*-Cluster in der frühen vertebralen Evolution gebildet (Coulier *et al.*, 2000; Kourakis & Martindale, 2000; Pollard & Holland, 2000; Garcia-Fernández, 2005b). Ein *ParaHox*-Cluster mit 3 Genen (*Gsx*, *pdx-1*, *Cdx*) ist auf Chromosom 13 (*ParaHox A*) des Menschen erhalten geblieben. Die anderen 3 *ParaHox*-Cluster, mit Lokalisationen auf den humanen Chromosomen 4 (*ParaHox C*), 5 (*ParaHox B*) und X (*ParaHox D*), haben alle das *Xlox*-Gen verloren, besitzen aber eins der Gene *Gsx* oder *Cdx*. Früh in der Evolution der Teleosteen hat sich die Cluster-Lokalisation der *ParaHox*-Gene durch Genverluste aufgelöst (Mulley *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass durch die Duplikation des gesamten Genoms in dieser Evolutionsreihe, die Restriktion für den Erhalt der Cluster verloren ging. Primitive Fische, die kein dupliziertes Genom besitzen, wie *Polypterus* und *Amia*, haben ein intaktes *ParaHox*-Cluster. Die Gesamtzahl der *ParaHox*-Gene der Teleosteen ist gleich wie bei Frosch, Maus und Mensch, sind aber auf doppel so viele Chromosomen verteilt (Siegel *et al.*, 2007).

Xi-X ist vermutlich ein zweites, erhaltenes *Xlox*-Gen, das in der Literatur noch nicht beschrieben worden ist, und in einem begrenzten Zweig der Fischevolution, vielleicht nur unter den Zahnkarpfen, erhalten ist. Die Expression dieses Gens in der Leber, Muskulatur und den Herzen spricht für ein zweites aktives *Xlox*-Gen.

Gen unbekannter Motive, *Xi-X-LC*

Mit der 3'-Region vom isolierten *Xi-X*-Bereich, *Xi-X_C*, konnte ein Transkript von ca. 0,8 kb in der Leber nachgewiesen werden, das Transkript *Xi-X^{LeberC}* (siehe S. 268ff.). Es beinhaltet keine anderen Bereiche der isolierten *Xi-X*-Region und wird quantitativ reziprok zu dem homöobox-enthaltenden Transkript *Xi-X^{LeberB}*, auch 0,8 kb betragend, bei Alimentationsvorgängen bzw. Fasten exprimiert. Homologe EST-Sequenzen in der NCBI-Genbank konnten zu dieser Region ausfindig gemacht werden. Für die Regenbogenforelle *Oncorhynchus mykiss* (accession numbers: BX076399, BX076400) sind 73% in 353 nt homolog, für *Xiphophorus* müssen 3 Lücken eingebaut werden. Auch zum Zebrafisch ist eine Homologie auffindbar (accession numbers: AL910293, AL910294), diese beschränkt sich auf 73% in 199 nt; die Homologie fängt mit dem selben Nukleotid am 5'-Ende der gemeinsamen Region von *Xiphophorus* und *Oncorhynchus* an. Im Vergleich zum Transkript von *Danio* braucht *Xiphophorus* 2 Lücken und *Danio* entsprechend eine Lücke. Verglichen mit der einen von Forelle EST-publizierter Sequenz (accession number BX076400), die mit einem Polyadenylierungssignal und PolyA-Schwanz versehen ist, wird das Gen *Xi-X-LC* komplementär und in entgegengesetzte Richtung zum homöobox-enthaltenden Gen *Xi-X* abgelesen. Nur 72 nt trennen die beiden Leber-Transkripte B und C, berechnet vom Polyadenylierungssignal im LeberB-Transkript zum gemeinsamen, homologen Bereich zwischen *Xiphophorus* und der Regenbogenforelle im LeberC-Transkript. Das Transkript der Regenbogenforelle hat 808 Basen, wie auch das *Xi-X^{LeberC}*-Transkript ca. 0,8 kb

beträgt, und die gemeinsame Region der beiden Gene von 353 Basen müsste im *Xi-X*-Transkript mit weiteren Exons in sowohl 5'- als auch 3'-Richtung gespleißt werden. Keine bekannten Motive sind für diese Gene auffindbar.

SSRs in der isolierten *Xi-X*-Region

Xi-X beinhaltet die simplen repetitiven Sequenzen (SSRs) Poly(T), Poly(TA) und Poly(GTCT), die auch als Mikrosatelliten zu bezeichnen sind (Tautz & Renz, 1984; Bruford & Wayne, 1993; Tautz & Schlötterer, 1994).

Die Sequenz (GTCT)_n, die in *Xi-X* 15 Mal perfekt wiederholt ist, ist in der Literatur auch als die homologe Sequenz Poly(GACA) bekannt. Poly(GACA) wird zusammen mit der nah verwandten Sequenz Poly(GATA) auch *Bkm*-DNA ("banded krait minor satellite") genannt (Singh, L. *et al.*, 1980). Die (GTCT)₁₅-Sequenz befindet sich in *Xi-X* 377 bp strangabwärts zur Homöobox und ist in Transkripten verschiedener Organe anwesend (siehe S. 266ff.). Die Bedeutung von Poly(GTCT/GACA) in *Xi-X* wird in den folgenden Abschnitten zur strukturellen Analyse von *Xi-X* ausführlicher diskutiert (siehe S. 242, 248, 252 und 263).

Poly(T), die Base T kommt in *Xi-X* 21 mal tandem wiederholt vor, ist ebenso als eine im Genom repetitive Sequenz bekannt. Ein eventuell genomischer Ursprung dieser SSR wird durch eine reverse Transkription von Transkripten mit einem Poly(A)-Schwanz und eine Reintegration der cDNA in das Genom diskutiert (Sharp, 1983). Diese Konstellation ist besonders für Pseudogene beschrieben worden. Auch ein Einbau von Poly(N)-Sequenzen als ein Bestandteil von Retrotransposons wird als möglich gehalten (Rogers, 1985). In *Xi-X* befindet sich Poly(T) in einer Region zwischen der Homöobox und Poly(GTCT), 55 bp trennen die beiden Satelitten-DNA, und Poly(T) gehört daher vermutlich zum transkribierten Genbereich. Da *Xi-X* transkriptionell aktiv ist, handelt es sich hier nicht um ein Pseudogen.

Die Sequenz (TA)₁₄ befindet sich in der 5'-Region vom untersuchten *Xi-X*-Fragment, d.h. strangaufwärts zur Homöobox. Sequenz- und Expressionsanalysen konnten Hinweise darauf geben, dass die Poly(TA)-Sequenz vermutlich in einem Intron des *Xi-X*-Gens lokalisiert ist. Dinukleotide als repetitive Elemente machen 78% der SSRs von *Xiphophorus* aus (Ju *et al.*, 2005).

Nach ihrer Entdeckung stand zur Diskussion, ob die repetitiven Sequenzen in der Evolution konserviert sind und spezifische Funktionen ausüben, oder ob sie per Zufall im Genom begrenzt vorliegen und durch Mechanismen wie "replication slippage", ungleiches Crossover und Transposition sich vermehren bzw. ihre Existenz erhalten (Orgel & Crick, 1980; Doolittle & Sapienza, 1980). Sie werden im letzten Falle sozusagen als Müll, als egoistische DNA ohne spezifische Funktionen, von Generation zu Generation mitgetragen. Für einige SSRs wurden inzwischen spezifische Aufgabenbereiche u.a. bei der Regulation von Genaktivitäten, Chromatinstruktur, Rekombination, DNA Replikation und beim Zellzyklus berichtet (Übersicht von Li *et al.*, 2002). Für die *Bkm*-Sequenzen kommt die besondere Rolle dieser Sequenzen bei der heterogametischen Geschlechtsbestimmung in Frage (siehe S. 248). Die genetische und evolutionäre Mechanismen der SSRs sind noch unklar (Li *et al.*, 2002).

Zusammenfassung/weitere Fragestellungen

Ein 2,2 kb Fragment des Gens *Xi-X* von *X. maculatus DrSd* wurde isoliert und sequenziert. Das Genfragment hat eine hohe Homologie zu dem *ParaHox*-Gen *pdx-1*. Die Homologie beträgt 82% in 259 nt zum Gen vom Zebrafisch, 76% in 213 nt zum Gen der Ratte. Das Expressionsmuster weist darauf hin, dass *Xi-X* nicht das Ortholog des *pdx-1* Gens sein kann. Evolutionsstudien deuten an, dass *Xi-X* nur bei den Zahnkarpfen präsent ist und diese Fischarten sind somit die einzigen Vertebraten mit zwei *Xlox*-Genen. Vermutlich ist das Gen *Xi-X* Ortholog zu einem NCBI-publizierten Sequenz von Medeka (*Oryzias latipes*), mit dem es viele Gemeinsamkeiten aufweist.

In einem *Xi-X*-Transkript befindet sich nur die 3'-liegende Region C von *Xi-X* und das Transkript besitzt somit keine Homöobox. Die Homologie beträgt 73% zu publizierten EST-Sequenzen von Forelle und Zebrafisch (353 bzw. 199 nt; *Xiphophorus* braucht im Vergleich zum Zebrafisch 3 Lücken, im Vergleich zur Forelle 2 Lücken und die Forelle eine Lücke). Diese Genregion besitzt keine bekannten Motive.

Die isolierte *Xi-X*-Region enthält die drei simplen repetitiven Sequenzen (T)₂₁, (TA)₁₄ und (GTCT)₁₅.

In weiteren Experimenten könnten die beiden *Xlox*-Gene von *Xiphophorus* (*Xi-X* und *pdx-1*) isoliert und charakterisiert werden. Die evolutionäre Präsenz und *ParaHox*-Lokalisation der Gene sind weitere Fragestellungen. Der Beziehung und komplexer quantitativ reziproken Regulation der Expression (siehe S. 268) der beiden *Xi-X*-Sub-Gene (*Xi-X-HB* und *Xi-X-LC*) könnten nachgegangen werden.

Chromosomale Lokalisation

Kopplungsanalysen

Durch den Unterschied in Restriktionsfragment-Längen der *Xi-X*-Region zwischen *X. helleri* und den verschiedenen *X. maculatus*- bzw. *X. variatus*-Populationen, war es möglich, den Erbgang dieser Fragmente in interspezifischen Kreuzungen zu verfolgen. Die PS-Fragmente wurden typischerweise mit den PS-Pigmentzellmustern vererbt, was auf eine Kopplung der beiden Parameter hindeutete. Eine Studie bei 62 Einzelindividuen der ersten Rückkreuzung ergab eine parallele Vererbung der Loci *DrSd* und *Xi-X* in 53 Rückkreuzungsbastarden, was einem Abstand von 14,5 cM zwischen *DrSd* und *Xi-X* auf dem X-Chromosom entspricht. Die relativ gute Übereinstimmung der Rekombinationsinzidenz der beiden phänotypischen Untergruppen, die Rückkreuzungsbastarde mit (4/32) bzw. ohne (5/30) geerbtes PSPM, bestätigt den gefundenen Kopplungsgrad von ca. 15 cM (14,6±2,1 cM). In 4 Gesamtanalysen mehrerer Individuen wurden für den Phänotyp *DrSd* zusätzlich insgesamt 43 Rückkreuzungsbastarde untersucht, und dabei ein übereinstimmendes Ergebnis gefunden. Auch für die Chromosomen *X^{DySp}*, *Y^{ArSr}*, *Z^{BrNi}* und *X^{YeLi}* muss aufgrund von Gesamtanalysen und Einzeluntersuchungen von einer Kopplung der Pigmentzellloci mit *Xi-X* ausgegangen werden, obwohl hier große Zahlen der einzeln untersuchten Fische fehlen, die einen genauen Kopplungsgrad angeben könnten. Eine gleiche Lokalisation von *Xi-X* auf den Geschlechtschromosomen innerhalb einer Art bzw. in nahen verwandten Arten einer Gattung wäre aber vermutbar. Wird die Rekombinationsfrequenz der einzeln untersuchten Fische der F₂R-Generation aller untersuchten Pigmentzellmuster (*DrSd*, *ArSr*, *ArSr'*, *BrNi*) von *X. maculatus*

ausgerechnet, wird der gefundene Kopplungsgrad von ca. 15 cM bestätigt; 11 Rekombinationsereignisse in 74 Einzelindividuen ergibt einen Kopplungsgrad von 14,9 cM. Durch das Auftreten von zwei verschiedenen Fragmentlängen in einem *X. maculatus*-Weibchen, das den Chromosomensatz WZ besitzt, ist indirekt zu schließen, dass auf den W-Chromosomen, die keine PSP-Loci ausdrücken, auch eine Kopie von *Xi-X* lokalisiert sein müsste. Damit konnte *Xi-X* zu dem X-, Y-, Z- und W-Chromosom von *X. maculatus* und zu dem X-Chromosom von *X. variatus* lokalisiert werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass *Xi-X* im Genom von *X. helleri* auf ein autosomales Chromosomenpaar, das zu den Geschlechtschromosomen der Platyfische homolog ist, lokalisiert ist.

Für Kopplungsanalysen an Rückkreuzungsbastarden ist es wichtig, niedrige Rückkreuzungen einzusetzen, was deutlich durch Untersuchungen an 63 Einzelindividuen der F₄R-Generation mit dem PSPM *DrSd* gezeigt werden konnte. Die Rekombinationsfrequenz, gefunden in den beiden Untergruppen dieser Rückkreuzungsgeneration, d.h. mit (27/44) bzw. ohne (1/19) geerbtes PSPM, stimmte nicht mit der gefundenen Kopplung von 15 cM überein und findet auch für andere Kopplungsgrade keine Übereinstimmung. Die Rekombinationsinzidenz der beiden Untergruppen stimmt aber mit den erwarteten Zahlen bei einer F₇R-Generation mit einer Kopplung von 15 cM bei dieser Generation überein. Wenn höhere Rückkreuzungen für Kopplungsanalysen eingesetzt werden sollen, ist es wichtig, dass für jede der vorangegangenen Rückkreuzungen eine große Zahl Fische eingesetzt wurde, so dass der Anteil an rekombinanten Chromosomen für die jeweiligen Generationen repräsentativ vertreten ist. In diesem Beispiel beinhalteten die Fische der vorangegangenen F₃R-Generation vermutlich die Zahl rekombinanter Chromosomen, die für die F₆R-Generation zu erwarten wäre.

Auf den Geschlechtchromosomen von *X. maculatus* sind die Gene *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) und *x-erbB^{*i}* (*EGFR*) lokalisiert (Meierjohann & Schartl, 2006). Der Abstand zwischen den beiden Genen wird auf weniger als 300 kb geschätzt (Gutbrod & Schartl, 1999; Froschauer *et al.*, 2001). Keine Rekombination ist zwischen *x-erbB^{*i}* (*EGFR*) und dem Makromelanophorenlocus beobachtet worden (Woolcock *et al.*, 2006), so dass der Abstand zwischen *x-erbB^{*i}* (*EGFR*) und *Xi-X* ebenso 15 cM beträgt. Der Abstand von *Xi-X* zu *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) ist etwas größer, vermutlich maximal 16 cM; 332 kb bei *Xiphophorus* entspricht ungefähr 1 cM (Walter *et al.*, 2006). Zwischen den beiden *x-erbB^{*}*-Loci wird das sex-determinierende Gen vermutet (Woolcock *et al.*, 2006), auch das Gen für den Melanocortin-Rezeptor ist in diesem Bereich lokalisiert (Froschauer *et al.*, 2001).

Zusammenfassung/weitere Fragestellungen

Xi-X befindet sich auf den Geschlechtschromosomen von *X. maculatus* und auf den zu diesen Chromosomen homologen, autosomalen Chromosomen von *X. helleri*. Der Abstand zwischen *Xi-X* und den PSP-Loci *DrSd* beträgt ca. 15 cM.

Weitere Kopplungsanalysen könnten eine genauere Lokalisation von *Xi-X* im Vergleich zu weiteren klassisch genetisch definierten Loci, Genen und polymorphen Markern auf den Geschlechtschromosomen, LG 24, festlegen (Walter *et al.*, 2006; Woolcock *et al.*, 2006).

Xi-X Organisation in den Wildtypen und Farbmuster-Mutanten

Es wurde ein ausgedehnter Polymorphismus der *Xi-X*-Restriktionsfragmente in den verschiedenen xiphophorinen Wildtyp-Genomen festgestellt. Eine eventuelle Bedeutung der unterschiedlichen *Xi-X*-Organisationen für die Entstehung von Pigmentzellmustern bzw. der pigmentzellmuster-mutierten Phänotypen wird unten diskutiert. Der RFLP konnte außerdem eingesetzt werden, um die mutierten Geschlechtschromosomen der Platyfische zu charakterisieren (siehe S. 241). Aufgrund des RFLPs konnte Verwandtschaftsanalysen der verschiedenen Arten nachgegangen werden (siehe S. 242). Zusätzlich zu dem Polymorphismus der *Xi-X*-Fragmente konnten in Southern Analysen mit einer poly(GTCT/GACA)-enthaltenden Subsonde von *Xi-X* ein Polymorphismus einer Vielzahl (GTCT/GACA)_n-enthaltender Fragmente bei *Xiphophorus* detektiert werden. Die Sequenz Poly(GTCT/GACA) ist vermutlich für die Instabilität und der daraus folgende RFLP dieser Genregion verantwortlich (siehe S. 242).

Mit der Gensonde *Xi-X_C*, die sich in der 3'-Region des isolierten *Xi-X*-Fragments befindet, konnten in Southern Analysen zwei *Bam*HI-Restriktionsfragmente detektiert werden: Bedingt durch die eine *Bam*HI-Schnittstelle in der Gensonde *Xi-X_C* selbst sind die zu dieser Schnittstelle strangaufwärts- und strangabwärtsliegende *Bam*HI-Fragmente in Southern Analysen, in denen die genomische DNA mit *Bam*HI geschnitten worden ist, nachweisbar. Insgesamt wurden acht verschiedene Fragmentlängen für das 5'-liegende *Bam*HI-Fragment von *Xi-X* in den Wildtypen observiert; die Längen betragen 2,30, 2,40, 2,50, 2,55, 2,60, 2,65, 2,70 und 2,80 kb. Jede Art, Rasse oder Population besaß jedoch seine typischen Fragmentlängen, die für diese Gruppen im Wildtyp-Genom anscheinend stabil waren. Für die 3'-liegenden *Bam*HI-Fragmente konnten nur zwei verschiedene Längen ausfindig gemacht werden. Typisch für die vier untersuchten Populationen von *X. helleri* war ein 0,6 kb *Bam*HI-Fragment in der 3'-Region von *Xi-X*. Für alle untersuchten Populationen von *X. maculatus*, *X. variatus*, *X. xiphidium* und *X. montezumae cortezi* betragen die 3'-*Bam*HI-Fragmente 7,2 kb.

Spielt die unterschiedliche *Xi-X*-Organisation für die PSPM eine Rolle?

Es wurde die Frage gestellt, ob die unterschiedliche *Xi-X*-Organisation der Schwertträger und der Platyfische für die Entstehung von spezifischen Farbmustern von Bedeutung sein könnte: Für *X. maculatus* aus dem Rio Jamapa war das kürzeste 5'-liegende *Xi-X*-Fragment von 2,30 kb zutreffend, für *X. helleri* die drei Fragmente von 2,60, 2,65 und 2,70 kb. Ein zusätzlicher Hinweis auf eine Bedeutung von *Xi-X* für die Musterbildung lieferte ein Fragment von 2,65 kb, das außer bei *X. helleri*, auch bei einer *X. maculatus*-Population aus dem Uso macinta gefunden wurde. Diese Population von *X. maculatus* besitzt, wie die Schwertträger, kein spezifisches Pigmentzellmuster.

Die Untersuchung einer *X. helleri*-Population mit körperlichem Fleckenmuster, das Muster *Db*, in bezug auf *Bam*HI-Fragmente von *Xi-X* konnte eine bedingte Beteiligung des 2,3 kb Fragmentes für eine Fleckenbildung ausschließen; *X. helleri Db* weist die gleiche *Xi-X*-Organisation wie die *X. helleri*-Population ohne Fleckenbildung auf. Das längere Fragment von 2,65 kb, wie auch in der Population von *X. maculatus* aus dem Rio Usomacinta ohne Flecken beobachtet wurde, konnte außerdem auch bei wenigen Individuen mit dem PSPM *DySp* und *BrNi* beobachtet werden und spiegelt vielleicht eher

eine seltene Organisation von *Xi-X* bei *X. maculatus* wider. Eine kausale Bedingung der PS-*Xi-X*-Organisation für eine Bildung von spezifischen Farbmustern kann auch indirekt durch die Entstehung von PSPM in Rückkreuzungsbastarden mit ausschließlich einer HS-Organisation von *Xi-X* ausgeschlossen werden. Es bleibt noch offen, ob die PS-Organisation des Gens für eine korrekte Proliferationskontrolle der Makromelanophoren-Muster in den Platyfischen erforderlich ist.

Eine Reihe Farbmustermutanten wurden in bezug auf die *Xi-X*-Organisation untersucht. Keiner der Pigmentzellloci-deletierten Mutanten (*Dr* von *DrSd*, *Br* von *BrNi* und die Deletion der beiden Loci *ArSr*) zeigten im Vergleich zu den Wildtypen eine geänderte Organisation, was für eine Lokalisation von *Xi-X* außerhalb der Farbloci spricht. Dieses wurde durch die später gefundene Kopplung der Pigmentzellloci und *Xi-X* von 15 cM verständlich (siehe S. 238). Auch nicht die Translokationsmutanten (*DrLi*, *Sd^T*, *DrSd^{rec}*, *YeLiOrPu*, *DrArSr* und *DrAr*) zeigten strukturelle *Xi-X*-Aberrationen, was für Translokationsvorgänge spricht, die außerhalb der *Xi-X*-Region stattgefunden haben. Ebenso konnte für die untersuchten Kompartimentsmutanten (*DrSd'* und *BrNi^e*) oder die eine untersuchte Expressionsmutante (*ArSr'*) keine geänderte *Xi-X*-Organisation nachgewiesen werden: Die untersuchte *Xi-X*-Region spiegelt keine direkte Verantwortung dieses Gens für den geänderten Phänotyp dieser Farbmustermutanten wider.

Einige der untersuchten Farbmustermutanten (*YeLiOrPu*, *DrArSr*, *DrAr*) besaßen ausschließlich die HS-Organisation von *Xi-X*; die PS-Organisation ist vermutlich durch Rekombinationsereignisse der Geschlechtschromosomen mit den homologen Chromosomen von *X. helleri* in früheren Generationen verloren gegangen. Der Austausch homologer Chromosomen in Bastarden erschwert die Analysen von Loci, die aufgrund von einem relativ weit entfernten, gekoppelten Locus selektioniert und oft über mehrere Generationen durch erneute Rückkreuzungen erhalten sind.

Charakterisierung der mutierten Geschlechtschromosomen

Die PSP-Loci-tragenden Chromosomen von zwei der Pigmentzellmustermutanten, mit den Phänotypen *Sd^T* bzw. *DrLi*, konnten durch die Analysen der *Xi-X*-Fragmente besser charakterisiert werden:

Für Bastarde mit dem Phänotyp *Sd^T* wurde durch die verlorene, *Sd*-gekoppelte Funktion des Pterinophoren-Locus *Dr* ursprünglich vermutet, dass ausschließlich der Locus *Sd* auf ein autosomales Chromosom von *X. helleri* transloziert worden war (Anders, F., 1983; Anders, F. *et al.*, 1984). Die Kopplungsanalysen von *Xi-X* mit dem Makromelanophorenlocus *Sd* bei den *Sd^T*-Bastarden ergaben, dass ein hoher Prozentsatz dieser Fische das *Xi-X*-Fragment von *X. maculatus* besitzen (3 von 8 einzeln untersuchten Fischen; zwei Gesamtanalysen von 7 bzw. 10 Individuen). Rückkreuzungsbastarde der 4. bis 6. Generation wurden untersucht, und die Zahl der PS-*Xi-X*-tragenden *Sd*-Chromosomen dieser Generationen entspricht ungefähr dem Kopplungsgrad von *Xi-X* und *SdDr*, gefunden für das Wildtypchromosom *X^{DrSd}*. Diese Tatsache spricht dafür, dass das *Sd*-tragende Chromosom bei der *Sd^T*-Mutante als solches von den Platyfischen abstammt und dem X-Chromosom der Platyfische entspricht. Der *Dr*-Locus liegt vermutlich entweder mutiert vor, ist durch ein doppeltes Rekombinationsereignis mit den homologen Chromosomen der Schwertträger verloren gegangen, oder er ist durch eine

Genkonversion mit HS-Material ersetzt worden. Dabei sind auch die gekoppelten, regulatorischen Gene des *Sd*-Locus gestört worden, zum "Ganzkörpermelanom" der Nachkommen führend (Anders, F., 1983; Anders *et al.*, 1984).

Fische mit dem Phänotyp *DrLi* besitzen den Pterinophoren-Locus *Dr* von *X. maculatus* und den Makromelanophoren-Locus *Li* von *X. variatus* (Anders, A. *et al.*, 1973a). Die entsprechenden Wildtyp-Chromosomen X^{DrSd} und X^{YeLi} unterscheiden sich in bezug auf die *Xi-X*-Organisation. Die Organisation für das rekombinante Chromosom X^{DrLi} entspricht der vom Chromosom X^{DrSd} von *X. maculatus*, so dass vermutet werden kann, dass das Chromosom im wesentlichen von *X. maculatus* abstammt. Auch für das Gen *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) konnte eine unterschiedliche Organisation für die beiden Wildtyp-Chromosomen X^{DrSd} und X^{YeLi} festgestellt werden (Zechel *et al.*, 1988), wobei für die Translokationsmutante *DrLi*, wie für *Xi-X* nachgewiesen, die X^{DrSd} -Organisation zutrifft. Möglicherweise ist bei dieser Mutante nur der Makromelanophoren-Locus *Sd* gegen den Makromelanophoren-Locus *Li* ausgetauscht worden, ein Faktum, das sich in den entstandenen, hybriden Pigmentzellloci *DrLi* widerspiegelt.

Verwandtschaftsanalysen

Das Auftreten von einem 3'-liegenden *Xi-X*-Fragment von 7,2 kb in allen untersuchten Individuen von *X. maculatus*, *X. variatus*, *X. xiphidium* und *X. montezumae cortezi* und ein entsprechendes Fragment von 0,6 kb in den untersuchten Individuen verschiedener *X. helleri*-Populationen deutet auf eine evolutionär frühe Trennung von *X. helleri* von den anderen untersuchten *Xiphophorus*-Arten, die damit eine nähere Verwandtschaft einnehmen. Aufgrund von morphologischen Kriterien und biochemischen Charakteristika konnten die Arten von *Xiphophorus* nach Verwandtschaft sortiert werden (Anders, F. *et al.*, 1984; Meyer, A. *et al.*, 1994): *X. helleri* befindet sich danach am einen Ende des Evolutionsbaumes während *X. maculatus*, *X. variatus* und *X. xiphidium*, die eine enge Verwandtschaft einnehmen, sich am anderen Baumende befinden. *X. montezumae cortezi* nimmt eine Zwischenposition in der Artendivergenz ein. Nach diesem Modell müsste die *Xi-X*-Umstrukturierung, die für das 3'-liegende *Bam*HI-Fragment zu einem Längenunterschied von 6,6 kb zwischen *X. helleri* und den Platyarten führte, bei Arten, die sich verwandtschaftsmäßig zwischen *X. helleri* und *X. montezumae cortezi* befinden, stattgefunden haben. Werden Sequenzvergleiche der DNA für die phylogenetischen Analysen zugrunde gelegt, nimmt *X. helleri* die Position zwischen den Platyarten und *X. montezumae cortezi* ein (Meyer, A. *et al.*, 1994). Diese Ergebnisse stimmen nicht mit unserer molekularen Phylogenie, basierend auf dem *Xi-X* RFLP, überein. Es wäre interessant, die zu *X. helleri* und *X. montezumae cortezi* nahe verwandten Arten in bezug auf das 3'-liegende *Xi-X*-Fragment zu untersuchen, um den Zeitpunkt der DNA-Umstrukturierung von *Xi-X* festlegen zu können und damit die Verwandtschaftsstudien zu ergänzen.

Poly(GTCT/GACA) und die molekulare Grundlage des RFLPs

Xi-X mit benachbarten Regionen konnte für *X. helleri* und *X. maculatus* *DrSd* aufgrund von Verdauen der DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen und der Hybridisierung der entsprechenden Southern Blots mit den Subsonden von *Xi-X* gründlicher auf genetische Unterschiede untersucht werden. Die strukturellen Unterschiede der

5'-Regionen zwischen den Arten beschränken sich vermutlich vorwiegend auf die isolierte Genregion und besteht u.a. aus zusätzlichem, genetischen Material bei *X. helleri*. In der 3'-Region sind größere strukturelle Unterschiede zu erkennen: Bei *X. maculatus* nimmt die *Xi-X_C*-Region eine endstellige, 3'-liegende Position im isolierten Genabschnitt ein, bei *X. helleri* befindet sich sowohl strangaufwärts als auch strangabwärts zu *Xi-X_C* DNA mit Homologie zu der Region *Xi-X_{B-Spez2}*. Es bleibt aufgrund dieser Untersuchungen noch ungewiss, ob *X. helleri* zwei Kopien dieser *Xi-X_{B-Spez2}*-Region besitzt oder ob der DNA-Abschnitt im Vergleich zu der Platy-Organisation sich geteilt hat. Ausgehend von der *X. helleri*-Organisation könnte z.B. eine Inversion die zwei Subregionen von B-Spez2 zusammengebracht und dabei die Region C terminal versetzt haben, eine Genkonstellation wie bei der Art *X. maculatus* ergebend. Eine *Bam*HI-Schnittstelle ist bei diesem Prozess verloren gegangen. Alternativ ist *X. helleri* früh in der Evolution einen getrennten Evolutionszweig eingeschlagen, wobei, eventuell auch durch eine Inversion, die Region C die zentrale und die Region B-Spez2 die flankierenden Bereiche eingenommen haben. Dabei ist eine *Bam*HI-Schnittstelle gewonnen worden. Die unterschiedliche DNA-Organisation der beiden *Xiphophorus*-Arten könnte mit der Eigenschaft der repetitiven Sequenz Poly(GTCT/GACA), die sich unmittelbar neben der Subregion *Xi-X_{B-Spez2}* befindet, in Zusammenhang stehen. Somit könnten die 300-400 bp längeren Restriktionsfragmente bei *X. helleri* auf einer höheren Kopienzahl der repetitiven Einheit Poly(GTCT), oder auch Poly(TA) im vermuteten Intron, zurückzuführen sein. Eine eventuelle Anknüpfung von Poly(GTCT/GACA) an ein Transposon könnte spekulativ für *X. helleri* entweder dazu geführt haben, dass die Subregion C zentral in die Subregion B-Spez2 transponiert wurde, oder dass die B-Spez2-Region eine Verdopplung mit einer zusätzlichen, 3'-liegenden Position zu der Region C eingegangen ist. Bereiche mit Homologien zu einem Retroposon mit charakteristischen LTR's konnten im xiphophorinen Genom aufgedeckt werden (Petry, K., 1991; Anders, A. *et al.*, 1994b; Anders, F. *et al.*, 1994), aber keine Homologien zu dieser Sequenz konnte in der untersuchten *Xi-X*-Region von *X. maculatus* ausfindig gemacht werden (Herr Dr. H. Petry, persönliche Mitteilung).

Die in bezug auf Poly(GTCT/GACA) untersuchten Arten, Rassen und Populationen, d.h. *X. maculatus* aus dem Rio Jamapa, Belize River und *Uso macinta*, *X. variatus* aus dem Rio Panuco und *X. helleri* aus dem Rio Lancetilla, wiesen alle charakteristische Poly(GTCT/GACA)-Bandenmuster auf. Im Gegensatz zu einer Uniformität der Bandenmuster zwischen Individuen der jeweiligen *X. maculatus*-Populationen, war für jeden der Individuen von *X. helleri* aus dem Rio Lancetilla ein eigenartiges Poly(GTCT/GACA)-Bandenmuster nachweisbar. Die Sonde Poly(GTCT/GACA) ist dadurch bei *Xiphophorus* gut geeignet, sowohl von den verschiedenen Arten und Populationen, als auch von den einzelnen Individuen innerhalb der Art *X. helleri*, genetische Fingerabdrücke herzustellen, und kann somit u.a. für den Vater- bzw. Mutterschaftsnachweis dienen. Die Anwendbarkeit von *Bkm*-enthaltenden Sonden zu „Fingerprint“-Analysen konnte nicht nur für andere piscine Genome (Lloyd *et al.*, 1989; Scharl *et al.*, 1993) gezeigt werden, sondern im gesamten eukaryontischen Reich, von den Pflanzen bis zum humanen Genom, sind individuelle Polymorphismen-Unterschiede mit diesen Sonden aufdeckbar (Traut, 1987; Ali *et al.*, 1986; Singh, L. & Jones, 1986; Epplen *et al.*, 1991). Die Uniformität der Restriktionsfragmente bei *X. maculatus* ist in diesem Zusammenhang auffallend und könnte mit einer Anknüpfung dieser Regionen an

Funktionsbereiche, und damit eine Restriktion in genomischer Organisation, zusammenhängen (siehe auch S. 254-255).

Der individuelle Polymorphismus-Unterschied zwischen *X. maculatus* und *X. helleri* kann nicht auf die Zahl der Fische, die ursprünglich für die Züchtung im Genetischen Institut, Gießen, vor 35 Jahren eingesetzt wurden, zurückzuführen sein, denn beide Arten stammen aus Wildfängen, und für beide Arten dienten nur wenige Paare als Ausgangsmaterial für die Züchtung (Frau Dr. A. Anders, persönliche Mitteilung). Molekulare Mechanismen müssten vorhanden sein, die bei *X. helleri* die Vielfalt bzw. bei *X. maculatus* die Stabilität fördern. Die bloße Präsenz von genomischen Poly(GTCT/GACA)-Regionen, die in den beiden xiphophorinen Arten scheinbar gleich organisiert und in der selben Kopienzahl vorliegen, kann für die unterschiedliche Stabilität der betroffenen DNA-Regionen beider Arten nicht alleine verantwortlich gemacht werden, sondern müsste von anderen zusätzlichen genetischen Elementen abhängen. Diese Elemente müssten sich zwischen den beiden Arten unterscheiden (siehe auch S. 254-255).

Es ist möglich, den RFLP von *Xi-X* und Poly(GTCT/GACA)-enthaltenden Fragmenten durch die Präsenz von Poly(GTCT/GACA) in den respektiven Fragmenten zu erklären, denn die Hypervariabilität von simplen, tandem-wiederholten Sequenzen ist als eine Ursache für RFLP's bekannt (Tautz, 1989). Die Regionen, versetzt mit SSRs, gehören zu den informativsten, wenn es um die Suche nach genetischen Markern geht und werden daher auch Mikrosatelliten genannt (White, 1985; Epplen *et al.*, 1991).

In den Wildtyp-Genomen ist die *Bkm*-positive *Xi-X*-Region bei *Xiphophorus* in den verschiedenen Arten, Rassen bzw. Populationen so stabil, dass sie sich scheinbar konstant verhalten. Der evolutionäre Verlauf lässt aber eine gewisse genomische Variation erkennen, die in Form von einem RFLP in getrennt lebenden Populationen zum Ausdruck kommt. Auch für *Ephestia* ist ein stammes-spezifischer RFLP von *Bkm*-enthaltenden Fragmenten beschrieben worden (Traut, 1987). Wie von Tautz & Renz (1984) vorgeschlagen, könnten simple, repetitive Sequenzen als eine Quelle einer natürlich vorkommenden Variation und Rearrangement des Genoms betrachtet werden. Die SSRs können einen evolutionären Vorteil für die schnelle Adaption zu einer neuen Umgebung bieten (Trifonov, 2003). Diese SSRs mit einer positiven Funktion könnte in den Genen selbst oder in regulatorischen Regionen liegen. Eine große Zahl SSRs sind in transkribierten Regionen des Genoms lokalisiert (Li *et al.*, 2004).

Zusammenfassung/weitere Fragestellungen

Es wurde ein ausgedehnter Polymorphismus der *Xi-X*-Restriktionsfragmente in den verschiedenen xiphophorinen Wildtyp-Genomen festgestellt; 8 unterschiedliche 5'-liegende *Bam*HI-Fragmente im Bereich von 2,3 bis 2,8 kb und zwei 3'-liegende *Bam*HI-Fragmente von 0,6 kb (*X. helleri*) und 7,2 kb (verschiedene Platyarten).

Die unterschiedliche *Xi-X*-Organisation der Schwerträger und der Platyfische hat für die Entstehung von spezifischen Farbmustern oder Melanomen keine Bedeutung. Auch die *Xi-X*-Organisation verschiedener Farbmustermutanten spiegelt keine Rolle dieses Gens für die Farbmuster wider. Das Chromosom *Sd^T* entspricht vermutlich dem *X^{DrSd}*-Chromosom mit einer mutierten *Dr*-Funktion. Vergleicht man die *Xi-X*-Region von *X. maculatus* und *X. helleri*, besitzt die 5'-Region von *X. helleri* mehr Material (300-

400 bp). In der 3'-Region nimmt bei *X. maculatus* die C-Region eine endstellige Position im isolierten Genabschnitt ein, bei *X. helleri* befindet sich sowohl 5' als auch 3' zu der C-Region Sequenzen der Region B-Spez2.

Die in bezug auf Poly(GTCT/GACA) untersuchten Arten, Rassen und Populationen von *Xiphophorus* wiesen alle charakteristische Poly(GTCT/GACA)-Bandenmuster auf. Im Gegensatz zu einer Uniformität der Bandenmuster zwischen Individuen der jeweiligen *X. maculatus*-Populationen war für jeden der Individuen von *X. helleri* aus dem Rio Lancetilla ein eigenartiges Poly(GTCT/GACA)-Bandenmuster nachweisbar. Der RFLP von *Xi-X* und Poly(GTCT/GACA)-enthaltenden Fragmenten könnte durch die Präsenz von Poly(GTCT/GACA) in den respektiven Fragmenten eine Erklärung finden.

Eine Sequenzierung der *Xi-X*-Regionen würde die molekulare Grundlage der RFLP's ergeben und eine eventuelle Beteiligung von Poly(GTCT/GACA) oder Transposons bei der Genomevolution aufdecken können.

Wegen der Detektion einer Vielzahl von Fragmenten mit repetitiven Proben, oft mit einem ausgedehnten RFLP, können diese für die Suche nach molekularen Markern bzw. nach Genregionen mit Bedeutung für bestimmte Eigenschaften eingesetzt werden. Für das xiphophorine Melanom-Modell stehen die für die neoplastische Entwicklung wichtigen Gene im Vordergrund.

Geschlechtsbestimmung

Xi-X* und geschlechts-determinierende Eigenschaften bei *X. helleri

Beim Wildtyp von *X. helleri* aus dem Rio Lancetilla wurden 5'-liegende *Bam*HI-Fragmente von *Xi-X* von 2,70, 2,65 und 2,60 kb beobachtet. Unter den 16 einzeln untersuchten Männchen war das 2,70 kb *Xi-X*-Fragment bei sämtlichen Tieren vorhanden; entweder war nur das 2,70 kb Fragment (n=5) anwesend oder dieses Fragment kam in einer Kombination mit dem Fragment von 2,65 kb (n=6) oder 2,60 kb (n=5) vor. Die Weibchen und die Fische ohne besondere Geschlechtsmerkmale konnten, mussten aber nicht, dieses Fragment von 2,70 kb besitzen; 1 der 3 untersuchten Weibchen und der eine untersuchte Fisch ohne Geschlecht besaßen das 2,70 kb Fragment nicht. Vermutlich ist das 2,70 kb Fragment mit der Entwicklung von männlichen Eigenschaften verbunden, was durch nachgewiesene *Xi-X*-Transkripte im Hoden Unterstützung findet (siehe S. 267). Die Vererbung des 2,70 kb Fragments bei allen untersuchten Männchen von *X. helleri* könnte die komplexe, polygene Geschlechtsbestimmung dieser Art widerspiegeln, wobei das 2,70 kb Fragment für die Entwicklung der männlichen Charakteristika eine Voraussetzung ist, aber keine ausreichende Bedingung. Die Korrelation des männlichen Geschlechts mit einem kleinen, internen Subfragment von *Xi-X* spricht dafür, dass *Xi-X* selbst, und nicht ein *Xi-X*-gekoppeltes Gen, das interessante Gen darstellt. In den Rückkreuzungsbastarden von *X. maculatus* mit *X. helleri* können die Fische, im Gegensatz zu der abgesicherten Vererbung bei den *X. helleri* Männchen, sich zu Männchen entwickeln ohne, dass das 2,70 kb *Xi-X*-Fragment im Genom vorhanden ist. Dieses könnte durch die Bastardisierung und Verschmelzung von zwei verschiedenen geschlechts-determinierenden Mechanismen bedingt sein.

Bei den lebendgebärenden Poeciliidaen haben bei vielen Arten die Männchen eine polymorphe Körpergröße, wobei die Größe mit dem reproduktiven Erfolg der Männchen verbunden ist (Kallman *et al.*, 1973; Kallman & Borkoski, 1977; Kallman, 1983; Schartl *et al.*, 1993; Rosenthal & García de León, 2006). Die Unterschiede in Körpergröße sind primär von einer allelischen Variation eines Y-Chromosom-gebundenen Locus, der *P*-Locus ("pituitary"), abhängig. In dieser Arbeit wurden immer große Männchen von *X. helleri* verwendet, denn diese Fische waren einfacher zu präparieren und ergaben mehr DNA. *Xi-X* könnte mit dem *P*-Locus identisch sein; drei (Ryan & Wagner, 1987) bzw. vier (Zimmerer & Kallman, 1989) verschiedene Allele des *P*-Locus ist für den Schwerträger *X. nigrensis* beschrieben worden, und die drei verschiedenen Fragmentlängen für *Xi-X* bei *X. helleri* könnten drei verschiedenen Allelen des *P*-Locus bei dieser Art entsprechen. Bei den großen Männchen von *X. helleri* würde die aktive oder dominante *Xi-X*-Kopie dem 2,70 kb Allel entsprechen.

Schartl *et al.* (1993) schlagen verschiedene, modifizierende Allele des *P*-Locus vor, z.B. die Allele des *P*-Locus auf dem X-Chromosom. Langfristig könnte für den Erhalt der verschiedenen Allele innerhalb einer Population die Instabilität und Erschaffung von neuen Gen-Konstellationen bei *X. helleri* verantwortlich sein, in dieser Arbeit durch die individuelle Poly(GTCT/GACA)-Musterung erfasst (siehe auch S. 243). Die untersuchten *X. maculatus*-Männchen aus dem Rio Jamapa sind nicht durch verschiedene hierarchische Klassen in bezug auf Größe und Paarungsverhalten charakterisiert, was durch die Homogenität des spezifischen *Xi-X*-Fragmentes und der Poly(GTCT/GACA)-Musterung eine Erklärung finden könnte.

Xi-X* und geschlechts-determinierende Eigenschaften bei *X. maculatus

Durch das Auftreten von charakteristischen Restriktionsfragmenten von *Xi-X* konnte eine Unterteilung der Geschlechtschromosomen (*ZBrNi* bzw. *ZBrNi-e*, W) für die Population von *X. maculatus* aus dem Belize River in zwei Gruppen unternommen werden; beide Gruppen besitzen *Bam*HI-Fragmente von 2,5 und 7,2 kb, die eine Untergruppe, die gut ein Drittel der Fische betrifft (4 von 9 Tieren), besitzt zusätzlich ein *Xi-X*-Fragment von 2,3 kb. Dieses spiegelt sich auch für die *Hind*III-Fragmente wider; alle Fische aus dem Belize River hatten Fragmente von 5,2 kb während dieselbe Untergruppe zusätzlich ein 8,5 kb Fragment besaß. Eine Beziehung der einen Untergruppe mit den X- und Y-Chromosomen der Wildtyp-Population aus dem Rio Jamapa konnte damit festgestellt werden, denn diese Population besitzt *Bam*HI-Fragmente von 2,3 und 7,2 kb und ein *Hind*III-Fragment von 8,5 kb. Auch ein spezifisches poly(GTCT/GACA)-enthaltendes Fragment zeigte die gleiche Korrelation; es war in der Rio Jamapa-Population und in der Untergruppe von der Population aus dem Belize River anwesend. Es konnte für die Untergruppe aus dem Belize River mit dem 2,3 kb Fragment keine direkte Beziehung zum Geschlecht gemacht werden, denn die Fragmente waren bei den Weibchen, Männchen und bei den Fischen ohne besondere Geschlechtsmerkmale sowohl an- als auch abwesend. Eine Z-chromosomale Lokalisation des 2,3 kb *Xi-X*-Fragments ist durch die Präsenz in Männchen (ZZ) gegeben. Inwieweit dieses Fragment auch auf dem W-Chromosom lokalisiert sein könnte, kann aufgrund dieser Analysen nicht beantwortet werden.

DISKUSSION

Es ist denkbar, dass *Xi-X* die unterschiedlichen Mechanismen der männlichen (mit XY, bei der Population aus dem Rio Jamapa) und weiblichen (mit ZW, bei der Population aus dem Belize River) Heterogametie widerspiegelt; die weibliche Heterogametie ist mit dem 2,5 kb Fragment verbunden, während das Fragment von 2,3 kb bei der männlichen Heterogametie entscheidend ist. Ein in dieser Arbeit fehlendes Auftreten von Homozygoten in bezug auf das 2,3 kb *Xi-X*-Fragment bei der Population aus dem Belize River müsste, unter der Annahme, dass diese Genotypen lebensfähig sind, durch die geringe Zahl der Tiere bedingt sein. In diesem Zusammenhang wäre es interessant durch die Kreuzung von zwei heterozygoten Tieren (2,5 kb/2,3 kb) Nachkommen zu züchten, die eine 2,3 kb Homozygotie haben, und die Entwicklung des Geschlechts in diesen Fischen zu beobachten. Es ist möglich, dass mit dem genetischen Hintergrund dieser Population von *X. maculatus* aus dem Belize River und eine 2,3 kb *Xi-X* Homozygotie kein Geschlecht entwickelt werden kann, oder, dass eine Geschlechtsbestimmung mit einer männlichen Heterogametie vorliegt und dieser Genotyp sich in der Belize River-Population Fortpflanzungsmäßig nicht durchsetzen kann.

In den F₁-Bastarden und Rückkreuzungsbastarden von *X. maculatus* mit *X. helleri* konnten für die Z-Chromosomen entweder das 2,3 kb oder das 2,5 kb Fragment beobachtet werden (Gesamtzahl 12). Für Fische mit dem Chromosom *Z^{BrNi}* bzw. *Z^{BrNi-e}* ist es schwierig, zeugungsfähige Bastarde herzustellen, und das Z-Chromosom besitzt in den Bastarden keine geschlechts-determinierenden Faktoren. In dieser Beziehung ist es interessant zu erkunden, ob die Vererbung des *Xi-X*-Fragmentes von 2,5 kb oder 2,3 kb mit dem Geschlecht in den Bastarden von Bedeutung sein könnte: Diese Arbeit zeigt, dass, während keiner der Bastarde mit einem Fragment von 2,5 kb ein Geschlecht entwickelte, befanden sich unter den Bastarden mit dem 2,3 kb Fragment sowohl Fische ohne Geschlecht als auch Weibchen und Männchen. Diese Tatsache spricht dafür, dass die zwei Typen Z-Chromosomen, durch *Xi-X* und Poly(GTCT/GACA) charakterisiert, sich in bezug auf geschlechts-determinierende Eigenschaften unterscheiden. Das eine Z-Chromosom mit dem 2,5 kb *Xi-X*-Fragment, und die damit verbundene, fehlerhafte Entwicklung von Geschlecht in Bastarden, entspricht der empirisch gefundenen Schwierigkeit, zeugungsfähige Bastarde mit einem Z-Chromosom zu züchten. Das andere Z-Chromosom mit dem 2,3 kb *Xi-X*-Fragment ist mit der Entwicklung von Weibchen und Männchen, aber auch von Fischen ohne äußere Geschlechtsmerkmale, verbunden, und entspricht somit die Entwicklung von Geschlecht in Bastarden mit einem geerbten X - oder Y-Chromosom der Platyfische, die auch durch ein 2,3 kb *Xi-X* Fragment gekennzeichnet sind. Die letzte Gruppe betrifft von der Inzidenz des 2,3 kb Fragments in den 9 Fischen der parentalen Generation theoretisch nur 2/9 der Bastarde, und entspricht vielleicht der Gruppe der Bastarde mit den PSPM *BrNi* bzw. *BrNi^e*, die zum Teil ein Geschlecht entwickeln und für weitere Kreuzungen eingesetzt werden könnten.

Wenn der Zusammenhang zwischen den verschiedenen *Xi-X*-Fragmenten und die Fähigkeit ein Geschlecht zu entwickeln zutreffen sollte, wäre das *Xi-X*-Fragment ein besserer Marker für die geschlechts-determinierenden Eigenschaften der verschiedenen Geschlechtschromosomen als die bisherigen bewährten Marker, die PS-Pigmentzellloci (*DrSd*, *BrNi*). *Xi-X* ist daher vermutlich mit dem geschlechts-determinierenden Prozess verbunden. Diese Fragestellung müsste unter besonderer Berücksichtigung der Geschlechtsentwicklung in Beziehung zu den spezifischen *Xi-X*-Fragmenten bei einer

größeren Zahl von Fischen der parentalen Generation und der F₁-Bastarde und Rückkreuzungsbastarde nachgegangen werden.

Bei *X. maculatus* wird ein Hauptgen der Geschlechtsbestimmung zwischen den Genen *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) und *x-erbB^{*i}* (*EGFR*) vermutet (Woolcock *et al.*, 2006). Andere mitentscheidende Gene haben annehmend sowohl geschlechtschromosomale als auch autosomale Lokalisationen; *Xi-X* könnte eins dieser zusätzlichen Gene mit geschlechts-determinierenden Eigenschaften auf den Geschlechtschromosomen sein.

***Bkm*-DNA bei der Geschlechtsbestimmung**

Eine weitere Unterstützung, dass die Genregion *Xi-X* für die Geschlechtsbestimmung von Bedeutung sein könnte, wird durch die Lokalisation von Poly(GTCT/GACA) in *Xi-X* gegeben. Bei der Schlange und der Maus, die eine heterogametische weibliche (WZ) bzw. männliche (XY) Geschlechtsbestimmung aufweisen, gibt es Hinweise darauf, dass die *Bkm*-Sequenzen Poly(GACA)/Poly(GATA) sich in geschlechts-determinierenden Regionen befinden: Die *Bkm*-DNA wurde zum ersten Mal aus zwei Schlangenarten isoliert (Singh, L. *et al.*, 1980; Epplen *et al.*, 1982). Durch die Konstruktion von Bibliotheken der W-chromosomalen, weiblich-spezifischen Satelitten-DNA wurden diese einfach repetitiven Sequenzen entdeckt und demzufolge eine Bedeutung bei der weiblichen, heterogametischen Geschlechtsbestimmung zugewiesen. Bei der Maus konnten durch DNA "fingerprint"-Analysen geschlechts-spezifische *Bkm*-Fragmente mit einer Akkumulation der Sequenzen auf dem Y-Chromosom auffindig gemacht werden (Epplen *et al.*, 1982; Singh, L. *et al.*, 1981). Eine Übertragung der Y-chromosomalen, *Bkm*-reichen Region auf das X-Chromosom bei männlichen Trägern mit der Mutation *Sxr* (*sex reverted*) führt zu Nachkommen mit XX^{*Sxr*}-Männchen, begleitet von einem Erwerb des männlich-spezifischen *Bkm*-Hybridisierungsmuster (Singh, L. & Jones, 1982). Die *Bkm*-DNA bzw. daran nah-gekoppelte Gene könnten somit für die Entwicklung der männlichen Eigenschaften mitverantwortlich gemacht werden. Ein geschlechts-spezifisches Expressionsmuster dieser Sequenzen bestätigt die Bedeutung für die geschlechts-spezifischen Charakteristika (Epplen *et al.*, 1982; Singh, L. *et al.*, 1984).

Die zuerst zugeschriebene Korrelation mit den heterogametischen Geschlechtschromosomen und dadurch vermutete Funktion bei dem geschlechts-determinierendem Prozess (Chandra, 1985) wurde später nicht eindeutig bestätigt. Die *Bkm*-Sequenzen konnten mittlerweile bei den Primaten auf vielen Chromosomen nachgewiesen werden, vor Allem konnte Poly(GACA) durch ein *in situ*-Verfahren zu den Satelitten der Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 des humanen Chromosomensatzes zugeordnet werden (Nanda *et al.*, 1990). Auch auf den humanen Chromosomen 6, 11, X und Y konnten *Bkm*-Sequenzen nachgewiesen werden (Kiel-Metzger *et al.*, 1985; Arnemann *et al.*, 1986). Eine ausschließlich autosomale Lokalisation der *Bkm*-DNA trifft für die Motte *Ephistia kühniella* zu (Traut, 1987), konnte aber dem X-Chromosom von *Drosophila melanogaster* zugeordnet werden (Singh, L. *et al.*, 1981). Die Lokalisation der repetitiven Sequenz in einem Bereich auf Chromosom 17 in Maus, die deletiert zu einem Hermaphroditismus führen kann (Kiel-Metzger & Erickson, 1984), ergibt einen weiteren Hinweis auf eine Assoziation von *Bkm*-Sequenzen mit geschlechts-determinierenden Loci.

Für verschiedene Fisch-Arten und bestimmte Amphibien konnten in den ersten Analysen die *Bkm*-Sequenzen angereichert mit GATA/GACA-Wiederholungen keine geschlechts-

spezifische Hybridisierungsmuster aufgedeckt werden (Lloyd *et al.*, 1989; Schmid *et al.*, 1991). Für den lebendgebärenden Poeciliidaen *Poecilia reticulata* konnte dagegen später Poly(GACA) durch ein *in situ*-Hybridisierungs-Verfahren des Chromosomensatzes einer telomerischen, heterochromatischen Region des Y-Chromosomes zugeordnet werden (Nanda *et al.*, 1993). Für *X. maculatus*, Population Rio Papaloapan, und *X. helleri*, Population Laguna Catemaco, konnte in Southern Analysen ein spezifisches Hybridisierungsmuster mit der Sonde Poly(GATA) bei Männchen (XY), aber nicht bei den Weibchen (XX) gefunden werden (Nanda *et al.*, 1993).

Durch die in bezug auf die Beziehung von *Bkm*-DNA zu den Geschlechtschromosomen unterschiedlichen Befunde scheint eine pure Anwesenheit der *Bkm*-Sequenzen nicht alleine für den geschlechts-bestimmenden Prozess verantwortlich zu sein. Es bleibt noch unbeantwortet, ob die GACA/GATA-Einheiten eine spezifische genomische Organisation einhalten müssen, wie durch die besondere Häufung in den beschriebenen Regionen des murinen Y-Chromosoms bzw. des W-Chromosoms der Schlange der Fall ist (Singh, L. *et al.*, 1980; Singh, L. *et al.*, 1981; Epplen *et al.*, 1982), oder eine Existenz anderer zusätzlichen Faktoren für die Geschlechtsbestimmung ausschlaggebend ist. Andere SSRs als die GACA- und GATA-Wiederholungen ergaben in Southern Analysen für *Poecilia sphenops* und *Poecilia velifera* spezifische Hybridisierungsbanden, die mit der Anwesenheit des heterogametischen Chromosoms korrelierten (Nanda *et al.*, 1993). Nanda und Mitarbeiter (1992; 1993) schlagen vor, dass die Evolution der Geschlechtschromosomen von den undifferenzierten, homomorphen bis zu den differenzierten, heteromorphen Formen durch eine Anhäufung von unterschiedlichen SSRs induziert wird. Dieses spiegelt sich bei den Poeciliidaen wider; für einige Spezies, trotz einer homomorphen Erscheinung der Geschlechtschromosomen, konnte eine Korrelation von spezifischen Fragmenten angereichert mit simplen wiederholten Sequenzen mit dem heterogametischen Chromosom aufgestellt werden.

Das in dieser Arbeit charakterisierte Gen *Xi-X* von *X. maculatus* beinhaltet die Sequenz (GTCT/GACA)₁₅. Eine geschlechts-chromosomale Lokalisation von *Xi-X* ist nachgewiesen worden, und zwar auf den Chromosomen X und Y bzw. Z und W von *X. maculatus*, dem X-Chromosom von *X. variatus* und dem homologen Chromosomenpaar von *X. helleri*. Die von Nanda *et al.* (1993) angenommene Funktion von simplen Sequenzen bei der Differenzierung des heterogametischen Chromosoms tritt hiermit nicht eindeutig hervor, obwohl von den Autoren eine besondere Häufung der repetitiven Einheiten für die Differenzierungs-Funktion vorgeschlagen wird. Trotzdem konnte ein möglicher Zusammenhang von spezifischen *Xi-X*-Fragmenten zu der unterschiedlichen weiblichen und männlichen heterogametischen Geschlechtsbestimmung bei *X. maculatus* in dieser Arbeit angesprochen werden (siehe S. 246), und für *X. helleri* ist ein *Xi-X*-Fragment bei allen Männchen, aber nicht bei allen Weibchen oder Fischen ohne besondere Geschlechtsmerkmale, nachgewiesen worden (siehe S. 245). Eine Aufgabe von *Xi-X* und/oder Poly(GACA) bei der Geschlechtsbestimmung, vermutlich in Kombination mit anderen Faktoren, ist damit möglicherweise gegeben.

Der observierte *Xi-X*-RFLP verschiedener xiphophoriner Arten und Rassen könnte auf eine unterschiedliche Kopienzahl der (GTCT/GACA)-Einheiten, oder auch andere SSRs, der verschiedenen Chromosomen zurückzuführen sein. Eine unterschiedliche Organisation von Poly(GTCT/GACA) in *Xi-X* auf den verschiedenen Geschlechtschromosomen könnte eventuell verschiedene DNA/Protein-Interaktionen

bewirken und dadurch ein unterschiedliches Expressionsmuster von *Xi-X* in den verschiedenen Spezies bzw. der beiden Geschlechter induzieren. Geschlechts- und gewebs-spezifische, *Bkm*-bindende Proteine der Gonaden sind bekannt (Singh, L. *et al.*, 1994; Priyadarshini *et al.*, 2003). Dieses Phänomen ist für ein humanes Gen berichtet worden, wobei allelische Variationen eines (TCAT)-Repeats zu einer unterschiedlichen Bindung eines regulatorischen Proteins und einer quantitativ unterschiedlichen Expression führt (Albanese *et al.*, 2001). Auch eine unterschiedliche Anzahl eines (CA)-Repeats im Intron des humanen *EGFR*-Gens reguliert durch die Bindung von Repressoren die Transkription des Gens (Brandt *et al.*, 2006).

Gleichzeitig könnte Poly(GTCT/GACA)-angereicherte Sequenzen eine Region vor einer meiotischen Rekombination schützen, was für eine Differenzierung von nur dem einen Chromosom erforderlich ist. Da bei den homomorphen Geschlechtschromosomen von *Xiphophorus* viele Rekombinationen stattfinden, ist es möglich, dass durch eine lokale Interaktion der SSRs mit Proteinen der geschlechts-determinierende Locus vor einer meiotischen Rekombination geschützt wird. Die verschiedenen Organisationen der *Xi-X*-Region, die eventuell für die Geschlechtsbestimmung erforderlich ist, könnten durch die meiotische Isolation erhalten bleiben. *X. helleri* hat mit der polygenen Geschlechtsbestimmung die primitivste Form dieses Geschehens, und dass bei *Xi-X* hier eine Korrelation mit dem Geschlecht gefunden wird, zeigt, dass hiermit eine sehr ursprüngliche, grundlegende Form der Geschlechtsbestimmung angedeutet wird.

Zusammenfassung/weitere Fragestellungen

Eine Lokalisation von *Xi-X* auf den Geschlechtschromosomen ermöglicht eine Rolle dieses Gen bei geschlechts-determinierenden Mechanismen. Die Anwesenheit der *Bkm*-Sequenz Poly(GACA) im Gen unterstützt diese Möglichkeit; eine Funktion der *Bkm*-DNA bei der Geschlechtsbestimmung bzw. bei der Differenzierung von Geschlechtschromosomen wird diskutiert. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass verschiedene Restriktionsfragmente von *Xi-X* mit der unterschiedlichen weiblichen und männlichen Heterogamete bei *X. maculatus* korrelieren könnte. Ein bestimmtes Restriktionsfragment ist bei allen Männchen von *X. helleri* anwesend, aber nicht bei allen Weibchen und bei Fischen ohne Geschlechtsmerkmale.

Gezielte Analysen der *Xi-X*-RFLP von *X. helleri* in bezug auf das Geschlecht und die Fischgröße würde für die Korrelation zwischen *Xi-X* und dem Geschlecht bzw. *P*-Locus dieser Art möglicherweise eine Antwort liefern können. Entsprechend könnte die Korrelation von bestimmten *Xi-X*-Restriktionsfragmentlängen mit der weiblichen bzw. männlichen Heterogamete, und eventuell mit den geschlechts-determinierenden Eigenschaften dieser Fragmente in Rückkreuzungsbastarden, eine mögliche Funktion von *Xi-X* bei dem geschlechts-determinierenden Prozess von *X. maculatus* aufdecken. Gründliche Vergleiche der *Xi-X*-Genstruktur verschiedener Chromosomen mit besonderem Interesse an die Poly(GTCT/GACA)-Organisation, die Interaktion dieser Genregionen mit Proteinen und der Effekt auf die Expression würden für die Suche nach geschlechts-determinierenden Eigenschaften von *Xi-X* und die Bedeutung von Poly(GTCT/GACA) bei diesem Prozess hilfreich sein.

Xi-X-Organisation in den Bastarden: DNA-Umlagerungen

Die DNA-Organisation von *Xi-X* wurde in einer Vielzahl F₁- und Rückkreuzungsbastarden von verschiedenen Rassen und Populationen von *X. maculatus* mit *X. helleri* bestimmt. Diese Analysen konnten eine Lokalisation von *Xi-X* zu den Geschlechtschromosomen der Platyfische und den homologen Chromosomen der Schwerträger festlegen (siehe S. 238ff.). Unerwartet war eine sporadisch auftretende, atypische Vererbung der PS- und HS-*Xi-X*-Fragmente in den F₁- und Rückkreuzungsbastarden von *X. maculatus* und *X. helleri* zu beobachten. Die häufigste Aberration in Bastarden mit einem geerbten X- oder Z-Chromosom von *X. maculatus* war ein Verlust von HS-Fragmenten, die theoretisch in jedem Bastard, der durch Kreuzungen mit *X. helleri* entstanden ist, vorzufinden sein müssten. Bei Bastarden mit einem geerbten Y-Chromosom von *X. maculatus* war ein Auftreten von neuen Fragmentlängen charakteristisch. Die Ergebnisse werden in bezug auf die Instabilität der Genome aufgrund von SSRs (siehe S. 252ff.), die Bedeutung vom *Tu*-Genkomplex und dem Gen *R_{Diff}* für die DNA-Stabilität (siehe S. 255ff.), und den Effekt von Röntgenstrahlen auf die DNA-Umlagerungen diskutiert (siehe S. 263ff.).

Die Inzidenz der Aberrationen in einzeln untersuchten F₁- und Rückkreuzungsbastarden, die PS-*Xi-X*-Fragmente der X- bzw. Z-Chromosomen von *X. maculatus* geerbt hatten, betrug 8,6% (6 von 70 Individuen): Für die Fische mit den entsprechenden PSPM *DrSd*, *Dr*, *Sd^T* und *BrNi* waren HS-Fragmente in 4 der Individuen abwesend. Zwei hiervon fehlten den HS-*Xi-X*-Fragmenten vollständig, für die beiden anderen Fische fehlten nur die 3'-liegenden Fragmente von 0,6 kb. Nur in einem Fall konnte ein Verlust eines PS-Fragments nachgewiesen werden; das 5'-liegende Fragment von 2,3 kb war abwesend, während das 3'-liegende PS-Fragment von 7,2 kb bei diesem einen Individuum vorhanden war. In insgesamt zwei der Fische traten Fragmente neuer Längen auf.

Für Untersuchungen an mehreren Fischen gemeinsam konnte auch für Rückkreuzungsbastarde mit den PSPM *DrLi*, *DrSd* und *BrNi* einen zum Teil erheblichen Verlust an 5'-liegenden HS-*Xi-X*-Fragmente im Vergleich zu den 5'-liegenden PS-*Xi-X*-Fragmenten (siehe auch S. 255), aber keine neue Fragmentlängen, beobachtet werden. Ein relativer Verlust an 3'-liegenden *Xi-X*-Fragmente kann in den Gesamtanalysen wegen der unterschiedlichen Bandenintensität des langen PS-Fragments (7,2 kb) und des kurzen HS-Fragments (0,6 kb) nicht beurteilt werden.

Auch die PSM-Zelllinie, die von Bastarden mit dem Chromosom *X^{DySp}* abstammt, wiesen aberrante *Xi-X*-Fragmente auf. Diese Aberrationen stimmen mit den Typen Aberrationen, nachgewiesen für die Fische dieses Genotyps überein: Das 5'-liegende PS-Fragment und das 3'-liegende HS-Fragment fehlten, dafür trat ein Fragment neuer Länge auf.

In den Bastarden und Rückkreuzungsbastarden mit einem geerbten *Y^{ArSr}*- bzw. *Y^{ArSr'}*-Chromosom von *X. maculatus* (n=21) wurde, im Gegensatz zu den Ergebnissen gefunden für Bastarde mit den X- und Z-Chromosomen, kein Verlust an HS-Material beobachtet, sondern neue Fragmentlängen traten typischerweise in den Kreuzungsprodukten auf. In den insgesamt 6 einzeln untersuchten Fischen der parentalen Generation waren nur die beschriebenen PS-*Xi-X*-Fragmente von 2,3 und 7,2 kb anwesend. Auch 4 der Bastarde wiesen diese parentale Organisation der PS-Fragmente auf. 4 weitere Bastarde besaßen PS-*Xi-X*-Fragmente von 2,5 und 7,2 kb, die 2,3 kb Fragmente fehlten. In einer

Gesamtanalyse von 8 Fischen mit dem Chromosomensatz $YArSr'/YArSr'$ waren sowohl die 2,3 als auch die 2,5 kb PS-Fragmente zusammen mit dem 7,2 kb PS-Fragment vorhanden. Eine andere Gesamtanalyse von 5 Bastarden mit dem Phänotyp $ArSr$ zeigte ein Fragment von 4,7 kb zusätzlich zu den parentalen HS- und PS-Banden auf.

Die Zahl der untersuchten Fische in der parentalen Generation beschränkt sich auf 6, und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Fragment von 2,5 kb anstelle des 2,3 kb Fragments auch in den Wildtypen mit einem Y-Chromosom vorzufinden ist. Eine Untersuchung einer größeren Zahl Fische würde diese Frage klären.

Die Inzidenz der aberranten Fragmente in den Bastarden kann wegen der Gesamtanalysen an mehreren Individuen nicht festgelegt werden. Der Genotyp $ArSr'/ArSr'$ ist durch Kreuzungen verschiedener Arten entstanden und die Fische können in dieser Hinsicht als Bastarde betrachtet werden. Die Intensität der Banden in den Gesamtanalysen vom Phänotyp $ArSr$ sprechen dafür, dass die Präsenz des aberranten Genfragments von 4,7 kb in den Gesamtisolaten ziemlich hoch ist, vielleicht in allen 5 Fischen vorhanden. Im Genotyp $ArSr'/ArSr'$ zeigen die aberranten Fragmente von 2,5 kb eine schwache Intensität und tritt vermutlich nur in wenigen der 8 Individuen auf. Viele Fische dieser Phänotypen waren untereinander gekreuzt und stammen vielleicht sogar von einem Bastard, dessen Genom die DNA-Umlagerung schon durchgegangen war, so dass eine Rekombinations-Inzidenz nicht angegeben werden kann.

Der aberrante Erbgang von $Xi-X$ -Fragmenten in einzeln untersuchten Bastarden von *Xiphophorus* wurde nur beobachtet, wenn PS- $Xi-X$ -Fragmente im Genom vorhanden waren (n=78 für die X-, Z- und Y-chromosomalen Fragmente). Eine Mehrzahl der Fische (n=88) besaß keine PS- $Xi-X$ -Fragmente und hier kamen auch keine aberranten Fragmentlängen zum Vorschein. Ein eventueller Verlust von HS- $Xi-X$ -Fragmenten ist jedoch bei Fischen mit einer HS-Homozygotie der betroffenen Region ohne Bestimmung der parentalen Organisation nicht beurteilbar. Da die Bastarde mit einer ausschließlichen HS-Organisation von $Xi-X$ keine Aberrationen aufwiesen, sind die Aberrationen in den Bastarden vermutlich entweder auf die Anwesenheit der PS-Geschlechtschromosomen *per se* oder auf den Unterschied der strukturellen Genorganisation im $Xi-X$ -Bereich von *X. maculatus* und *X. helleri* zurückzuführen (siehe auch S. 256 und S. 259).

Die isolierte $Xi-X$ -Region enthält die drei SSRs (T)₂₁, (TA)₁₄ und (CTGT)₁₅, und da die SSRs instabil sind und polymorphe Loci bilden, die Mikrosatelliten (Epplen *et al.*, 1991; Bruford & Wayne, 1993), könnten sie für die Aberrationen in den Bastarden verantwortlich sein:

Bedeutung von SSRs für die DNA-Instabilität

Poly(CTGT/GACA) befindet sich in der 3'-Region von $Xi-X$, die häufig von den Aberrationen betroffen ist, und spielt vermutlich bei vielen der Aberrationen eine Rolle. *Bkm*-bedingte Aberrationen in Kreuzungsprodukten konnten auch für andere Organismen festgestellt werden: Eine ungleiche Rekombination von *Bkm*-enthaltenden DNA-Regionen wurde für bestimmte Mäusestämme mit den beiden Mutationen *Sxr* bzw. *Sxr'* berichtet (Epplen *et al.*, 1988). In den Rückkreuzungslinien konnte eine Inzidenz von 3% aberranter *Bkm*-enthaltender Restriktionsfragment-Längen beobachtet werden, was mit einem Auftreten von neuen Fragmentlängen in ca. 3% (2 von 70) der Fische für die X- und Z-chromosomalen Fragmente übereinstimmt. Für die Motte *Ephesia* konnte sogar bis zu 40% geänderter Längen spezifischer *Bkm*-Fragmente in Kreuzungsprodukten

verschiedener Stämme mit charakteristischen Fragmenten beobachtet werden (Traut, 1987).

Ein großer Anteil der *Xi-X*-Aberrationen in Bastarden betrifft einen Verlust vom Material des einen Elternteiles, ein sogenannter heterozygoter Verlust vom parentalen Material in den Nachkommen, kurz LOH genannt („loss of heterozygosity“). Es besteht die Möglichkeit, dass die untersuchte *Xi-X*-Region entweder deletiert vorliegt oder eine Übernahme von genetischen Material des anderen Elternteils stattgefunden hat, eine uniparentale Disomie. Auch für *Ephestia* wurde ein Verlust von Material in den Rückkreuzungslinien verschiedener Stämme berichtet (Traut, 1987). Für Poly(GATA)-Sequenzen, lokalisiert auf dem Y-Chromosom und Chromosom 12 des humanen Genoms, konnte ebenso ein heterozygoter Verlust beobachtet werden (Roewer *et al.*, 1993). Auch für andere SSRs ist ein heterozygoter Verlust von parentalen Allelen in den Nachkommen berichtet worden. Eine Studie konnte zeigen, dass 7 von 23 untersuchten (AC)_n-Loci Null-Allele hervorrufen (Callen *et al.*, 1993). Bis zu 9% heterozygoter Verlust in den Nachkommen ist in anderen Analysen berichtet worden (Chakraborty *et al.*, 1992), was mit der Inzidenz von 7% (5 von 70 Fischen) heterozygoter Verlust bei den einzeln untersuchten Individuen von *Xiphophorus* vergleichbar ist. Eine LOH von rezessiven Tumor-Suppressor Genen ist als ein kritisches Ereignis in der Pathogenese vieler Malignomen bekannt (Balmain *et al.*, 2003). Für *Xiphophorus* konnte gezeigt werden, dass ein LOH der untersuchten *Xi-X* Region keine Einwirkung auf die Malignität hat.

Die Bastarde von *X. maculatus* und *X. helleri* besitzen klare, definierte Banden, und die beobachteten *Xi-X*-Aberrationen entsprechen daher vermutlich der Keimbahn-Organisation. Die am naheliegendste Erklärung hierfür ist, dass die Aberrationen während der Meiose entstanden sind, wobei eine mitotische Instabilität in der prämeiotischen Zellteilung nicht auszuschließen ist. Da die Spermatogenese mehr mitotisch aktiv als die Oogenese ist, könnte dieses die häufigeren Aberrationen in *X. helleri*-Regionen erklären; *X. helleri* wurde vorwiegend als Männchen eingesetzt. Dieser Mechanismus wird für die paternal übertragende Instabilität von wiederholten Trinukleotiden vieler Repeat-Krankheiten (siehe S. 264) vermutet (Cleary & Pearson, 2003). Eine mitotische Instabilität ist für *Bkm*-DNA nicht beobachtet worden, was gegen diese Theorie für *Xi-X* und Poly(GTCT/GACA) spricht.

Bei der Herstellung von Rückkreuzungsbastarden von *X. maculatus* mit *X. helleri* besteht die Möglichkeit, dass die beiden unterschiedlichen Organisationen von *Xi-X* im Genom des einen Elternteils vorhanden sind, und die Aberrationen hätten durch eine meiotische Fehl-Rekombination aufgrund der unterschiedlichen Organisation eine Erklärung finden können. Bei der Herstellung von F₁-Bastarden dagegen kommen die beiden unterschiedlichen Gen-Organisationen erst nach der Befruchtung zusammen. Wenn die unterschiedliche Organisation der Allele für die Aberrationen ausschlaggebend ist, müssten die Aberrationen während der frühen Embryogenese stattgefunden haben, und die Fische wären dementsprechend in bezug auf die *Xi-X*-Organisation Mosaik. Da mehrere Organe zusammen untersucht worden sind und ein klares Muster vorhanden ist, wäre es wahrscheinlich, dass die Aberrationen in der Zygote gleich nach der Befruchtung entstanden sind. Auch für das fragile X Syndrom gibt es Hinweise darauf, dass die Expansion der Trinukleotide zu Längen, die die Krankheit induzieren, nicht in der Meiose, sondern während der frühen post-zygotischen Zellteilung stattfinden könnte

(Reyniers *et al.*, 1993; Wöhrle *et al.*, 1993). Für die myotone Dystrophie ist ein entwicklungs-spezifisches Fenster für die Instabilität der Trinukleotide festgestellt worden, wobei sie erst während des schnellen Wachstums im zweiten Trimester einsetzt (Martorell *et al.*, 1997). Die Instabilität wird möglicherweise von zellulären Faktoren beeinflusst, die nur während bestimmten Entwicklungsstadien vorhanden sind, und die schnelle Replikation bzw. die DNA-Reparatur dieser Zellen betreffen könnte (Nelson, D.L. & Warren, 1993). Cleary & Pearson (2003) schlagen einen komplexen multifaktoriellen Weg für die entwicklungs-spezifische Instabilität vor, die in einer Kombination von *cis*-Elementen und *trans*-Faktoren stattfinden könnte. Eine Analyse der Spermien von *Xiphophorus* würde auf eventuelle meiotische Ereignisse verantwortlich für die *Xi-X*-Aberrationen hinweisen (Reyniers *et al.*, 1993; Malter *et al.*, 1997).

Die Stabilität der poly(GTCT/GACA)-enthaltenden Fragmente der *X. maculatus*-Genome mit identischen Bandenmuster der einzelnen Fische in Southern Analysen und die entsprechenden, charakteristischen Bandenmuster der *X. helleri*-Individuen (siehe S. 243) lässt auf komplizierte Mechanismen des Stabilitätsverlusts schließen. Faktoren, die sich zwischen den beiden Arten unterscheiden, müssten die Stabilität der *Bkm*-Regionen regulieren. Auch andere Wissenschaftler schlagen eine Stabilitätsabhängigkeit der *Bkm*-Regionen durch andere Faktoren als die SSRs selbst vor (Epplen *et al.*, 1988). Eine locus-spezifische Instabilität von bestimmten SSRs ist in der Literatur beschrieben worden (Duval *et al.*, 2002) und diese ist oft gewebs- und entwicklungs-spezifisch (Cleary & Pearson, 2003). Der genomische Kontext ist hierfür entscheidend (Libby *et al.*, 2003).

In der Literatur gibt es viele Hinweise auf Faktoren, die die Stabilität der SSRs sowohl *in trans* als auch *in cis* beeinflussen. Als *trans*-agierende Faktoren zählen die MMR-Genprodukte ("mismatch repair"), die nicht locus-spezifisch agieren und u.a. replikationsbedingte Aberrationen korrigieren (Übersicht von Kolodner, 1996; Strand *et al.*, 1993; Dietmaier *et al.*, 1997). Auf *cis*-agierende Faktoren weisen mehrere Repeat-Krankheiten (siehe S. 264) hin (zusammenfassend von Cleary & Pearson, 2003): Die Krankheiten korrelieren häufig mit Chromosomen bestimmter Haplotypen (MacDonald *et al.*, 1992; Goldman *et al.*, 1995). Ein *cis*-agierender Faktor betrifft die Länge von perfekten Repeats; Sequenzen, die Regionen mit perfekten Wiederholungen unterbrechen, versprechen Stabilität in diesen Regionen (Chung *et al.*, 1993; Eichler *et al.*, 1994). Die Repeat-Krankheit Huntington korreliert mit einer bestimmten Zahl der zu den kritischen (CAG)-Repeats benachbarten (CCG)-Einheiten (Andrew *et al.*, 1994; Barron *et al.*, 1994). Die Instabilität der betroffenen Regionen steht in einigen Fällen in einer gewissen Abhängigkeit von einer mütterlichen (Fu *et al.*, 1991; Harley *et al.*, 1992), in anderen Fällen von einer väterlichen Vererbung (Snell, R.G. *et al.*, 1993; Jodice *et al.*, 1994). Die Bildung von ungewöhnlichen DNA-Strukturen ist für die Instabilität bedeutend (Pearson *et al.*, 2002). Benachbarte *Alu*-Elemente und CTCF-bindende Stellen können die Instabilität beeinflussen (Filippova *et al.*, 2001; Chauhan *et al.*, 2002) und epigenetische Elemente wie DNA-Methylierung und Chromatinstruktur spielen eine Rolle (Wöhrle *et al.*, 2001; Cleary & Pearson, 2003).

Möglicherweise spielt für die unterschiedliche polymorphe Ausprägung der verschiedenen Mikrosatelliten eine positive Selektion aufgrund von Genen eine Rolle (Li *et al.*, 2004). Der Erhalt der Poly(GTCT/GACA)-Regionen für *X. maculatus* in Vergleich zu *X. helleri* könnte mit Funktionen verbunden sein. Die Bildung einer bestimmten Länge

eines tandem Repeats in euchromatischen Regionen des Genoms kann Signale für eine lokale Heterochromatisierung und Inaktivierung des Gens in der Region produzieren (Dorer & Henikoff, 1994; Baur *et al.*, 2004), was für Poly(GTCT/GACA) und die regulatorischen Gene des *Tu*-Gens zutreffen könnte. Wie von Tautz & Schlötterer (1994) vorgeschlagen, könnten einige SSRs bestimmter Lokalisationen genetische Effekte indirekt durch Signale für generelle genomische Mechanismen ausüben, wie z.B. eine geänderte Proteinstruktur oder Chromatinverpackung. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass der Kondensationsgrad des Chromatins in der Interphase sich zwischen *X. maculatus* und *X. helleri* unterscheidet (siehe auch S. 262); *X. maculatus* besitzt eine wenig kondensierte Form, während bei *X. helleri* das Chromatin kondensiert mit vielen Chromozentren vorliegt (Anders, F. *et al.*, 1981). Eine Röntgenbestrahlung von *X. maculatus*-Embryonen, Genotyp *DySp*, die einerseits eine erblich erhöhte Expression des *Sp*-bedingten Fleckenmusters bedingt (siehe auch S. 263), führt gleichzeitig zu einer Kondensierung des Interphase-Chromatins. Bastarde von *X. maculatus* und *X. helleri* wiesen ebenso einen hohen Grad der Chromosomenverpackung und eine erhöhte *Sp*-Expression auf. Eine Verbindung zwischen der restriktiven (GTCT/GACA)_n-Organisation, dem Euchromatin und der gut regulierten *Sp*-Expression bei *X. maculatus* könnte bestehen.

Das xiphophorine *Tu*-Modell ist ein gutes System um die Stabilität bzw. Instabilität von SSRs in Wildtypen und Kreuzungen dergleichen am Beispiel von *Xi-X* und Poly(GTCT/GACA) zu analysieren. Im nächsten Kapitel wird die Stabilität von *Xi-X* in den Bastarden in Abhängigkeit vom Gen *R_{Diff}* und dem *Tu*-Komplex, zwei Faktoren, die möglicherweise die Stabilität *in trans* bzw. *in cis* beeinflussen, diskutiert:

Bedeutung von PS-Genen (*Tu*-Komplex und *R_{Diff}*) für die Aberrationen

Für die Gesamtanalysen an mehreren Fischen ist, wie für die einzeln untersuchten Individuen (siehe S. 251), der relative Verlust an 5'-liegende HS-*Xi-X*-Fragmenten im Vergleich zu den entsprechenden Fragmenten der Platyfische in Rückkreuzungsbastarden mit den PSPM *DrSd* bzw. *DrLi* deutlich nachweisbar. Dieses trat aber nur für Bastarde mit einem malignem Melanom auf. Die parallel untersuchten Rückkreuzungsbastarde mit benignem Melanom zeigten in Gesamtanalysen eine vergleichbare Präsenz der PS- und HS-Fragmente. Dieses spricht dafür, dass die Rekombinationsereignisse, die zu einem Verlust vom HS-Material führt, auf unabhängige Ereignisse der einzelnen Individuen und nicht auf eine Organisation eines gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen sind. Die Bastarde mit benignem und malignem Melanom unterscheiden sich nur in bezug auf das *R_{Diff}*-tragende Chromosom und der Verlust an HS-Material steht damit in einer Abhängigkeit vom Gen *R_{Diff}*. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei nicht um das Gen *R_{Diff}* selbst, sondern um Gene, die mit dem Gen *R_{Diff}* gekoppelt sind, handelt. Sehr interessant ist die Tatsache, dass die untersuchte DNA vom nicht-melanomatösen Gewebe abstammt und damit kein Epiphänomen der Neoplasie darstellt. Das Gen *R_{Diff}* bzw. *R_{Diff}*-gekoppelte Gene müssten, unabhängig von der malignen Transformation der Zellen, bei der strukturellen Erhaltung der *Xi-X*-Region beteiligt sein. In Gesamtanalysen an F₁-Bastarden mit den PSPM *DrLi* und *BrNi*, die alle ein benignes Melanom tragen, kann ein schwacher Verlust an HS-Material beobachtet werden. Der HS-Materialverlust kann somit in Zellen beider Malignitätsgrade auftreten, ist aber für Fische mit malignem Melanom auffallend häufiger zu beobachten, was in direkt

vergleichenden Untersuchungen an Geschwistern sehr deutlich zum Vorschein kommt. Der nachgewiesene Effekt von R_{Diff} auf die DNA-Stabilität scheint, wie auch der Effekt dieses Gens auf die Differenzierung der transformierten Makromelanocyten (Anders, A. *et al.*, 1985), dosisabhängig zu funktionieren.

Aberrationen von $Xi-X$ in F_1 -Bastarden und Rückkreuzungsbastarden sind nur festzustellen, wenn das PS-Geschlechtschromosom mit dem Tu -Komplex und der PS- $Xi-X$ -Kopie im Genom präsent sind. Es ist noch unklar, inwieweit die DNA-Umlagerungen der $Xi-X$ -Region in Abhängigkeit von dem Tu -Komplex stehen. Vielleicht reflektieren die Aberrationen nur die zwei unterschiedlichen Allele des $Xi-X$ -Gens in den Bastarden. Da der Abstand zwischen $Xi-X$ und dem Tu -Komplex 15 cM beträgt, trifft die gleichwärtige Präsenz der PS- $Xi-X$ -Fragmente und dem Tu -Komplex theoretisch in 85% der Bastarde der ersten Rückkreuzungsgeneration zu, in den weiteren Rückkreuzungsgenerationen ist die Inzidenz geringer. Die untersuchte Gruppe der F_1 -Bastarde und Rückkreuzungsbastarde mit einem geerbten PS- $Xi-X$ -Fragment, aber kein Tu -Komplex im Genom, besitzen keine $Xi-X$ -Aberrationen, ist aber zu klein ($n=10$), um signifikante Aussagen machen zu können. Analysen einer größeren Zahl Tiere müssten feststellen, ob die PSPM-freien Bastarde ohne ein Tu -Komplex, aber mit PS- $Xi-X$ -Fragmenten, bzw. die PSPM-tragenden Bastarde mit einem Tu -Komplex, aber ohne PS- $Xi-X$ -Fragmente, DNA-Umlagerungen aufweisen. Auf diese Grundlage kann festgestellt werden, inwieweit der Tu -Komplex *per se* oder andere Regionen des Geschlechtschromosoms für die Instabilität verantwortlich ist.

Wie eine genetische Instabilität der $Xi-X$ -Region in PSPM-tragenden Bastarden gezeigt werden konnte, ist auch eine besonders hohe Rekombinationsrate der somatischen DNA in den Genomen von Bastarden mit dem Tu -Genkomplex, aber nicht in den Geschwistern ohne das geerbte, tumorinduzierende Gen, durch eine erhöhte Inzidenz von Schwester-Chromatid-Austauschen (SCE) in diesen Fischen beobachtet worden (Hamdoon, 1984; Dahms, 1985; Anders, F. *et al.*, 1985). Der Tu -Komplex bzw. andere Regionen der PS-Geschlechtschromosomen sind damit bei den Rekombinationsereignissen beteiligt, obwohl die erhöhte SCE-Inzidenz in nicht-Tumorzellen gemessen wurde. Hier stehen die DNA-Umlagerungen nicht mit dem R_{Diff} -tragenden Chromosom in Abhängigkeit.

Die erhöhte Zahl der Schwester-Chromatid-Austausche ist, wie die genomisch nachgewiesenen $Xi-X$ -Aberrationen, ein direkter Ausdruck der Genom-Instabilität in Bastarden. Mit $Xi-X$ ist zum ersten Mal ein Ausdruck für die erbliche Instabilität auf der Gen-Ebene für *Xiphophorus* beschrieben worden. Es fällt schwer zu erklären, warum die Genom-Instabilität in F_1 -Bastarden und Rückkreuzungsbastarden, ausgedrückt durch einen $Xi-X$ RFLP (ein meiotisches Ereignis) und SCE (ein mitotisches Ereignis), von der Anwesenheit von Loci in Abhängigkeit steht, die die PSPM determinieren und eine Differenzierung der Pigmentzellen induzieren, insofern, dass nicht-neoplastische und nicht-pigmentöse Zellen untersucht wurden. Dieses lässt sich nur durch einen breiteren Funktionsbereich der Kopplungsgruppen PSP-Loci/ Tu -Komplex und R_{Diff} als bei der Bildung von Pigmentzellmustern bzw. bei der Tumorbildung erklären. Diese Loci müssten mit der Genom-Stabilität zusammenhängen. Die Kopplungsgruppe Tu -Komplex fördert in den Bastarden die Instabilität, was durch die Kopplungsgruppe R_{Diff} unterbunden wird.

Viele Gene sind charakterisiert worden, die bei der DNA-Reparatur und Rekombination eingehen und damit für die DNA-Stabilität von Bedeutung sind. Für das Gen R_{Diff} könnte die Dualität der Funktionen mit Aufgabenbereichen bei einerseits der

Pigmentzellendifferenzierung und Tumor-Suppression und andererseits der DNA-Stabilität durch eine Verwandtschaft mit einer bestimmten Gruppe Gene eine Erklärung finden:

Ist R_{Diff} ein Gen der Zellzyklusüberwachung?

Eine Reihe Genprodukte sind aufgedeckt worden, die sowohl mit der mitotischen als auch mit der meiotischen DNA interagieren und eine Funktion bei der DNA Rekombination und Erhaltung der genomischen Integrität haben (Baker *et al.*, 1995; de Wind *et al.*, 1995; Edelman *et al.*, 1996; Keegan *et al.*, 1996; Scully *et al.*, 1997; Carney *et al.*, 1998; Haber, 1998; Venkitaraman, 2002; Übersichte von Shimada & Nakanishi, 2006 und Harrison & Haber, 2006). Die respektiven Gene, *Rad50*, *Rad51*, *Mre11*, *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *ATR*, *NBS1*, *PMS2*, *MLH1* und *MSH2*, haben darüber hinaus weitreichende Konsequenzen: Für die meisten der Gene konnte gezeigt werden, dass eine Mutation zu einer Entartung von Zellen führen kann. Einige Malignome der Brust, Ovarien, Dickdarm und auch anderer Zellverbände sind auf fehlerhafte Funktionen von Genen mit strukturerhaltenden Aufgaben zurückzuführen. Hierzu gehört auch das Tumor-Suppressorgen *p53* (Malkin *et al.*, 1990; Nelson, W.G. & Kastan, 1994). Die Gene dienen als Kontrollpunkte ("Checkpoints") für einen korrekten mitotischen und meiotischen Ablauf, sowie für die zelluläre Proliferation. Der Zellzyklus wird bei nicht-korrigierten Fehlern angehalten und eine Zellvernichtung, Apoptosis, wird eventuell eingeleitet. Mutierte Überwachungsgene können zu fortschreitenden Zellzyklen und Zellproliferation trotz DNA Schaden führen, und diese Zellen haben ein erhöhtes Risiko für eine maligne Entartung.

Zwischen diesen DNA-Strukturerhaltenden Genen mit ihrer Bedeutung für die Zellentartung und dem *Xiphophorus* Tumor-Modell können Parallelen gezogen werden: Die Kopplungsgruppe R_{Diff} ist sowohl für die Melanomentstehung bei *Xiphophorus* kritisch (Anders, A. & Anders, F., 1978) als auch für die DNA-Stabilität von Bedeutung. Das Gen R_{Diff} kann wegen seiner supprimierenden Funktion bei der Melanomentwicklung, wie auch Gene des Zellzyklus-Überwachungssystems (Dasika *et al.*, 1999), als ein Tumor-Suppressorgen charakterisiert werden. Die Gene *ATM* und *ATR* gehören zu einer Familie von Genen, deren Genprodukte Homologien zu Phosphatidylinositol-3-Kinasen besitzen (Rotman & Shiloh, 1998). Diese Gene besitzen eine Funktion bei der Signal-Übertragungskette (Carr, 1996) und spielen zusammen mit den Genen *BRCA1* und *BRCA2* eine Rolle als Integratoren der DNA Reparatur, Genregulation und Zellzyklusüberwachung (Übersichte von Dasika *et al.*, 1999, Lavin & Khanna, 1999 und Venkitaraman, 2002). Auch für R_{Diff} ist ein Bezug zu der Signal-Übertragungskette gegeben, denn die Aktivität des Genprodukts vom Protoonkogen *x-src*, eine Tyrosin Kinase, und dem Phosphoinositide "turnover" stehen in PSPM-tragenden Bastarden in Abhängigkeit vom Gen R_{Diff} (Pröfrock, 1988; Smith *et al.*, 1991; Anders, F., 1989). Das Gen R_{Diff} ist für die Organismen nicht erforderlich, wie u.a. durch die Herstellung von „Knockout“-Mäusen auch für viele Zellzyklus-Überwachungsgene gezeigt werden konnte (Donehower *et al.*, 1992; Baker *et al.*, 1995; de Wind *et al.*, 1995; Barlow *et al.*, 1996; Edelman *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996). Das Gen R_{Diff} ist in Analogie zu der Funktion vom Gen *BRCA1* bei der terminalen Differenzierung spezifischer Zellen (Lane *et al.*, 1995) für die terminale Differenzierung der Makromelanophoren bzw. der transformierten Melanocyten der Platyfische zuständig (Vielkind, 1976). Das Gen *p53* funktioniert als ein Kontrollpunkt der Lymphocyten-Differenzierung (Aloni-Grinstein *et al.*, 1993; Dasika *et al.*, 1999).

Vielleicht ist R_{Diff} ein Gen, das einerseits für die Stabilität der DNA verantwortlich ist, aber andererseits, vermutlich über eine Signalübertragungskette, bei der Differenzierung der platuspezifischen Makromelanophoren beteiligt ist. Das Genprodukt von R_{Diff} übt möglicherweise eine Zellzyklus-Überwachungsfunktion aus und ist damit bei Prozessen wie DNA-Stabilität, Zellproliferation und Zelldifferenzierung beteiligt. Das breite Band der Funktionsbereiche von Zellzyklus-Überwachungsgenen ermöglicht eine Rolle vom Gen R_{Diff} *per se* sowohl für die DNA-Stabilität als auch für die Melanophoren-Differenzierung.

Eine andere Möglichkeit ist, dass das Gen R_{Diff} mit einem Gen gekoppelt ist, das einen Effekt auf den Zellzyklus hat. Kazianis *et al.* (1998, 2000) haben eine Lokalisation vom Gen $CDKN2X$ zu dem R_{Diff} -tragenden Chromosom von *Xiphophorus* festlegen können. Es wird im xiphophorinen Melanom überexprimiert und die humanen, homologen Gene spielen in Tumoren, Melanome inklusive, eine Rolle als Tumor Suppressoren und wirken als negative Regulatoren des Zellzyklus. Es wurde vorgeschlagen, dass das Gen $CDKN2X$ dem Gen R_{Diff} entsprechen könnte, obwohl einige beobachtete Expressionsdaten nicht mit dieser Theorie übereinstimmt (Meierjohann & Schartl, 2006). Eine eventuelle Funktion vom Gen R_{Diff} upstream vom Gen $x-erbB^{*a}$ ($Xmrk$) und $CDKN2X$ downstream vom selben Gen wurde vorgeschlagen. Möglicherweise sind mehrere Gene auf dem R_{Diff} -tragenden Chromosom lokalisiert, wie u.a. R_{Diff} und $CDKN2X$, die auf das xiphophorine Melanomsystem einen Effekt ausüben.

Die Eigenschaften von R_{Diff} als ein Gen der Zellzyklusüberwachung würden eine Reihe beobachteter Charakteristika vom xiphophorinen Tumor-Modell eine Erklärung geben können:

Charakteristika des Xiphophorus-Tumormodells, die durch R_{Diff} als ein Gen der Zellzyklusüberwachung eine Erklärung finden würden

Die im Vergleich zu den parentalen Wildtypen erhöhte Tumorrates in Rückkreuzungsbastarden von *X. maculatus* mit *X. helleri* als Folge von einer Behandlung mit Röntgenstrahlen oder mutagenen Substanzen (zusammenfassend in Anders, F. *et al.*, 1984) lässt sich durch eine eventuelle Funktion von R_{Diff} bei der Zellzyklusüberwachung erklären. Bastarde ohne bzw. mit nur einer R_{Diff} -Kopie im Genom könnten dann nur unzureichend die induzierten DNA-Schäden beseitigen, die auch die regulatorischen Gene des Tu -Komplexes betreffen könnten, und den Zellzyklus verzögern bzw. Apoptosis einleiten. Als Folge proliferieren die Zellen trotz der Gendefekte, was u.a. zu einer Expression des Tu -Komplexes und zu einer unkontrollierten Zellteilung führen könnte. Auch für andere Zellen bzw. Organismen mit defekten Genen der Zellzyklusüberwachung ist eine erhöhte Sensitivität gegenüber Röntgenstrahlen und mutagenen Substanzen bekannt (Taalman *et al.*, 1983; Swift *et al.*, 1991; Kolodner, 1996; Xu & Baltimore, 1996; Cliby *et al.*, 1998; Rosen, E.M. *et al.*, 1999).

Wie die Gene des Zellzyklus-Überwachungssystems im mutierten Zustand verschiedene Tumore hervorrufen können, entsteht auch bei den Rückkreuzungsbastarden von *Xiphophorus* als Folge von Röntgenstrahlen oder karzinogener Substanzen ein breites Spektrum Tumore mesenchymalen, epithelialen und neurogenen Ursprungs (zusammenfassend in Anders, F. *et al.*, 1984). Bei *Xiphophorus* dominieren die neuroektodermalen Tumore, vor allem Melanom, aber auch bei anderen defekten Zellzyklus-Überwachungsgenen findet man typische Tumore für die verschiedenen Gene: So tritt für die defekten Reparaturgene (MMR) vorwiegend Dickdarmkrebs auf

(Übersicht von Lynch, H.T. *et al.*, 1993), für die defekten Gene *ATM* und *NBS1* sind Lymphome typisch (Hawley & Friend, 1996; The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group, 2000) und bei zerstörten *BRCA1*- und *BRCA2*-Genen entstehen vor allem Brust- und Ovarienkrebs (Bertwistle & Ashworth, 1998; Syrjakoski *et al.*, 2000). Der gen-bedingte, typische Krebstyp muss vermutlich als ein Teil der Zellspezifität der Zellzyklus-Überwachungsgene betrachtet werden, dessen Mechanismus noch nicht aufgeklärt worden ist. Ein defektes Gen *p53* ist bei einem breiten Spektrum von Tumoren beteiligt, und kann als ein Gen abwärts in der Zellzyklusüberwachungshierarchie erklärt werden (Carr, 1996). Für *Xiphophorus* ist bekannt, dass die Spezifität der Zellentartung durch eine gewebsspezifische Regulation des *Tu*-Gens entsteht (Anders, A. & Anders, F., 1978). Die gewebsspezifischen, regulatorischen Gene, R_{Gew} insgesamt, sind sehr dicht an das *Tu*-Gen gekoppelt, üben ihre Funktion in *cis* aus und können als Teil des *Tu*-Komplexes betrachtet werden. Bei *Xiphophorus* besteht demzufolge ein System, in dem die Zellspezifität der Zellzyklus-Überwachungsgene nachgegangen werden könnte, die eventuell durch eine Interaktion vom Gen R_{Diff} und dem *Tu*-Komplex gegeben ist.

Eine Instabilität von Mikrosatelliten in Abhängigkeit von Reparatur- und Zellzyklus-Überwachungsgenen ist festgestellt worden (Kolodner, 1996; Richard *et al.*, 1999, 2000; Parniewski *et al.*, 2000). Eine eventuell strukturerhaltende Funktion von R_{Diff} könnte erklären, warum die Poly(GTCT/GACA)-Organisation, aber auch die *Xi-X* Restriktionsfragmente, in verschiedenen Individuen von *X. maculatus*, mit zwei Kopien von R_{Diff} identisch sind (siehe S. 243). Bei *X. helleri* ohne R_{Diff} -Kopien im Genom ist die Stabilität nicht im selben Maße gewährleistet.

Eine eventuelle Funktion vom Gen R_{Diff} bei der Überwachung eines korrekten meiotischen Ablaufs und die daraus folgende Bedeutung für die Gametenreife könnte für die oft zu beobachtender Sterilität von F₁-Bastarden und Rückkreuzungsbastarden von *X. maculatus* mit *X. helleri*, die keine oder nur eine R_{Diff} -Kopie im Genom besitzen, verantwortlich sein. Auch Mutationen anderer Gene, dessen Wildtyp Zellzyklus-Überwachungseigenschaften besitzen, sind mit einer Sterilität verbunden (Baker *et al.*, 1995; Barlow *et al.*, 1996; Edelmann *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996; Connor *et al.*, 1997; The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group, 2000). Für Hefe konnte gezeigt werden, dass in interspezifischen Kreuzungsprodukten die Reparaturgene für eine Sterilität dieser Zellen verantwortlich sind (Hunter *et al.*, 1996). Dieses deutet auf eine unterschiedliche Entwicklung der Zellzyklus-Überwachungssysteme in nah verwandten Arten, wie auch für *X. maculatus* und *X. helleri* in bezug auf das Gen R_{Diff} der Fall ist.

Spielt R_{Diff} bei der Unterdrückung der Rekombination zwischen unterschiedlichen DNA Regionen eine Rolle?

Aberrationen von *Xi-X* in F₁-Bastarden und Rückkreuzungsbastarden, deren Häufigkeit in einer Dosis-Abhängigkeit vom R_{Diff} -tragenden Chromosom stehen, sind nur festzustellen, wenn das PS-Geschlechtschromosom mit dem *Tu*-Komplex und der PS-*Xi-X*-Kopie im Genom präsent sind (siehe S. 256). Eine Erklärung der *Xi-X*-Aberrationen in Abhängigkeit vom PS-Geschlechtschromosom wäre, dass die Geschlechtschromosomen der Platfische und die homologen Chromosomen der Schwerträger sich so sehr unterscheiden, dass Probleme bei der Synapsenbildung und Rekombination während der Meiose auftreten wird. Bekannt ist, dass bei den Säugern die Frequenz der Rekombination mit dem Homologiegrad verbunden ist (Waldman & Liskay, 1988;

te Riele, 1992). Schon bei weniger als 1% nicht-übereinstimmende Sequenzen wird die Rekombination unterdrückt. Für die MMR-Gene konnte für sowohl Prokaryonten als auch für Eukaryonten unterschiedlicher Organisationsstufen gezeigt werden, dass neben der Funktion bei der Reparatur von nicht übereinstimmenden Nukleotiden zwischen zwei Schwester-Chromatiden auch wichtig für einen korrekten Ablauf der genetischen Rekombination zwischen nicht-Schwester Chromatiden während der Meiose sind (Alani *et al.*, 1994; Worth *et al.*, 1994; de Wind *et al.*, 1995; Selva *et al.*, 1995). Eine Funktion vom Reparaturgen *MSH2* bei der Unterdrückung einer Rekombination zwischen abweichenden Bereichen der homologen Chromosomen ist für Maus und Hefe nachgewiesen worden; im mutierten Zustand des Gens findet die Rekombination trotz abweichender Bereiche statt. Auch für die Prokaryonten konnte gezeigt werden, dass durch einen Verlust von Aktivität der MMR-Gene eine hohe Frequenz von inter- und intrachromosomalen Umlagerungen aufgrund ektopischer Rekombinationen zwischen verschiedenen Sequenzen induziert wird (Rayssiguier *et al.*, 1989; Petit *et al.*, 1991). Eine ähnliche Funktion ist für R_{Diff} möglich. Die *Xi-X*-Sequenzen von *X. maculatus* und *X. helleri* unterscheiden sich vermutlich erheblich, da das *Bam*HI-Restriktionsfragment der Platyfische 2,3 kb und das entsprechende Fragment der Schwertträger 2,6-2,7 kb beträgt, d.h. mehr als 10% abweichende Sequenzen befinden sich eventuell in dieser Region. Zwei Kopien von R_{Diff} würden bei einer *MSH2*-analogen Funktion keine Rekombination in diesem Bereich erlauben. Ohne eine ausreichende R_{Diff} -Funktion würde eine Rekombination gelegentlich stattfinden, was aufgrund der unterschiedlichen Sequenzen oft zu Aberrationen führen kann. Als Folge von einer fehlenden Unterdrückung der Rekombination zwischen nicht-identischen, homologen Bereichen und dem Einsatz des homologen Chromatids für die rekombinante Reparatur ist ein Verlust von Heterozygotie bekannt (Kadyk & Hartwell, 1992). Dieser Mechanismus ist für *Xi-X* möglich, da die häufigste Aberration ein Verlust von HS-Material ist, vermutlich mit einer Verdopplung der PS-Sequenzen verbunden.

Viele Produkte der Zellzyklus-Überwachungsgene interagieren mit dem sich entwickelnden, synaptonemalen Komplex der meiotischen DNA. So interagiert das Produkt von *ATM* mit den synaptischen und die Produkte von *ATR*, *BRCA1* und *Rad51* mit den asynaptischen Elementen des synaptonemalen Komplex (Keegan *et al.*, 1996; Scully *et al.*, 1997). Es ist vorgeschlagen worden, dass die Proteine für eine korrekte Synapsenbildung zwischen homologen Bereichen verantwortlich sind. Das Produkt von *ATR* bindet u.a. an die nicht-homologen Bereiche der X- und Y-Chromosomen der Säuger und verhindert vermutlich eine Synapsenbildung von nicht-homologen Regionen (Keegan *et al.*, 1996). *X. maculatus* besitzt differenzierte Geschlechtschromosomen und müsste, wie die Säuger, über ein System verfügen, das die differenzierten Bereiche während der Synapsenbildung vor einer Rekombination schützen. Vielleicht ist R_{Diff} bei der Differenzierung von Geschlechtschromosomen bzw. Erhaltung der differenzierten, geschlechts-chromosomalen Regionen beteiligt. *X. helleri*, der keine differenzierten Geschlechtschromosomen besitzt, verfügt nicht über ein entsprechendes Gen R_{Diff} .

Beziehung des PS-Geschlechtschromosoms zu der meiotischen und mitotischen Instabilität

Für viele Gene der Reparatur, Rekombination und Zellzyklusüberwachung ist bekannt, dass sie sowohl bei den mitotischen als auch bei den meiotischen Prozessen für die DNA-Stabilität verantwortlich sind (Baker *et al.*, 1995; de Wind *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996;

Haber, 1998). Diese Dualität hat eventuell einen evolutionären Hintergrund, denn es wird vermutet, dass die Meiose sich aus dem mitotischen Zellzyklus entwickelt hat (Übersicht von Kleckner, 1996). Viele gemeinsame Gene beteiligen sich u.a. bei der Reparatur von doppelsträngigen DNA-Brüchen, die während der Replikation bzw. meiotischen Rekombination entstehen (Übersicht von Dasika *et al.*, 1999 und Haber, 2000). Es ist daher nicht überraschend, dass der *Tu*-Komplex bzw. das PS-Geschlechtschromosom bei *Xiphophorus* neben der in dieser Arbeit gefundene Bedeutung für die genetische Stabilität auch bei dem mitotischen Austausch von Schwesterchromatiden beteiligt ist (Hamdoon, 1984; Dahms, 1985; Anders, F. *et al.*, 1985).

Bei den mitotischen Chromatid-Austauschen sind nicht nur die Geschlechtschromosomen bzw. die homologen Chromosomen der Schwertträger bei den Rekombinationsereignissen beteiligt, sondern eine Vielzahl der Chromosomen sind betroffen. Hierbei spielt ein Unterschied zwischen den beteiligten Chromatiden, wie oben für die *Xi-X* Aberrationen diskutiert, keine Rolle, denn identische Schwester-Chromatide sind von den Austauschen betroffen. Bei *Xiphophorus* haben die PSPM-freien Geschwister der Rückkreuzungsbastarde, ohne ein geerbtes PS-Geschlechtschromosom, eine SCE-Rate wie die Wildtypen, so dass der *Tu*-Komplex bzw. andere Regionen des PS-Geschlechtschromosoms die somatische Instabilität allgemein fördern müsste. Vermutlich interagiert ein Genprodukt des PS-Geschlechtschromosoms *in trans* mit den verschiedenen Chromosomen und stimuliert dabei Rekombinationsereignisse der Chromatide. Die Arbeitsgruppe von Scharfl (Froschauer *et al.*, 2001) berichtet von dem Bereich des *Tu*-Komplexes auf dem X- und Y-Chromosom als eine hoch instabile Region, die häufig Rearrangements eingehen. Diese Region beinhaltet eine hohe Konzentration an Retroelementen und es ist denkbar, dass eine Retrotransposition sich auch allgemein auf die genomische Instabilität auswirken könnte.

Die Kopplungsgruppe *Tu*-Komplex fördert die meiotische und mitotische Instabilität. Bei der genetischen Rekombination könnten Produkte der Kopplungsgruppe R_{Diff} und der Kopplungsgruppe *Tu*-Komplex interagieren, was zu einer reduzierten Rekombination führt. Die SCE-Rate der Mitose zeigt keine Dosis-Abhängigkeit vom Gen R_{Diff} . Eine Erklärung hierfür wäre, dass R_{Diff} nur für die Erhaltung der unterschiedlichen Bereiche verantwortlich ist, wie bei der meiotischen Rekombination oben diskutiert wurde (siehe S. 259). Noch unbekannte PS-Faktoren, die durch die Bastardisierung verlorengehen, könnten mitotisch-spezifische Interaktionen mit dem instabilitäts-induzierenden Faktor des PS-Geschlechtschromosoms eingehen und die Zahl der SCE in den reinen Platyarten reduzieren.

Eine erhöhte Rate von SCE ist auch für Bloom's Syndrom mit dem defekten Gen BLM charakteristisch (German, 1995; Ellis *et al.*, 1999). Das Syndrom ist mit einem erhöhten Krebsrisiko verbunden. Das Gen BLM kodiert für eine RecQ-Helicase und spielt für die Erhaltung der genomischen Stabilität in allen Organismen eine Rolle (Übersicht von Bachrati & Hickson, 2003). Das mutierte Genprodukt erhöht die Bildung von Doppelstrang-Brüchen während der DNA-Replikation, d.h. erhöht die Zahl von SCE's, reduziert die Zahl der Crossover's in der meiotischen Rekombination und weist Defekte in der Reparatur von Doppelstrang-Brüchen auf (McVey *et al.*, 2007). Bei *Xiphophorus* könnte eventuell das Gen BLM auf dem PS-Geschlechtschromosomen lokalisiert sein, mutiert vorliegen und für die genomische Instabilität verbunden mit diesem Chromosom verantwortlich sein. Das Gen R_{Diff} könnte diesen Effekt während der meiotischen Rekombination ausgleichen. Es ist gezeigt worden, dass das Gen BLM mit vielen Genen

der Zellzyklusüberwachung interagiert (Davies *et al.*, 2004; Wang, W. *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004), wie auch eine Interaktion anderer Gene der Zellzyklusüberwachung gezeigt werden konnte (Prolla *et al.*, 1994; Sturzbecher *et al.*, 1996; Koonin *et al.*, 1996; Scully *et al.*, 1997; Haber, 1998; Deng & Brodie, 2000).

Spielt die Chromatinstruktur für die Instabilität eine Rolle?

Eine Möglichkeit ist, dass ein Teil der DNA-Stabilität aufgrund der Chromatinstruktur beruht: Für *Xiphophorus* ist nachgewiesen worden, dass bei *X. helleri* und *X. maculatus* ein unterschiedlicher Kondensierungsgrad des Interphase-Chromatins vorliegt (Anders, F. *et al.*, 1981; siehe auch S. 255). *X. helleri* besitzt mehr Heterochromatin und dunkel-farbige Chromozentren als *X. maculatus*. In PSPM-tragenden Bastarden korreliert die *Tu*-Expression mit dem Grad der Chromatin-Kondensierung. Es ist vorstellbar, dass die unterschiedliche Chromatin-Kondensierung mit dem Locus *Tu*-Komplex und dem Gen *R_{Diff}*, die beide nicht im Genom von *X. helleri* präsent sind, zusammenhängen könnte. Die Chromatinstruktur spielt eine Rolle von u.a. die Zugänglichkeit der Genprodukte zur DNA und damit Prozesse wie Genaktivität, Reparatur und Rekombination. Bekannt ist, dass die Struktur des Chromatins die Aktivität von benachbarten Regionen auf dem Chromosom beeinflussen kann ("position effect variegation"), wobei verschiedene Faktoren *in trans* die Verpackung bzw. Genaktivität beeinflussen können (Übersicht von Dillon & Festenstein, 2002). Nach neuen Kenntnissen können auch kleine RNA-Moleküle diesen Effekt auslösen (Grewal & Elgin, 2007). Durch diesen Mechanismus ist es auch denkbar, dass der *Tu*-Komplex bzw. ein daran gekoppeltes Gen einen Effekt auf die Rekombinationsereignisse bzw. DNA-Reparatur *in trans* auf die verschiedenen Chromosomen ausüben könnte.

Für einige Zellzyklus-Überwachungsgene konnten Hinweise auf einen Zusammenhang zur Chromatinstruktur gezeigt werden: Für das Gen *mei-41*, ein *ATM*-verwandtes Gen bei *Drosophila*, ist gezeigt worden, dass es einerseits die Crossover-Inzidenz der Meiose beeinflusst und andererseits zu der Chromatin-Kondensierung beiträgt (Carpenter, 1979). Hawley & Friend (1996) schlugen vor, dass die Genprodukte von *mei-41* und andere *ATM*-ähnliche Gene eine kritische Rolle bei der Chromosomen-Kondensierung in der Nähe des Rekombinations-Intermediat ausüben könnten. Für das Gen *BLM* ist gezeigt worden, dass es mit einem „Chromatin Assembly Faktor“ interagiert und dabei die Chromatin-Verpackung während der DNA-Reparatur verhindert (Jiao *et al.*, 2004). Die Chromosomen-Kondensierung in der Crossover-Region könnte ein wichtiger Regulator für die Kondensierung entlang des gesamten Chromosoms sein und möglicherweise die relative Position der Austausch-Ereignisse kontrollieren (Kleckner, 1996). Ohta *et al.* (1998) zeigten Änderungen der Chromatinstruktur vor das Setzen der doppelsträngigen DNA-Brüche bei der meiotischen Rekombination in Abhängigkeit von mehreren Proteinen der Zellzyklusüberwachung. Eine Assoziation von ATR mit bestimmten Proteinen eines nukleosomalen Remodulierungs- und Deacetylierungskomplex schlägt einen Zusammenhang zwischen ATR's Funktion bei der Zellzyklusüberwachung und der Chromatin-Modulierung vor (Schmidt, D.R. & Schreiber, 1999). Ein Übersicht über das Zusammenspiel zwischen der Chromatinstruktur und der Zellzyklusüberwachung wird von Koundrioukoff *et al.* (2004) gegeben; besonders die Kinasen der *ATM*- und *ATR*-Familien sind bei der Chromatin-Kondensierung beteiligt.

Eine Aufgabe von *R_{Diff}* als ein Gen der Zellzyklusüberwachung könnte die Kondensierung des Chromatins betreffen, was eventuell durch eine Interaktion mit dem

PS-geschlechtschromosom-gekoppelten Genprodukt erfolgt. Durch die Chromatinstruktur könnte die Rekombinationsinzidenz somit indirekt reguliert werden.

Effekt von Röntgenstrahlen auf die Stabilität von SSRs

Die hohe Präsenz neuer Fragmentlängen in den Bastarden mit PS-Y-Chromosomen steht in Kontrast zu der Inzidenz neuer Fragmentlängen von weniger als 3% (2 von 70 Tieren), die bei Bastarden mit geerbten X- bzw. Z-Chromosomen beobachtet wurde (siehe S. 251-252). Die große Zahl der Genumordnungen bei den *ArSr*- bzw. *ArSr'*-Nachkommen könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, dass Tiere dieser Genotypen als Teststämme für Röntgenanalysen dienen. Die Möglichkeit besteht, dass die untersuchten Bastarde von bestrahlten Fischen abstammten. Es ist gezeigt worden, dass SSRs gegenüber Röntgenstrahlen und mutagenen Substanzen instabil sind, was vor allem ohne eine ausreichende Funktion von Genen der Zellzyklusüberwachung zutrifft (Swift *et al.*, 1991; Xu & Baltimore, 1996; Kolodner, 1996). Eine praktische Anwendung der Instabilität der *Xi-X*-Region, die möglicherweise durch Röntgenstrahlen erhöht wird, ist hiermit gegeben: Die *Xi-X*-Region und Mikrosatelliten könnten in Studien zum Einfluss der Umwelt auf die DNA dienen. Hierfür sind besonders Rückkreuzungsbastarde ohne eine ausreichende Funktion von R_{Diff} sensibel; in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kopplungsgruppe R_{Diff} Stabilität zu der Region verwehrt (siehe S. 255ff.). Neben Röntgenstrahlen sind z.B. UV-Strahlen, die für die Ätiologie des humanen Melanoms von großer Bedeutung sind (Armstrong & Krickler, 1993), und karzinogene Substanzen von Interesse.

Seit Jahren ist in unserem Labor eine transgenerationelle, nicht-mendelsche Vererbung von einer röntgenstrahl-induzierten Verstärkung des Pigmentzellmusters observiert worden (Anders, A. *et al.*, 1994b; Roushdy *et al.*, 1999): Wurden Eier oder Embryonen im Leib der Mütter, Platyfische mit den Phänotypen *DrSd* oder *DySp*, mit Röntgenstrahlen behandelt, entstand ein verstärktes Pigmentzellmuster, sogenannte benigne Melanome, in den heranwachsenden Fischen. Die benignen Melanome wurden bei allen Nachkommen beobachtet. Das Nachkommen wurde geschlossen weitergezüchtet und nach 60 Generationen treten Melanome immer noch bei allen Fischen auf, obwohl ausschließlich die Vorfahren vor 60 Generationen bestrahlt wurden. Werden die Fische mit *X. helleri* gekreuzt, segregieren die gleichen Phänotypen wie bei Individuen, dessen Vorfahren nicht bestrahlt wurden, nur mit dem Unterschied, dass die Melanome früher auftreten und mehr maligne sind. Hiermit wurde die Existenz von Onkodeterminanten, die transgenerationell, aber nicht nach den Mendel Gesetzen vererbt werden, ausfindig gemacht. Die für diese Melanome verantwortlichen Onkodeterminanten sind, wie verschiedene Kreuzungsstudien gezeigt haben, viele an Zahl, chromosomal gebunden und auf vielen Chromosomen verteilt. Sie werden während der Melanom-Entwicklung exprimiert und sind im Stande, die üblichen Tumorgen-Mechanismen zu verstärken. Ähnliche Beobachtungen konnten für das I-Modell des *Xiphophorus*-Melanomsystems gemacht werden: Das *Tu*-Gen mit einem dicht gekoppelten Suppressorgen wurde in das Genom der Schwertträger eingekreuzt. Unbehandelt entwickeln die Rückkreuzungsbastarde keine Tumore. Wurden Embryonen dieses Genotyps mit Röntgenstrahlen behandelt, entstand in 33% der Neugeborenen Melanome, in der Elterngeneration betrug die Inzidenz 10-20%. Wurden die melanom-

freien Nachkommen geschlossen weitergezüchtet, entstand immer wieder eine erhöhte Inzidenz von Melanomen bei bis zu 70% der Nachkommen auf; die melanomtragende Bastarde wurden immer für die weiteren Kreuzungen entfernt. Dieses Phänomen tritt noch nach 27 Generationen auf, obwohl die Röntgen-Behandlung der Urahnen einmalig gewesen ist. Hier ist die Existenz von Onkodeterminanten, die transgenerationell, nicht nach Mendel vererbt werden, anzunehmen. Später konnte gezeigt werden, dass auch UV-Licht diesen Effekt auslösen kann.

Als mögliche molekulare Grundlage dieser transgenerationellen, nicht-mendelschen Vererbung wurden Retrotransposons vorgeschlagen (Anders, A. *et al.*, 1994b; Roushdy *et al.*, 1999). Zwei Retrotransposons, *XIR-1* und *XIR-2*, sind im Genom von *Xiphophorus* nachgewiesen und isoliert worden (Petry, H., 1989; Petry, K., 1991; Petry, H. *et al.*, 1992). Sie sind in vielen Kopien im Genom anwesend und über die Chromosomen verteilt, werden im Melanom exprimiert und können sich als Folge einer Röntgenstrahlbehandlung vermehren. Die Retrotransposons erfüllen somit viele Kriterien, die für die Onkodeterminanten erforderlich sind.

Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit könnten auch SSRs bei der transgenerationellen, nicht-mendelschen Vererbung der verstärkten Pigmentzellmuster beteiligt sein: Die restriktive Poly(GTCT/GACA)-Organisation von *X. maculatus* im Vergleich zu *X. helleri* (siehe S. 243 und 254) und auch im Vergleich zu anderen untersuchten Organismen im Pflanzen- und Tierreich (Epplen *et al.*, 1991), ist untypisch und weist auf eine Bedeutung der restriktiven Organisation für diese Art hin, was mit der gut regulierten Expression des *Tu*-Komplexes zusammenhängen könnte. Ohne eine restriktive Poly(GTCT/GACA)-Organisation findet möglicherweise eine Überexpression des *Tu*-Komplexes statt. Eine gestörte Poly(GTCT/GACA)-Organisation bzw. Poly(GTCT/GACA)-Expression in den Vorläufern der transformierten Makromelanophoren würde möglicherweise die Differenzierung dieser Zellen beeinflussen und damit die Proliferationsvorgänge stimulieren. Werden Nachkommen von bestrahlten Embryonen, die ein verstärktes Pigmentzellmuster aufweisen, mit *X. helleri* gekreuzt, entwickeln die Tiere Melanome, die im Vergleich zu den Nachkommen von nicht-behandelten Fischen früher einsetzen und mehr maligne sind. Diese Tatsache zeigt zu den humanen "Repeat"-Krankheiten Parallelen (siehe auch S. 253 und S. 254): Die Instabilität von SSRs macht sich bei Menschen mit erblichen, progressiv degenerativen, neuro-muskulären Krankheiten bemerkbar. Eine Änderung in der Organisation von spezifischen simplen Sequenzen bestimmter Gene induziert die sogenannten "Repeat"-Krankheiten, wozu z.B. die Huntington-Krankheit (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993; Snell, R.G. *et al.*, 1993), das fragile X-Syndrom (Fu *et al.*, 1991), die myotone Dystrophie (Brook *et al.*, 1992), die Machado-Joseph-Krankheit (Kawaguchi *et al.*, 1994) und die spinocerebellären Ataxie (Orr *et al.*, 1993) gehören. Die Zahl von wiederholten Triplets im Gen ist für die Stabilität entscheidend. Wird eine bestimmte Länge der repetitiven Region überschritten, erkranken die Menschen. In den weiteren Generationen ist die Region instabil und die Zahl der Einheiten nehmen noch weiter zu. Die erhöhte Zahl der wiederholten Einheiten steht mit einem früheren Einsetzen der Krankheit und ernsterem Verlauf in Zusammenhang.

Die SSRs bzw. Poly(GTCT/GACA) erfüllen viele der Kriterien, die für die Onkodeterminanten vorgeschlagen wurden (Anders, A. *et al.*, 1994b): Sie sind viele an Zahl, chromosomal gebunden und auf vielen Chromosomen verteilt. Die restriktive

Poly(GTCT/GACA)-Organisation bei *X. maculatus* und der Zusammenhang zwischen der Organisation humaner Triplets in spezifischen Genen mit bestimmten Krankheiten (siehe oben) unterstützt die Vermutung, dass die Organisation von SSRs von fataler Bedeutung für den Organismus sein kann. Das frühere Einsetzen und der schwerere Verlauf der humanen Krankheiten mit einer gestörten Organisation der wiederholten Triplets in den Genen findet mit dem früheren Einsetzen und der erhöhten Malignität bei der kreuzungs-induzierten Melanomentwicklung von Fischen, dessen Urahnen bestrahlt wurden, seine Parallele. Sowohl bei den Fischen als auch bei den humanen "Repeat"-Krankheiten ist die Vererbung transgenerationell und folgt nicht der Segregation nach Mendel. Eine mögliche Eigenschaft von Poly(GTCT/GACA)-Sequenzen als Bestandteil von Transposons und damit die Fähigkeit zur Amplifikation (Epplen *et al.*, 1983; Schäfer *et al.*, 1986; Traut, 1987) ist mit der vermuteten Bedeutung von Retroposons zur unabhängigen Vermehrung nach einer Behandlung mit Röntgenstrahlen (Anders, A. *et al.*, 1994b; Anders, F. *et al.*, 1994) eventuell gleichbedeutend. Die Beziehung der *Xi-X* bzw. Poly(GTCT/GACA)-Stabilität zu denen für die Melanomentwicklung kritischen Gene R_{Diff} und dem *Tu*-Komplex bzw. deren Kopplungsgruppen (siehe S. 255ff.) weist auf eine Interaktion dieser Loci bzw. Genprodukte hin. Zusammen mit der restriktiven Poly(GTCT/GACA)-Organisation bei *X. maculatus* und der eventuellen röntgenstrahlbedingten Instabilität der *Xi-X*-Region ist es plausibel, dass die Poly(GTCT/GACA)-Organisation eine Rolle beim Auslösen der transgenerationellen, röntgenstrahl-induzierten Melanomentstehung innehaben könnte. Die differentielle Expression von *Xi-X*/Poly(GTCT/GACA) in den Pigmentzellen mit einem spezifischen Transkript in den Makropigmentzellen (siehe S. 276ff.) unterstützt die Vermutung über eine Verbindung zwischen Poly(GTCT/GACA) und den Musterpigmentzellen. Es ist denkbar, dass das Gen *Xi-X* mit Poly(GTCT) für die Differenzierung der transformierten Makromelanophoren in einer kritischen Phase der Embryogenese eine Rolle spielt, und somit möglicherweise bei der *Tu*-Komplex-induzierten, erhöhten Proliferation der Makromelanophoren einwirkt.

Zusammenfassung/weitere Fragestellungen

Eine atypische Vererbung der PS- und HS-*Xi-X*-Fragmente konnte in den Bastarden beobachtet werden (8,6% der 70 einzeln untersuchten Bastarde). Eine Beziehung von Aberrationen der *Xi-X* Genorganisation in Bastarden zu den Kopplungsgruppen *Tu*-Komplex und R_{Diff} konnte gezeigt werden: Die Kopplungsgruppe *Tu*-Komplex fördert die Instabilität, die durch die Kopplungsgruppe R_{Diff} unterbunden wird. Eine eventuelle Zuordnung von R_{Diff} als ein Gen der Zellzyklus-Überwachung wird diskutiert. R_{Diff} könnte eine Rolle bei der Unterdrückung der meiotischen Rekombination in abweichenden DNA-Bereichen spielen und somit eine Funktion bei der Differenzierung von Geschlechtschromosomen ausüben. Eine Aufgabe von R_{Diff} als ein Gen der Zellzyklusüberwachung könnte die Kondensierung des Chromatins betreffen, was eventuell durch eine Interaktion mit dem PS-geschlechtschromosom-gekoppelten Genprodukt erfolgt. Durch die Chromatinstruktur könnte die Rekombinationsinzidenz indirekt reguliert werden. Eine Verbindung zwischen der restriktiven (GTCT/GACA)_n-Organisation, dem Euchromatin und der gut regulierten *Sp*-Expression bei *X. maculatus* könnte bestehen.

Eine mögliche Rolle von *Xi-X*/Poly(GTCT/GACA) bei einer röntgenstrahl-induzierten, transgenerationellen, nicht-mendelschen Vererbung eines verstärkten Pigmentzellmusters wird angesprochen.

Die Beispiele der Polymorphismen in den Wildtypen (siehe S. 240) und DNA-Umlagerungen in Bastarden von *Xiphophorus* (siehe S. 251) zeigen, dass die genomische Stabilität und die Vererbung nach Mendel eine große Flexibilität einnimmt. Die humane, klinische Relevanz von DNA-Umlagerungen, wie für die Malignome (Übersicht von Charames & Bapat, 2003) und die Repeat-Krankheiten (Übersicht von Cleary & Pearson, 2003) beobachtet, verdeutlicht, dass genomische Umstrukturierungen von größter Bedeutung sind. Durch die weitführenden Konsequenzen und Ausbreitung dieser DNA-Umlagerungen ist es von höchstem Interesse, die molekularen Mechanismen, die diese DNA-Umlagerungen verursachen, zu enthüllen:

Studien der *Xi-X*-Genregion in verschiedenen Populationen der Wildtypen und den Kreuzungsprodukten von *Xiphophorus*, z.B. durch ein Sequenzverfahren, könnten genauere Prozesse solcher Genumordnungen aufklären und eine eventuelle Bedeutung der Sequenz Poly(GTCT/GACA) für diese DNA-Umstrukturierungen feststellen. Aberrationen in den Bastarden in Abhängigkeit von den Kopplungsgruppen R_{Diff} und den PSP-Loci/*Tu*-Komplex könnte nachgegangen werden und eventuell die Stabilität in Abhängigkeit von anderen Faktoren aufklären. Eine eventuelle Bedeutung der Organisation bzw. Expression von *Xi-X* und Poly(GTCT/GACA) für die transgenerationelle, nicht-mendelsche Vererbung von einer röntgenstrahl-induzierten Verstärkung des Pigmentzellmusters könnte nachgegangen werden. Der molekulare Effekt von Röntgen- und UV-Strahlen auf die DNA-Stabilität könnte durch *Xi-X* und Poly(GTCT/GACA) im xiphophorinen Melanom-Modell ergründet werden. Ein Vergleich der *Xi-X*-Organisation und des Poly(GTCT/GACA)-Musters in den Tumoren mit denen der Keimbahn-DNA würde eventuell direkt kritische genomische Regionen für die Neoplasie aufdecken können.

Wichtig für diese Analysen wäre eine große Zahl von Fischen, einzeln untersucht, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu erkunden. Vom Vorteil wäre es hier "Mini"-Methoden für die Analysen zu entwickeln, damit wenig Material, vielleicht ausschließlich Flossenmaterial, für die Untersuchungen ausreichen würden. Mit dem fortbestand der untersuchten Tiere hat man die Möglichkeit, die Effekte auf die Keimbahn zu untersuchen und eine bestimmte Mutante fortzuzüchten bzw. Studien der Polymorphismus-Evolution im Becken zu verfolgen. Mit der Anwendung eines PCR-Verfahrens würde DNA im ng-Bereich für die Analysen ausreichen, und es wäre möglich viele Fische innerhalb von nur einem Tag zu analysieren.

EXPRESSION VON XI-X

Eine RNA Expression konnte mit *Xi-X* als Sonde in Organen, Geweben und Zellen ektodermalen, mesodermalen und endodermalen Ursprungs nachgewiesen werden. Die verschiedenen Zelltypen zeigten charakteristische Transkriptlängen, die entweder auf alternative Spleißvorgänge oder die Existenz unterschiedlicher Initiation- bzw. Terminationssignale schließen lässt. Charakteristische Transkriptlängen in den unterschiedlichen Typen von Myocyten als auch in Pigmentzellen verschiedener Differenzierungsstufen deuten auf Differenzierungsfunktionen von *Xi-X* hin.

DISKUSSION

Expressionsanalysen der Leber lassen eine Funktion von *Xi-X* bei Alimentationsvorgängen vermuten.

Zum Teil konnten starke Hybridisierungssignale mit *Xi-X* als Sonde beobachtet werden, die für einige Organe auf die Anwesenheit der repetitiven Sequenz Poly(GTCT/GACA) in den Transkripten zurückzuführen ist. Andere Subregionen von *Xi-X*, die Poly(GTCT/GACA) nicht enthalten, ergeben Signale mit nur geringer Intensität. Durch die Anwendung einer Sonde, die repetitive Regionen enthalten, sind diese Transkripte niedriger Konzentrationen überhaupt erst detektier- und analysierbar.

In Analysen mit poly(GTCT/GACA)-enthaltenden Sonden konnten Transkripte in der Leber (3,1 kb, 0,8 kb), Gehirn (0,8 kb), Skelettmuskulatur (3,1 kb, 2,3 kb), Herzen (1,5 kb, 0,8 kb), Kiemen (1,9 kb, 1,5 kb, 1,1 kb), Hoden (1,4 kb, 1,1 kb) und Pigmentzellen (2,3 kb, 1,5 kb) beobachtet werden. In Geweben von Fett, Darm, Nieren, Pankreas und Milz waren keine Transkripte nachweisbar. Nur für die Skelettmuskulatur, das Herz (das 0,8 kb Transkript) und die Leber konnten auch andere Subregionen, als die repetitive Region von *Xi-X* in den Transkripten nachgewiesen werden. Die Transkripte dieser Gewebearten entsprechen Transkriptprodukten dieses Gens *per se*. Es steht noch offen, ob die in Gehirn, Hoden, Kiemen, Herzen (das 1,5 kb Transkript) und den Pigmentzellen nachgewiesenen Transkripte wirklich vom Gen *Xi-X* abstammen oder vielleicht auf ganz andere Gene, die auch die repetitive Region Poly(GTCT/GACA) beinhalten, zurückzuführen sind. Die Konzentrationen der *Xi-X*-Transkripte dieser Gewebearten könnten auch zu gering sein, um mit den nicht-repetitiven Sonden ein Hybridisierungssignal hervorrufen zu können. In dieser Arbeit werden alle Transkripte, die mit einer Subsonde von *Xi-X* ein Hybridisierungssignal hervorrufen, als *Xi-X*-Transkripte bezeichnet.

Die Diskussion beschränkt sich auf die *Xi-X*-Transkripte, die auch andere Subregionen als die repetitive Region Poly(GTCT/GACA) von *Xi-X* enthalten (siehe „Expression von *Xi-X* in der Leber, Skelettmuskulatur und dem Herzen“, S. 268), und auf die Expression in den Pigmentzellen, die für das xiphophorine Melanom-Modell von wichtiger Bedeutung ist (siehe eigener Hauptabschnitt „*Xi-X* und Pigmentzellen“, S. 276).

Auf der genomischen Ebene liegen die Restriktionsfragmente von *Xi-X* in polymorphen Längen vor: Bei *X. helleri*, Rio Lancetilla, betragen die 5'-liegenden *Bam*HI-Fragmente 2,60 kb, 2,65 kb und 2,70 kb und bei *X. maculatus*, Rio Jamapa, beträgt das entsprechende Fragment 2,3 kb. Die benachbarte 3'-Region hat für die Platyfische ein *Bam*HI-Fragment von 7,2 kb und für die Schwerträger von 0,6 kb. Die Expressionsdaten von *Xi-X* konnten keinen Unterschied der Transkriptlängen in den Geweben und Zelltypen der beiden *Xiphophorus*-Arten feststellen. Es ist anzunehmen, dass der DNA-Polymorphismus zwischen den untersuchten Populationen von *X. helleri* und *X. maculatus* auf Sequenzen zurückzuführen sind, die sich entweder außerhalb des Gens befinden oder durch RNA-Spleißen aus dem primären Transkript herausgeschnitten werden. Zwischen verschiedenen Individuen von *X. helleri* beziehen sich die Unterschiede auf Längen von 50-100 bp. Bei der gemeinsamen Untersuchung vieler Individuen, wie dies für fast alle Expressionsanalysen der Fall war, tritt dieser Unterschied höchstens in Form einer breiteren Bande hervor. In dieser Arbeit wurde kein Versuch unternommen, diese Fragestellung zu beantworten.

Als eine qualitative und quantitative Kontrolle für die Ergebnisse der *Xi-X*-Expression, wurden die Northern Filter mit einer Aktin-Sonde rehybridisiert. Die Homologie zu der eingesetzten β -Aktin Gensonde aus Hefe (Moos & Gallwitz, 1982, 1983) ist hoch und die Expression in den meisten untersuchten RNA-Isolaten sehr stark. Southern Analysen mit *Bam*HI-verdauter, xiphophoriner DNA ergab 5-6 hybridisierte Fragmente, was die Möglichkeit von mehreren Aktin-Genen beim *Xiphophorus* vermuten lässt (nicht gezeigt).

Es wurden 3 Aktin-Transkripte verschiedener Längen ausfindig gemacht. Die Skelettmuskulatur zeigte ausschließlich ein Transkript von 1,8 kb, und ein Transkript von 1,6 kb konnte nur in aus Herzen isolierter RNA ausfindig gemacht werden. Mit Ausnahme der Skelettmuskulatur konnte ein ubiquitäres Aktin-Transkript von 2,2 kb in allen untersuchten Gewebe- und Zelltypen nachgewiesen werden. Untersuchungen an Embryonen zeigten eine Bildung des 1,8 kb Skelettmuskel-Transkripts ab Stadium 15, das bis zu den Stadien 22/25 an Konzentration zunahm. Das 2,2 kb Transkript kam in allen untersuchten Entwicklungsstadien in der gleichen Stärke vor. Das herzspezifische Transkript von 1,6 kb konnte nicht in der Ontogenese nachgewiesen werden, wahrscheinlich durch die relativ geringe Menge an Herzzellen in Gesamtisolaten der Embryonen bedingt. Durch den Nachweis von charakteristischen Transkriptlängen von Aktin in verschiedenen Gewebearten konnte die Zuordnung eines *Xi-X*-Transkriptes von 2,3 kb, nachgewiesen in Flossen, Haut, Peritoneum und der Zelllinie *DrLi*, zu den Skelettmuskelzellen, auch ein 2,3 kb *Xi-X*-Transkript produzierend, ausgeschlossen werden (siehe Diskussion „*Xi-X* und Pigmentzellen“, S. 276).

Als qualitativer und quantitativer Marker ist Aktin nicht unbedingt nützlich: In einer Analyse wies eine Gewebeart keine Expression von Aktin im Gegensatz zu *Xi-X* auf, und in anderen Analysen war die Aktin-Expression wechselhaft nachweisbar, oft ungefähr den Schwankungen der *Xi-X*-Expression entsprechend. In wiederum anderen Analysen war die Aktin-Expression relativ konstant, während die Expression von *Xi-X* große Unterschiede aufwies.

Expression von Xi-X in der Leber, Skelettmuskulatur und dem Herzen

Eine Expression von *Xi-X per se* konnte in der Leber, Skelettmuskulatur und in den Herzen nachgewiesen werden. Die isolierte Genregion *Xi-X* zeigt eine hohe Homologie zum Gen *pdx-1* (siehe S. 233ff.), aber es ist aufgrund der abweichenden Eigenschaften der RNA-Expression unwahrscheinlich, dass *Xi-X* dem *pdx-1* homologen Gen von *Xiphophorus* entspricht. Die Ergebnisse werden in bezug auf eine *pdx-1* Homologie diskutiert.

Charakterisierung der Transkripte

Von einem angenommenen primären Transkript von 3,1 kb, nachgewiesen in der Leber und der Skelettmuskulatur bei hohen Expressionswerten, könnten durch ein differentielles Spleißen Transkripte der Längen 0,8 kb (Leber, Herz) und 2,3 kb (Skelettmuskelzellen) hergestellt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Transkript von 3,1 kb ein reifes mRNA-Transkript darstellt. Die Anwesenheit aller Subregionen des isolierten Genfragments, auch das vermutete Intron im 5'-Bereich, und

der fehlende Nachweis des Transkripts in den Poly(A)⁺-Fraktionen sprechen eher für ein primäres Transkript. Für die Leber- und Skelettmuskeltranskripte von 0,8 kb bzw. 2,3 kb konnte gezeigt werden, dass es sich um Poly(A)⁺-Transkripte handelt.

Die Hybridisierungssignale der Leber bei 0,8 kb sind auf zwei verschiedene Transkripte der gleichen Länge zurückzuführen: Die Signale, gewonnen mit den beiden Subsonden $Xi-X_B$ und $Xi-X_C$ zeigten in verschiedenen Leberpräparaten große, voneinander unabhängige, quantitative Schwankungen, die von keiner nachweisbaren Expression bis zu sehr kräftigen Hybridisierungsbanden reichten. In wenigen Präparaten waren die Signale nur mit der Sonde $Xi-X_C$ nachweisbar.

Die beiden Lebertranskripte von 0,8 kb beinhalten verschiedene Subregionen von $Xi-X$. Zwei verschiedene Transkripte der gleichen Länge mit verschiedenen Subregionen von $Xi-X$ sind ebenfalls für die Herztranskripte zu vermuten, auch 0,8 kb betragend. Wegen des begrenzten Materials von Herzen waren hiermit keine ausführlichen Studien möglich. Für die Leber konnte gezeigt werden, dass das eine Transkript, $Xi-X^{LeberC}$, nur die Region C, möglicherweise auch wenige Nukleotide der benachbarten, 5'-liegenden Spez2-Region, vom isolierten $Xi-X$ Abschnitt beinhaltet. Dieses trifft eventuell auch für das eine Herztranskript, $Xi-X^{HerzC}$, zu. Die beiden anderen Transkripte der Leber und Herzen unterscheiden sich. Das Lebertranskript, $Xi-X^{LeberB}$, beinhaltet die Homöobox, die simple Sequenz Poly(GTCT), die Region dazwischen (B-Spez1) und eine Region 3' zur simplen Sequenz (B-Spez2). Das Herztranskript, $Xi-X^{HerzB}$, besitzt vermutlich auch die Homöobox, aber nicht die simple Sequenz.

Das Skelettmuskeltranskript beinhaltet die Homöobox, die simple Sequenz und die Region dazwischen (B-Spez1), aber die 3'-liegenden Regionen B-Spez2 und C, die in den Lebertranskripten B bzw. C präsent sind, fehlen. Mindestens 4 verschiedene Transkripte aus der isolierten $Xi-X$ -Region konnten somit nachgewiesen werden.

29 bp strangaufwärts zur Homöobox befindet sich ein Spleißakzeptorsignal, und vermutlich wird das homöobox-enthaltende Exon mit einem weiteren Exon in der 5'-Region verknüpft. In den beiden Lebertranskripten sind Polyadenylierungssignale vorhanden, in den Regionen B-Spez2 bzw. C, und sie könnten die 3'-Enden der Transkripte darstellen. Für den charakterisierten Teil des Skelettmuskeltranskripts ist kein Polyadenylierungssignal erkennbar, und Sequenzen in der $Xi-X_B-Rep$ Region werden vermutlich mit einem Exon weiter strangabwärts zum isolierten Genfragment verbunden.

Während $Xi-X$ ein differentielles Spleißen mit Transkripten verschiedener Längen und die Anwesenheit verschiedener Subregionen aufweist, wird für $pdx-1$ anderer Organismen nur ein Transkript beschrieben. Beim Zebrafisch beträgt das $pdx-1$ -Transkript 0,9 kb (Milewski *et al.*, 1998), beim Krallenfrosch 1,9 kb (Gamer & Wright, 1995), bei der Ratte 1,6 kb (Leonard *et al.*, 1993) und beim Menschen 1,5 kb (Stoffel *et al.*, 1995). Das Transkript von $pdx-1$ wird in diesen Organismen in Pankreas und Duodenum produziert (siehe S. 273).

Die nachgewiesenen Regionen von $Xi-X$ in dem LeberB Transkript, vom Spleißakzeptorsignal 29 nt strangaufwärts zur Homöobox bis zum Polyadenylierungssignal in der Spez2-Region, betragen zusammen 801 nt. Bei einer Gesamtlänge von ca. 0,8 kb, nachgewiesen durch die Northern Analysen, würde nur eine sehr kleine Region fehlen können, und die $Xi-X$ Region müsste entsprechend mit einem sehr kleinen 5'-liegenden Exon verknüpft werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass ein

kleines Intron in der charakterisierten *Xi-X* Region während der Transkriptreifung entfernt wird und die 5'-Region des Gens entsprechend größer ausfällt. Die *pdx-1* Gene der Säuger bestehen aus zwei Exons (Jonsson *et al.*, 1994; Stoffers *et al.*, 1997). Beim *pdx-1* Transkript vom Zebrafisch (Milewski *et al.*, 1998), das mit 0,9 kb Transkriptlänge mit der Länge vom *Xi-X* *LeberB*-Transkript vergleichbar ist, ist die strangabwärtsliegende Region zur Homöobox kürzer als beim *Xi-X* (258 nt gegen 592 nt), dafür die strangaufwärtsliegende Region länger (504 nt).

Die PDX-1 Faktoren von *Xenopus* und den Säugern haben eine 100%-ige Homologie innerhalb der Homöodomänen (Peshavaria *et al.*, 1997). Wenn die konservierten Aminosäuren berücksichtigt werden, beträgt die Homologie der Homöodomäne von XI-X zu der PDX-1 Homöodomäne von Zebrafisch 100% und zu den Homöodomänen vom Frosch und den Säugern 97%. Zwischen den N-terminalen Regionen der PDX-1 Faktoren von *Xenopus* und den Säugern (145 bzw. 146 Aminosäuren) besteht eine Homologie von ca. 50%, und gut konservierte Subdomänen, die für die transaktivierende Funktion von PDX-1 verantwortlich sind, befinden sich in diesem Bereich (Peshavaria *et al.*, 1997; Shushan *et al.*, 1999). Wie viele andere Homöodomän Proteine enthält PDX-1 ein Pentapeptid (FPWMK) N-Terminal zur Homöodomäne, das für eine Heteromerbildung mit PBX-1 und anderen TALE-Proteinen („three amino acid loop extension“) verantwortlich ist (Dutta *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001). Die N-terminale Region von *Xi-X* ist nicht charakterisiert worden. Es ist unwahrscheinlich, dass das *Xi-X*-Lebertranskript B mit dem vermutlich sehr kurzen 5'-Exon die Segmente kodierend für die konservierten, transaktivierenden Subregionen enthalten kann. Aus dieser Sicht ist eine homologe Funktion von *pdx-1* und *Xi-X*, trotz des hohen Homologiegrades der Homöodomänen, unwahrscheinlich. Für das 2,3 kb Transkript der Skelettmuskulatur besteht die Möglichkeit, homologe Bereiche in der 5'-Region ausfindig machen zu können.

Die C-terminalen Regionen der PDX-1 Faktoren, die der charakterisierten 3'-Region des *Xi-X*-Gens entsprechen, sind schlecht konserviert, nur 28% der Aminosäuren von Frosch und Ratte (65 bzw. 79 Aminosäuren) sind homolog (Peshavaria *et al.*, 1997). Diese C-terminalen PDX-1-Regionen zeigen einen gewissen Homologiegrad zu XI-X auf; 19 von 20 Aminosäuren vom Zebrafisch und 17 von 20 Aminosäuren vom Frosch direkt C-terminal zu den Homöodomänen sind mit XI-X konserviert. Bei der Ratte muss eine Lücke von 8 As eingebaut werden, dann sind 16 von 19 Aminosäuren konserviert. Die Funktion der C-terminalen Domäne von PDX-1 bleibt noch ungeklärt (Peshavaria *et al.*, 1994, 1997).

Expressionsmuster

Im Expressionsmuster unterscheidet sich *Xi-X* vom *pdx-1* Gen. Während eine Expression von *pdx-1* hauptsächlich auf Duodenum und Pankreas beschränkt ist (siehe auch S. 273), wird *Xi-X* im adulten Organismus von *Xiphophorus* in anderen Organen exprimiert. Im Verdauungssystem sind *Xi-X*-Transkripte in der Leber nachweisbar, und die Skelettmuskulatur und die Herzen exprimieren dieses Gen *per se*. Mit Sonden, die die simple Sequenz Poly(GTCT/GACA) enthalten, werden auch Transkripte im Gehirn, Hoden, Kiemen und Pigmentzellen detektiert. Diese Transkripte könnten aber auch auf andere Gene, die diese simple Region enthalten, zurückzuführen sein.

Leber

Sowohl für die Leber als auch für die Skelettmuskulatur wurden in verschiedenen Präparaten große Schwankungen in der Signalintensität der *Xi-X* Transkripte erreicht, aber keine Beziehung konnte zu den Genotypen oder Phänotypen der Tiere festgestellt werden; Eigenschaften, wie Art, Rückkreuzungsgeneration, Pigmentzellmuster und Geschlecht, wurden berücksichtigt. Die Synthese bzw. der Abbau der Transkripte steht offensichtlich unter einer nicht-konstitutiven Regulation, die vermutlich von Signalen der Umgebung bzw. des Gesundheits- oder Ernährungszustands der Fische beeinflusst werden könnte. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des *Xi-X* Gens in der Leber mit der Nahrungseinnahme der Tiere schwankt. Eine reziproke Beziehung der Konzentrationen der beiden Lebertranskripte B und C konnte für Fische, denen zwei Tage lang kein Futter gereicht wurde, im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt werden. Hierbei ist die Signalintensität des Transkripts B der Leber, das Lebertranskript, das mit dem *pdx-1* Gen die hohe Homologie aufweist, bei den Alimentationsvorgängen ca. 50% erhöht. Das Transkript C ist für den Hungerzustand charakteristisch, und die gehungerten Fische zeigten ca. eine 50% erhöhte Transkriptonkonzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren. Das isolierte Fragment vom Transkript C enthält keine Sequenzen, die mit dem Gen *pdx-1* eine Homologie aufweisen. Diese reziproke Beziehung der Signalintensität, erreicht mit den beiden Subsonden *Xi-X_B* und *Xi-X_C*, bestätigt die Existenz von zwei verschiedenen Transkripten der gleichen Länge in der Leber. Durch den Vergleich der Signalintensität erreicht mit Sonden, die die simple Sequenz Poly(GTCT/GACA) nicht enthalten, konnte gezeigt werden, dass das Transkript C der Leber in einer viel höheren Konzentration als das Transkript B vorliegt. Auch für *pdx-1* konnte eine geänderte Expression in Abhängigkeit von der Nahrungseinnahme nachgewiesen werden (Gremlich *et al.*, 1997; Arantes *et al.*, 2002). PDX-1 spielt u.a. eine Hauptrolle bei der Regulation der Insulin-Transkription (Melloul *et al.*, 2002a), und seine Genaktivität wird durch verschiedene, externe Stimuli moduliert (Melloul *et al.*, 2002b).

Die hohe Homologie von *Xi-X* zum *pdx-1*, das u.a. durch die Stimulierung der Produktion der Hormone Insulin und Somatostatin anabolische Prozesse induziert (Leonard *et al.*, 1993; Ohlsson *et al.*, 1993), macht auch für *Xi-X* eine Rolle beim Metabolismus plausibel. Der Kohlenhydrat-Stoffwechsel beispielsweise, bei der *pdx-1* eine Rolle spielt, ist in den drei *Xi-X*-exprimierenden Organen Leber, Herz und Skelettmuskulatur von wichtigster Bedeutung und die entsprechenden Enzymaktivitäten von der Nahrungseinnahme abhängig.

Muskel

Durch den hohen Anteil an Muskelzellen im Herzen, sowie durch die nachgewiesene *Xi-X* Expression in den Skelettmuskelzellen, kann vermutet werden, dass die *Xi-X* Transkripte, die in den Herzen nachgewiesen wurden, auf die Herz-Muskelfasern zurückzuführen sind. Unter dieser Annahme kann dem Gen *Xi-X* aufgrund seines Expressionsmusters in den Muskelzellen Differenzierungsfunktionen zugeschrieben werden: Verschiedene Typen Muskelzellen, die Skelettmuskulatur (2,3 kb), Herzmuskulatur (0,8 kb) und die viszerale Muskulatur (keine Expression nachweisbar), zeigen unterschiedliche Transkriptlängen bzw. keine Expression. *Xi-X* müsste daher eine Funktion ausüben, die sich in den verschiedenen Typen Myocyten unterscheidet. Dieses könnten Funktionen aus verschiedenen Bereichen sein, von der Reizübertragung, über die

Muskelkontraktion, bis zur metabolischen Regulation. Eine Beziehung von den Lebertranskripten zu den Alimentationsvorgängen (siehe oben), sowie der schwankende quantitative Nachweis von *Xi-X* in den Skelettmuskelzellen, macht eine metabolische Funktion von *Xi-X* auch in den Muskelzellen naheliegend.

Durch den Einsatz der homöobox-enhaltenden Sonde *Xi-X_{B-Hom}* konnten zusätzlich zu dem 2,3 kb Transkript von *Xi-X* zwei andere Transkripte der Längen 4,0 und 1,3 kb in der Skelettmuskulatur beobachtet werden. Die Signale der Transkripte von 4,0 und 1,3 kb sind etwas stärker, als die des charakterisierten 2,3 kb *Xi-X*-Transkripts. Die zusätzlichen Transkripte waren mit keinen anderen Subsonden von *Xi-X* detektierbar, aber könnten alternativen Spleißprodukten von *Xi-X* in der Skelettmuskulatur entsprechen. Die verwendete Gensonde *Xi-X_{B-Hom}* enthält 41 bp der Homöobox und 59 bp der strangabwärtsliegenden Sequenzen; die Homologie dieser Sonde zu der entsprechenden Region vom *pdx-1* Gen vom Zebrafisch beträgt 83%. Die zusätzlich nachgewiesenen Transkripte in der Skelettmuskulatur könnten daher durch Kreuzhybridisierungen auf das xiphophorine *pdx-1* Gen zurückzuführen sein. Dies erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, weil eine *pdx-1* Expression in der Skelettmuskulatur in der Literatur nicht beschrieben worden ist. Eine letzte Möglichkeit ist, dass die zusätzlichen Transkripte, die in der Skelettmuskulatur nachweisbar sind, auf Homöobox Gene zurückzuführen sind, die bis auf die Homöobox keine weiteren Homologien mit *Xi-X* und *pdx-1* aufweisen. Die Subsonde *Xi-X_{B-Hom}* enthält die Region der dritten Helix der Homöobox, die in den Homöoboxen hoch konserviert ist.

Embryonalentwicklung

Die *Xi-X*-Transkripte von 0,8 und 2,3 kb, die in den adulten Tieren nachgewiesen werden konnten und auf das Gen *per se* beruhen, waren auch in Gesamtextrakten von Embryonen nachweisbar. Von *X. helleri* wurden die ontogenetischen Entwicklungsstadien 13, 15, 22 und 25, von *X. maculatus* die Stadien 11-17 und das Stadium 22 (Tavolga, 1949) untersucht.

Das skelettmuskel-spezifische Transkript von 2,3 kb konnte ab dem Entwicklungsstadium 15 schwach nachgewiesen werden und nahm während der weiteren Entwicklung an Intensität zu. Die ersten quergestreiften Muskelzellen differenzieren im Stadium 12, im Stadium 15 sind 20-21 myomere Einheiten von insgesamt 28 myomeren Einheiten von *X. helleri* angelegt worden (Tavolga, 1949). Ein paralleles Erscheinungsbild trifft für das 1,8 kb Aktintranskript der Skelettmuskelzellen zu, und die Transkripte spiegeln möglicherweise die fortschreitende Bildung und Differenzierung der Zellen wider.

Mit der Sonde *Xi-X_C* waren die Signale von 0,8 kb in den xiphophorinen Larven, Entwicklungsstadium 25, schwach erkennbar, keine früheren Entwicklungsstadien zeigten positive Ergebnisse. Das Signal beruht vermutlich auf den Leber- und Herztranskripten, die mit dieser Sonde in den adulten Tieren Hybridisierungssignale hervorrufen. Mit der Sonde *Xi-X_B* konnte schon im Stadium 15 ein 0,8 kb Transkript nachgewiesen werden, das Hybridisierungssignal nahm mit den zunehmenden Stadien an Stärke zu. Ein Transkript von 0,8 kb konnte in adulten Tieren mit der Sonde *Xi-X_B* in Leber, Gehirn und Herzen nachgewiesen werden, und das 0,8 kb *Xi-X* Transkript in Embryonen könnte sich auf diese Organe beziehen. Lebergewebe wird ab Entwicklungsstadium 14 gebildet, die ersten Herzanlagen werden im Stadium 10 angelegt und im Stadium 12 besteht ein kräftiger Herzschlag (Tavolga, 1949). Das

zentrale Nervensystem wird in früheren Stadien angelegt; z.B. das Neuralrohr und Metencephalon werden ab Stadium 8 und der Hypothalamus ab Stadium 12 gebildet (Tavolga, 1949).

Sowohl für die Säuger als auch für *Xenopus laevis* konnte gezeigt werden, dass das Gen *pdx-1* für die normale Entwicklung der Bauchspeicheldrüse essentiell ist. Das Expressionsmuster während der Entwicklung und im adulten Organismus spiegelt die Rolle dieses Gens für die Ontogenese und Funktion von Pankreas und Duodenum wider (Wright *et al.*, 1988; Ohlsson *et al.*, 1993; Leonard *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1994; Gamer & Wright, 1995; Guz *et al.*, 1995): Das Gen wird embryonal, kurz nach der Vollendung der Gastrulation, in einem schmalen Ring des endodermalen Intestinaltrakts, in einem Bereich, in dem Pankreas und Duodenum mit fortschreitender Entwicklung gebildet werden, exprimiert. Später wird das Gen in den dorsalen und ventralen pankreatischen Anlagen transkribiert. In den weiteren Entwicklungsstadien sind die endokrinen und exokrinen Zellen, das pankreatische, exkretorische Gangsystem und das Duodenalepithel *pdx-1* Expressionsdomänen. Eine Expression ist auch in den embryonalen, neuralen Zellen des zentralen Nervensystems nachgewiesen worden (Schwartz *et al.*, 2000). Im adulten Organismus ist die Expression vorwiegend auf die insulin-produzierenden β -Zellen, auf einen Anteil der endokrinen α - und δ -Zellen, auf das pankreatische, exkretorische Gangsystem und auf das Duodenalepithel begrenzt. Die Herstellung von Mäusen ohne ein funktionelles *pdx-1* Gen verdeutlicht die kritische Rolle dieses Gens bei der normalen Entwicklung des Pankreas (Jonsson *et al.*, 1994; Offield *et al.*, 1996, Ahlgren *et al.*, 1996); die Mäuse werden ohne Pankreas geboren und sterben kurz nach der Geburt. Eine pankreatische Agenesie konnte für eine Patientin ebenso auf ein mutiertes *pdx-1* zurückgeführt werden (Stoffers *et al.*, 1997). Die essentielle Rolle von *pdx-1* bei der Ontogenese von Duodenum und Pankreas macht es denkbar, dass das verwandte Gen *Xi-X* bei der Ontogenese der exprimierenden Organe Leber, Skelettmuskulatur und Herzen von *Xiphophorus* beteiligt sein könnte.

Die Gene *Xi-X* und *pdx-1* im Intestinaltrakt

RNA-Analysen haben keine *pdx-1* Expression in anderen Organen als Duodenum und Pankreas aufdecken können, z.B. der restliche Dünndarm, Magen, Leber, Milz, Gallenblase und Muskel sind negativ (Wright *et al.*, 1988). „Knockout“-Mäuse ohne ein funktionelles *pdx-1*-Gen zeigten auch in keiner dieser Organe Defekte (Jonsson *et al.*, 1994; Offield *et al.*, 1996). Transgene Mäuse mit der Promoterregion von *pdx-1*, geknüpft an das Reportergen *lacZ*, haben zusätzlich zu der Expression in den endokrinen Zellen, dem pankreatischen Gangsystem und dem Duodenalepithel auch eine Expression in den exokrinen Zellen des Pankreas, in den pylorischen Drüsen des distalen Magens, in der Gallenblase mit intra- und extrahepatischen Gallengängen, in den Brunnerschen Drüsen und in der Milz aufdecken können (Offield *et al.*, 1996; Stoffers *et al.*, 1999). Der *pdx-1*-Promoter spielt möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Spezifizierung vieler endodermaler Strukturen innerhalb des Mittelsegments des Körpers. Die abweichenden Aktivitätsbereiche des abgetrennten *pdx-1* Promoters und des gesamten *pdx-1* Gens deutet entweder auf eine posttranskriptionelle Regulation oder auf zusätzliche, regulatorische Bereiche des Gens außerhalb des eingesetzten Promoterbereichs hin. Eine autoregulatorische Rolle von PDX-1 ist nachgewiesen worden (Marshak *et al.*, 2000). Ein Übersicht über die Regulation der *pdx-1*-Transkription wird von Melloul *et al.* (2002b) gegeben. Eine Bedeutung des Gens *pdx-1* für die Leber, sowie für die

Skelettmuskulatur und Herzen, die Expressionsdomänen von *Xi-X*, kann aufgrund der negativen Expressionsbefunde und der normalen Morphologie in Nullmutanten ausgeschlossen werden.

Während Amphibien, Reptilien, Vögel und Säuger eine weitgehend ähnliche Entwicklung und Aufbau des Pankreas aufweisen, unterscheiden diese sich bei den niedrigeren Vertebraten und Invertebraten (Übersicht von Slack, 1995). In z.B. den Insekten sind die endokrinen Zellen im Gehirn lokalisiert, bei einigen Arten auch in Darm. Bei *Amphioxus* befinden sich die insulin-produzierenden Zellen ausschließlich in der Darmschleimhaut während die anderen endokrinen Zellen sowohl im Gehirn als auch im Darmepithel lokalisiert sein können. Die Knochenfische (*Teleostei*) besitzen einen konventionellen, exokrinen Pankreas, aber die endokrinen Zellen sind häufig in Brockman Körperchen, die fast ausschließlich aus endokrinen Zellen bestehen, lokalisiert. Die Brockman Körperchen, von der es einen großen oder mehrere kleine gibt, befinden sich zwischen dem Darm und der Leber in der Nähe des pankreatischen Kanals. Zusätzlich können insulin-produzierende Zellen als kleine Inseln über den Intestinaltrakt verteilt sein. Beim Zebrafisch weisen während der Entwicklung und in den adulten Organismen alle insulin-produzierenden Zellen eine *pdx-1* Expression auf (Milewski *et al.*, 1998). Bei dieser Fischart zeigt *pdx-1* eine hohe Expression in den pylorischen Krypten, Ausbuchtungen im proximalen Bereich des Darmes, von der gezeigt werden konnte, dass sie exokrine und endokrine Faktoren produzieren. Biemar *et al.* (2001) beschreiben ausführliche Studien der Pankreasbildung mit der Expression von u.a. *pdx-1* und Insulin in den Embryonen von *Danio rerio*. Die Pankreatogenese vom Zebrafisch besitzt einige Besonderheiten im Vergleich zu den Tetrapoden; z.B. werden nicht eine ventrale und eine dorsale Anlage in der frühen Ontogenese gebildet, und es gibt nur eine große Insel von Langerhans im Pankreas. Die *pdx-1* Expression setzt sehr früh ein, im 10-somitischen Stadium, und die insulin-produzierenden Zellen stellen einen Teil der *pdx-1*-produzierenden Zellen dar. Eine starke Expression von *pdx-1* in dem sich entwickelnden Pankreas bestätigt auch für Fisch, wie für die Tetrapoden gezeigt, eine duale Funktion von *pdx-1*; einerseits spielt das Gen für die Entwicklung von Pankreas und andererseits für die Differenzierung und Insulinproduktion der β -Zellen eine Rolle.

In den adulten Tieren von *Xenopus* und den Säugern beschränkt sich die Expression von *pdx-1* im Pankreas auf die endokrinen Zellen zusätzlich zum exkretorischen Gangsystem. Die Tatsache, dass die Knochenfische möglicherweise nur einen exokrinen Pankreas besitzen, machen, bezüglich *Xi-X* als das *pdx-1* Ortholog, die negativen Expressionsbefunde von *Xi-X* im Pankreas beim *Xiphophorus* verständlich. Es ist fragwürdig, ob der Nachweis von *Xi-X*-Transkripten in der Leber von *Xiphophorus* wirklich auf den Hepatocyten zurückzuführen ist, oder ob vielleicht die entnommenen Organe zusätzliche, endokrine Zellen besitzen oder die Hybridisierungssignale auf die hepatischen Gallengänge, die mit dem *pdx-1*-Promotor/*lacZ*-Konstrukt eine Expression zeigten (siehe oben), beruhen. In Betracht der Komplexität der piscinen Verdauungsorgane müssten, um eine gesicherte Zuordnung der *Xi-X* Expression zu bestimmten Gewebearten bzw. Zelltypen zu gewährleisten, genaue morphologische und histologische Studien in bezug auf die Verdauungsorgane der Fische durchgeführt werden. Eine Kombination der histochemischen Analyse mit dem RNA-Nachweis von *Xi-X* und z.B. Insulin oder anderen pankreas- oder leber-spezifischen Genen direkt am Schnitt würde eine eventuelle Zuordnung der *Xi-X*-Expression zu den spezifischen Organen bzw. Zellen sicherstellen.

Schon lange ist bekannt, dass der *Hox*-Code die anterior-posterioren Musterung des Ektoderms und Mesoderms entscheidet (Krumlauf, 1994), aber erst später konnte eine Funktion bei der Musterung des Endoderms gezeigt werden: Eine regionale Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die meisten Homöobox Gene, entlang des anterior-posterioren Endoderms ist beschrieben worden (siehe Zusammenfassung von Grapin-Botton & Melton, 2000). Eine Arbeitsgruppe beschreibt z.B. die Bedeutung der paralogen Gruppen 4 und 5, eine andere die paralogen Gruppen 7, 8 und 9 der *Hox*-Gene für die Musterung des Intestinaltraktes (Sekimoto *et al.*, 1998; Pitera *et al.*, 1999). Die *ParaHox*-Cluster mit den Genen *pdx-1*, *Cdx-1*, *Cdx-2* und *Cdx-4*, die alle für die Entwicklung verschiedener Regionen des Darms verantwortlich sind, beteiligen sich bei der endodermalen Musterung (Gamer & Wright, 1993; Brooke *et al.*, 1998; Silberg *et al.*, 2000). *Xi-X*, ein neu beschriebenes *ParaHox*-Gen, zeigt eine Funktion in der Leber; eine zusätzliche Expressionsdomäne in einem Bereich des Intestinaltraktes.

Eine andere Fragestellung ergibt das Auftreten von 0,8 kb-Transkripten sowohl in der Leber als auch im Herzen. Diese beiden Organe sind während der Entwicklung juxtapositioniert, und das 0,8 kb Transkript könnte denkbar mit der anterior-posterioren Positionierung eingehen. Die beiden Organe werden zum Teil durch gemeinsame Faktoren reguliert (Reiter *et al.*, 1999). Für die Determination und Differenzierung dieser Organe sind Interaktionen zwischen Endoderm und Mesoderm erforderlich. Z.B. besitzt der anteriore Endoderm die spezifische Fähigkeit, die Herz-Differenzierung im Mesoderm zu induzieren (Schultheiss *et al.*, 1995). Reziprok sind Signale des präkardischen Mesoderms erforderlich, um die Region des Vorderdarms, wo die Leber später gebildet wird, zu determinieren und die Bildung hepatischer Differenzierungsmarker zu induzieren (Gualdi *et al.*, 1996). Ein FGF-Faktor, produziert im präkardischen Mesoderm, ist für das Anschalten der Entwicklungsrichtung Leber essentiell (Jung *et al.*, 1999).

Wright *et al.* (1988) hatten nach der Beschreibung von *pdx-1* als das erste homöobox-enthaltende Gen mit einer Expression in endodermalen Zellen vorgeschlagen, dass ähnliche Gene bei der Spezifizierung verschiedener, endodermaler Strukturen entlang der anterior-posterioren Achse beteiligt sein könnten. Wenn *Xi-X* für die Ontogenese der Leber von Bedeutung ist und *pdx-1*, wie nachgewiesen, für Pankreas und Duodenum essentiell ist, würde sich diese Hypothese von Wright *et al.* (1988) bewahrheiten. Offield *et al.* (1996) diskutierten, dass die Bildung der Organe Leber und Pankreas im posterioren Vorderdarm, die sich zum Teil aus einer gemeinsamen Population endodermaler Zellen entwickeln (Deutsch *et al.*, 2001), unter einer gegenseitigen Regulation stehen könnten. Je nach Stärke und Überlappung der Signale werden verschiedene Entwicklungsprogramme angeschaltet. Diese nahe Verwandtschaft erklärt die häufig beobachtete Transdifferenzierung der Zellen dieser beiden Organe (diskutiert von McLin & Zorn, 2003). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass es im Rahmen der angestrebten Diabetes-Therapie durch die Herstellung von transgenen Kaulquappen mit einer Überexpression eines aktivierten *pdx-1* Faktors gelungen ist, Pankreaszellen mit einer Insulin-Produktion aus Hepatocyten zu bilden (Horb *et al.*, 2003). Die zwei verwandten Gene *Xi-X* und *pdx-1* könnten bei der Spezifizierung der entsprechenden Organe und Anschalten der verschiedenen Differenzierungsrichtungen im posterioren Vorderdarm eingehen. Die Expression von *Xi-X* in der Leber und *pdx-1* im Pankreas ist für die phylogenetische Entwicklung und Funktion der Organe im Intestinaltrakt interessant. Spielt vielleicht das Gen *Xi-X*, das vermutlich in den höheren

Vertebraten verloren gegangen ist, eine Rolle für die extrapankreale Lokalisation der endokrinen Zellen in Invertebraten und niedrigeren Vertebraten?

Zusammenfassung/weitere Fragestellungen

Trotz eines hohen Homologiegrads von *Xi-X* und *pdx-1* gibt es viele Hinweise darauf, dass *Xi-X* nicht dem xiphophorinen *pdx-1* Gen entsprechen kann: Während *Xi-X* ein komplexes, differentielles Spleißen mit mindestens 4 verschiedenen Transkripten aufweist, darunter auch ein homöobox-freies Transkript, ist nur ein Transkript von *pdx-1* beschrieben worden. Die Detektion einer zweiten Hybridisierungsbande in Southern Analysen bestätigt die Vermutung von zwei Genen mit einer hohen *pdx-1* Homologie im Genom von *Xiphophorus* (siehe S. 235). Das unterschiedliche Expressionsmuster der beiden Gene ist ein weiteres Indiz der unterschiedlichen Funktionen von *Xi-X* und *pdx-1*; *pdx-1* wird auf einer begrenzten, endodermalen Region (Duodenum, Pankreas) exprimiert während *Xi-X* in einer abweichenden endodermalen Struktur (Leber) zum Ausdruck kommt. Zusätzlich sind *Xi-X*-Transkripte in den Skelettmuskelzellen und Herzen nachweisbar. Zwei verschiedene Leber-Transkripte der gleichen Länge weisen unabhängig voneinander große quantitative Schwankungen auf. Es kann aufgrund der Expressionsanalysen vermutet werden, dass *Xi-X* in der Leber bei den Alimentationsvorgängen beteiligt ist und in Muskelzellen Differenzierungsfunktionen ausübt. Die zwei verwandten Gene, *Xi-X* und *pdx-1*, könnten u.a. bei der Spezifizierung der Leber bzw. des Pankreas und Anschalten der verschiedenen Entwicklungsprogramme im posterioren Vorderdarm beteiligt sein.

In weiteren Untersuchungen könnten die verschiedenen *Xi-X*-Transkripte charakterisiert werden, entweder durch RT-PCR, das Anlegen und Durchmusterung von cDNA-Genbanken oder durch ein RACE-Verfahren. Die Nukleotidsequenzen der *Xi-X* Transkripte in den verschiedenen Organen könnten anschließend bestimmt werden und die Homologien weiterer Regionen des Gens mit anderen, bekannten Genen verglichen werden. Durch *in situ* Hybridisierungen mit geeigneten Subsonden könnten die Expressionsdomänen genauer festgelegt werden, und mit entsprechenden Analysen an Embryonen einer eventuellen Funktion dieser Gene bei der Bildung der Organe nachgegangen werden. Eine weitere interessante Fragestellung wäre die unterschiedliche Regulation der *Xi-X* Transkription und Transkriptreifung in den verschiedenen Organen.

XI-X UND PIGMENTZELLEN

Im Tierreich gibt es eine Vielzahl von Arten, die durch eine besondere Farbpracht gekennzeichnet sind. Obwohl die biochemischen Reaktionswege der Pigmentsynthese weitgehend aufgeklärt sind, ist wenig bekannt, wie die Farbmuster der Tiere entstehen. Bei *Xiphophorus* sind seit vielen Jahrzehnten bestimmte Pigmentzellloci der Platyfische bekannt, die die Tiere mit arts- und populations-spezifischen Pigmentzellmustern versehen (Gordon, 1927; Anders, F., 1967; Anders, A. *et al.*, 1973a,b). Aufgrund der genetisch bedingten, neoplastischen Entartung von Muster-Pigmentzellen in bestimmten interspezifischen Kreuzungen sind die relevanten Pigmentzellloci und die Tumorentstehung ausführlich untersucht worden (siehe Übersichte von Anders, F., 1991 und Meierjohann & Schartl, 2006).

Die in dieser Arbeit isolierte Homöobox *Xi-X* zeigt eine Kopplung von 15 cM mit den platyspezifischen Pigmentzellloci auf dem X-Chromosom von *X. maculatus* (siehe S. 238ff.). Eine gleiche Lokalisation auf den anderen untersuchten Geschlechtschromosomen der Gattung *Xiphophorus*, d.h. das Y-, Z- und W-Chromosom von *X. maculatus* und das X-Chromosom von *X. variatus*, ist aufgrund genetischer Kopplungsanalysen annehmbar. Dieser Abstand ist zu groß, um auf einen direkten funktionellen Zusammenhang von *Xi-X* mit den Pigmentzellloci zu schließen. Durch Expressionsanalysen konnten aber viele Hinweise auf eine differenzierungsbezogene Expression von *Xi-X* in den Pigmentzellen gefunden werden, wobei die Muster-Pigmentzellen sich durch ein spezifisches *Xi-X*-Transkript von den Zellen der Grundfärbung unterscheiden. Die Ergebnisse, die zu dieser Konklusion führen, werden im folgenden Abschnitt skizziert (siehe unten). Eine Erörterung der Zelllinie DRLI, die vermutlich aus Zellen besteht, die als Muster-Pigmentzellen determiniert sind, folgt (siehe S. 281ff.), bevor über die Determination und Differenzierung der Muster-Pigmentzellen bei *Xiphophorus* in bezug auf *Xi-X* diskutiert wird (siehe S. 285ff.).

Eine differenzierungs-bezogene Expression von Xi-X in den Pigmentzellen

Eine differenzierungs-bezogene Expression von *Xi-X* in den Pigmentzellen; Studien der Rückenflossen, Melanom, Peritoneum und Zelllinien

Ein Transkript von 1,5 kb konnte im isolierten, melanösen Gewebe und in der Zelllinie PSM, die aus einem Melanom angelegt worden ist (Wakamatsu, 1981; Wakamatsu *et al.*, 1984), in Northern Analysen mit *Xi-X_B* als Sonde nachgewiesen werden. Dieses spricht für eine *Xi-X*-Expression in Melanomzellen und möglicherweise auch in non-neoplastischen Pigmentzellen der schwarzen Differenzierungsreihe. In den Zelllinien A₂ (Kuhn, C. *et al.*, 1979) und BS_T (Petry, H. *et al.*, 1992), deren Zellen nicht als pigmentöse beschrieben worden sind, waren keine *Xi-X*-Transkripte nachweisbar.

Northern Analysen von Rückenflossen ergaben, je nach Phänotyp, eine oder zwei *Xi-X*-Banden, 1,5 und 2,3 kb entsprechend. Das Transkript von 1,5 kb war in allen Flossen anwesend, mit der Produktion des Transkriptes in Melanocyten bzw. Melanophoren übereinstimmend, da diese Zelltypen in allen untersuchten Flossen vorkommen. Das Transkript von 2,3 kb trat in den Rückenflossen auf, die roten Pigmentzellen besaßen, d.h. bei *X. helleri* und den phänotypisch identischen Rückkreuzungsbastarden ohne ein geerbtes PSPM und bei Bastarden mit den Pigmentzellmustern *DrSd* und *Dr*. In Rückenflossen ohne rote Pigmentzellen, d.h. bei Rückkreuzungsbastarden mit dem Pigmentzellmuster *DySp* (siehe auch unten), fehlte das Transkript. Auch die Schwanzflossen von *X. helleri* zeigten eine Abwesenheit des 2,3 kb Transkriptes; Bereiche, die keine spezifische Färbung und damit keine rote Pigmentzellen besaßen, wurden untersucht. Weil es unwahrscheinlich ist, dass die Rückenflossen innerhalb der Gattung *Xiphophorus* und sogar innerhalb einer Art dieser Gattung Unterschiede im Aufbau aufweisen, wurde die Konklusion gezogen, dass die Erythrophen bzw. Xanthoerythrophen das Transkript von 2,3 kb synthetisieren. Die Interpretation dieser Ergebnisse wird kompliziert, weil Bereiche mit rot pigmentierten Zellen auch große Melanophoren aufweisen. Dieses könnte bedeuten, dass entweder nur die Makromelanophoren oder eventuell sowohl die Erythrophen als auch die

Makromelanophoren ein Syntheseort der 2,3 kb *Xi-X*-Transkripte darstellen (siehe die weitere Diskussion). Zentral für die Beweisführung, dass die Pigmentzellen selbst und nicht andere Zelltypen des Gewebeverbandes der Produktionsort der Transkripte sind, stellen die Zelllinien PSM und DRLI (siehe S. 281ff.) und außerdem isoliertes Melanom dar.

Bei den Rückenflossen von Rückkreuzungsbastarden mit dem Pigmentzellmuster *DySp* ist nur das *Xi-X*-Transkript von 1,5 kb nachweisbar. Diese Flossen besitzen zahlreiche Mikromelanophoren und Xanthophoren und damit kann ausgeschlossen werden, dass diese Differenzierungsstadien der Pigmentzellen das Transkript von 2,3 kb synthetisieren. Von den acht untersuchten *DySp*-Flossen hatten zwei wenige Makromelanophoren-Flecken im basalen Bereich, die für die Analysen dissektiert wurden.

Im Peritoneum konnte ein Transkript von 2,3 kb nachgewiesen werden. Das Peritoneum ist mit Makromelanophoren und Iridophoren dicht besiedelt und außerdem frei von Pterinophoren (Peter, 1985). Untersuchungen dieses Gewebes geben Aufschlüsse darauf, dass auch andere Zellen, als die der roten Differenzierungsreihe ein Transkript von 2,3 kb produzieren müssten. Vermutlich synthetisieren die Makromelanophoren, was auch durch die Analysen der Zelllinie DRLI Unterstützung findet (siehe S. 281ff.), zusätzlich zu den Erythrophoren ein Transkript von 2,3 kb. Es ist nicht auszuschließen, dass auch die Iridophoren ein Produktionsort von *Xi-X*-Transkripten ist. Diese Frage bleibt aufgrund der Analysen dieser Arbeit noch offen.

Die Rückenflossen von den Rückkreuzungsbastarden mit dem Pigmentzellmuster *Dr* haben proximal eine höhere Dichte von roten Pigmentzellen als distal. In einem Experiment wurden diese Flossen in distale und proximale Hälften geteilt und getrennt auf die *Xi-X*-Expression untersucht. Mit der Produktion eines Transkripts von 2,3 kb in den roten Pigmentzellen übereinstimmend, zeigten die proximalen Hälften ein intensiveres Signal der 2,3 kb Transkripte als das entsprechende Signal der distalen Hälften.

Eine Untersuchung von sich regenerierenden Rückenflossen von *X. helleri* und Bastarden mit dem Muster *Dr* geben weitere Information über die *Xi-X*-Expression in Pigmentzellen. Schon nach 2-3 Wochen Regenerationszeit und nur 2-3 mm Regenerat der *Dr*-Flossen sind die beiden *Xi-X*-Transkripte von 1,5 und 2,3 kb in einer hohen Konzentration in dem neu gebildeten Gewebe vorhanden. Zellen sind mikroskopisch zu beobachten, die sehr schwach rot gefärbt sind. Die sich regenerierenden Flossen von *X. helleri* besitzen nicht diese rötlichen Zellen und synthetisieren auch nur sehr geringfügig das Transkript von 1,5 kb, das *Xi-X*-Transkript von 2,3 kb ist nicht nachweisbar. Diese Analysen bestätigen, dass die rot pigmentierten Zellen, bedingt durch den Locus *Dr*, das Transkript von 2,3 kb bilden. Die Vorläuferzellen der Erythrophoren besiedeln die Flossen sehr früh und schon frühe Differenzierungsstadien, was auch durch die Studien der Zellkultur DRLI für diese Pigmentzellen vorgeschlagen werden kann (siehe S. 281ff.), produzieren sowohl das Transkript von 2,3 kb als auch das Transkript von 1,5 kb.

Die Flossen von *X. helleri* und von den PSPM-freien Rückkreuzungsbastarden, die phänotypisch nicht zu unterscheiden sind, zeigen eine viel stärkere Intensität des *Xi-X*-Signals von 1,5 kb als die Intensität des 2,3 kb Signals. Die Flossen von Rückkreuzungsbastarden mit dem PSPM *Dr* haben für beide Transkripte eine vergleichbare, schwache Erscheinung. Hierfür gibt es drei mögliche Erklärungen: Die Konzentration der Mikromelanophoren in Flossen von *X. helleri* und den PSPM-freien

Rückkreuzungsbastarden ist ca. zweifach so hoch wie bei den Flossen von Bastarden mit dem Muster *Dr* und könnte für den Unterschied an Signalintensität der 1,5 kb Transkripte verantwortlich gemacht werden, obwohl der Intensitätsunterschied zwischen den Banden viel größer als der Faktor zwei erscheint. Andererseits könnte die starke Intensität des 1,5 kb Transkriptes mit der hohen Xanthophoren-Konzentration in den Flossen von *X. helleri* und den PSPM-freien Rückkreuzungsbastarden in Zusammenhang gebracht werden. Bei Flossen mit dem Rotfaktor *Dr* sind lichtmikroskopisch keine Xanthophoren zu beobachten. Vermutlich werden die Pigmentzellen der goldenen Differenzierungsreihe in den *Dr*-Flossen durch Xanthoerythrophoren und Erythrophoren vertreten. Die Xanthophoren könnten dementsprechend, zusätzlich zu den Mikromelanocyten und Mikromelanophoren, ein Transkript von 1,5 kb synthetisieren, das bei den rot-pigmentierten Zellen nicht, zumindest nicht in dieser hohen Konzentration, vorhanden ist. Diese Theorie findet mit einem Verlust des 1,5 kb *Xi-X*-Transkriptes in einer retinsäure-induzierten Differenzierung der Zelllinie DRLI überein, die vermutlich aus makrodeterminierten Pigmentzellen besteht (siehe S. 281ff.). Auch eine Expressionsanalyse abgetrennter, rot-fleckiger Bereiche der *X. helleri*-Rückenflossen unterstützt diese differenzierungsbezogene Theorie. Diese isolierten Flossenabschnitte zeigen im Vergleich zu der Gesamtflosse eine deutlich schwächere Intensität der 1,5 kb Transkripte. In den rötlichen Flecken der *X. helleri*-Rückenflossen sind die Xanthophoren mit rot pigmentierten Zellen ersetzt worden, und der Verlust in Banden-Intensität könnte auf die reduzierte Anzahl der Xanthophoren zurückzuführen sein. Eine dritte Erklärung wäre durch die verschiedenen Größen der Melanophoren in den beiden Flossentypen zu suchen. Die Rückenflossen von *X. helleri* besitzen in den roten Flecken sehr große Melanophoren, die als Makromelanophoren zu bezeichnen sind. Die umliegenden Bereiche bestehen aus kleinen Mikromelanophoren. Bei den *Dr*-Flossen nehmen die Melanophoren eine Größe ein, die zwischen den beschriebenen Mikro- und Makromelanophoren liegt. Diese Melanophoren gehören nicht zu den PSPL-bedingten Mustermelanophoren. Man könnte sich vorstellen, dass die Melanophoren der *Dr*-Flossen eine Differenzierung in Richtung Makromelanophoren durchlaufen, und dabei nimmt die Konzentration der 1,5 kb *Xi-X*-Transkripte in den Zellen ab. Auch diese Erklärung findet mit dem differenzierungsbezogenen Verlust des 1,5 kb Transkriptes in Makrodeterminierten Zellen Übereinstimmung.

Ein Vergleich in Signalintensität der 1,5 kb und 2,3 kb *Xi-X*-Banden in Northern Analysen vom Flossengewebe des Phänotyps *DrSd*, benignes bzw. malignes Melanom tragend, konnte die Vermutung unterstützen, dass die makromelanophorendeterminierten Zellen *Xi-X*-Transkripte produzieren. Spektrofotometrische Messungen der 1,5 kb und 2,3 kb Banden in zwei parallelen Analysen ergaben eine verstärkte Bande von 1,5 kb in Flossen mit malignem Melanom, das Verhältnis des 1,5 kb zu 2,3 kb Signals betrug 2,2 bzw. 4,0. Für Flossen mit benignem Melanom konnte im Gegensatz dazu eine verstärkte Bande von 2,3 kb nachgewiesen werden, das Verhältnis des 1,5 kb zu 2,3 kb Signals betrug 0,4 bzw. 0,9. Hiermit wird möglicherweise die von der Bösartigkeit der Tumore abhängige Zelldifferenzierung widerspiegelt: Morphologische Analysen (Vielkind, 1976) haben ergeben, dass das maligne Melanom vorwiegend aus undifferenzierten Stadien besteht, wie Melanoblasten und junge Melanocyten. Diese relativ gesehen undifferenzierten Stadien der malignen Melanomzellen, wie auch für das isolierte, sehr bösartige Melanom und die PSM-Zellen nachgewiesen werden konnte, bilden möglicherweise nur das *Xi-X*-Transkript von 1,5 kb. Beim benignen Melanom ist

das Gleichgewicht in Richtung differenziertere Zellstadien, wie reife Melanocyten und Melanophoren, verschoben, den relativen Verlust an 1,5 kb Transkripte ergebend (siehe auch "Die Zelllinie DRLI", S. 281ff.). Inwieweit diese transformierten Makromelanophoren das 2,3 kb Transkript produzieren, wird in späteren Abschnitten diskutiert (siehe S. 293, S. 295 und S. 296). Bei diesen Analysen muss berücksichtigt werden, dass die Flossen in ihrer Gesamtheit untersucht wurden. Dadurch befinden sich u.a. auch rot pigmentierte Zellen im untersuchten Material, die, wie vermutet werden konnte, Transkripte von 2,3 kb bilden. Beim malignem Melanom nehmen die Melanomzellen einen größeren Teil der Flossen in Besitz, während beim benignem Melanom mehr Platz für die Xanthoerythrophoren vorliegen. Dabei wird die Intensität der Banden auch durch die Konzentration der Pterinophoren beeinflusst.

Weitere Experimente über die *Xi-X*-Aktivität in Pigmentzellen werden in dem folgenden Abschnitt "Die Zelllinie DRLI" diskutiert (siehe S. 281ff.).

Eine embryonale Aktivität einer Reihe von *Hox*-Genen und anderen Homöobox Genen konnte Zellen der Neuralleiste zugeschrieben werden (Zusammenfassung von Murphy & Bartlett, 1993; Narita *et al.*, 2001), aber der Nachweis von nur wenigen Homöobox Genen konnte für die nicht-transformierten Pigmentzellen geführt werden: Studien von *Amphioxus* deuten an, dass das Gen *Xlox*, zu der Klasse auch *Xi-X* gehört, embryonal in einer Region exprimiert wird, wo später die ersten Pigmentflecken gebildet werden (Brooke *et al.*, 1998). Das homöobox-enthaltende Gen *Pax3* reguliert Gene, z.B. *c-ret*, *MITF* und *TRP-1*, die für das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der Melanocyten wichtige Funktionen ausüben (Galibert *et al.*, 1999; Lang *et al.*, 2000; Potterf *et al.*, 2000; Hornyak *et al.*, 2001). *Pax3* wird in humanem Melanom exprimiert und ist für das Überleben der Tumorzellen wichtig (Scholl *et al.*, 2001). Das Gen *Mitf* wird auch durch die zwei Homöobox-enthaltenden Gene *Emx1* und *Emx2* in Melanocyten reguliert (Bordogna *et al.*, 2005). Das Gen *HOXB7* ist in normalen Melanocyten inaktiv, während es in Melanom angeschaltet ist (Carè *et al.*, 1996), und das Gen spielt für die tumor-bedingte Angiogenese eine Schlüsselrolle (Carè *et al.*, 2001). Die Expression einer Reihe *Hox*-Gene und auch des Gens *brn-2* konnte in Melanom gezeigt werden (Smit *et al.*, 2000; Maeda *et al.*, 2005). Wird die Dimerisierung von HOX und PBX durch ein Antagonist in Melanomzellen *in vivo* verhindert, kommt es zu einer Hemmung der Zellteilung und Apoptose wird eingeleitet (Morgan *et al.*, 2007), was die Bedeutung von HOX-Proteinen für die Malignität der Melanocyten verdeutlicht.

Zusammenfassung/weitere Fragestellungen

Aufgrund der oben aufgezeichneten Ergebnisse könnten zusammenfassend folgende Schlüsse vorgeschlagen werden: Das 1,5 kb *Xi-X*-Transkript wird in den Melanomzellen und vermutlich auch in den Mikromelanocyten/Mikromelanophoren und Xantophoren bzw. deren Vorläuferzellen, d.h. in den Mikropigmentzellen, produziert. Die Makromelanophoren und Xanthoerythrophoren/Erythrophoren, den Makropigmentzellen entsprechend, sind durch ein Transkript von 2,3 kb zu charakterisieren. Dieses gilt für Makropigmentzellen unabhängig davon, ob sie von den platyspezifischen Makropigmentzellloci determiniert werden, bei *X. helleri* in der Farbmusterung vorkommen oder im peritonealen Gewebe präsent sind. Das Transkript von 2,3 kb ist in den Mikropigmentzellen nicht nachweisbar. Die Transkripte von 1,5 kb und 2,3 kb

werden wahrscheinlich in frühen Differenzierungsstadien der Makropigmentzellen produziert, das 1,5 kb Transkript verschwindet während der weiteren Differenzierung der Zellen (siehe auch „Die Zelllinie DRLI“, unten).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Flossen für Studien der Pigmentzellen gut geeignet sind. Die Flossen schließen neben Einsichten zur Pigmentzell-Determination, -Proliferation und -Differenzierung und zur neoplastischen Transformation von Melanocyten, Studien der Segmentierung, Kompartimentierung, Regeneration und phylogenetische Entwicklung von Gliedmaßen ein.

In weiteren Experimenten wäre es wichtig, die 1,5 und 2,3 kb Transkripte zu isolieren und charakterisieren. *In situ*-Hybridisierungen mit spezifischen Sonden der jeweiligen Transkripte, bevorzugt an Flossen, würden die Zuordnung der beiden Transkripte zu verschiedenen Differenzierungsstadien der Pigmentzellen ergeben.

Die Zelllinie DRLI

Allgemeine Charakteristika, Differenzierungsinduktion, *Xi-X*-Expression

Die Zelllinie DRLI, die aus einem Hautpräparat eines Weibchens mit der genetischen Konstitution *DrLi/DrLi* angelegt worden ist (Tantithakura, 1990), besteht aus spindelförmigen Zellen mit sporadisch vorkommenden, abgeflachten Zellen, die als fibroblastoide bzw. epitheloide Zellen bezeichnet werden können. Die Zellen bilden Foci. Die Verdopplungszeit der Zellkultur beträgt 48 Stunden. Durch die hohe Affinität der epitheloiden Zellen zum Substrat konnte nach der Trypsinierung und Passagierung eine Subkultur der verbliebenden, abgeflachten Zellen angelegt werden. Diese Subpopulation der Zellen besaß bei einer wieder eintretenden Proliferation eine Morphologie wie die ursprüngliche Zellkultur. Die verschiedenen morphologischen Zellformen sind dementsprechend nicht auf verschiedenen Zelltypen, sondern auf verschiedene Differenzierungsstufen eines Zelltyps, zurückzuführen. Für die epitheloiden Zellen kann aufgrund der sehr langsamen Proliferation dieser Subpopulation der Zellen und durch das oft paarweise Auftreten in der Gesamtkultur nur eine sehr geringe Zellteilungsaktivität angenommen werden. *Xi-X*-Transkripte von 1,5 und 2,3 kb waren in der Zellkultur nachweisbar.

Eine durch das Antibiotikum Gentamycin induzierte Differenzierung führte zu einer Verflachung aller Zellen, was den unizellulären Typ bestätigt. Dieses könnte auch durch einen alkalischen pH-Wert von 8,0 erreicht werden. Eine retinsäure-induzierte Differenzierung ließ die spindelförmigen Zellen verschwinden, und die Zellen nahmen vorwiegend dendritische, einige epitheloide und wenige andere Zellen sichelförmige Gestalten an. Einen geringen Anteil der differenzierungs-induzierten Zellen hatten eine mehrfache Größe der anderen Zellen, und diese Megazellen besaßen mehrere Kerne. Durch die induzierte Differenzierung konnte in dem epitheloiden Zellstadium cytoplasmatische Granula, die häufig den Zellkern umkranzten, beobachtet werden. Für das dendritische Stadium waren diese Granula nur spärlich sichtbar. Ein geringer Anteil der Granula war schwarz pigmentiert. Die retinsäure-induzierte Differenzierung führte zu einem Verlust des *Xi-X* Transkriptes von 1,5 kb, das Transkript von 2,3 kb war noch verstärkt vorhanden. Eine Färbung mit spezifischen Antikörpern, gerichtet gegen humane Melanocyten, fiel für die epitheloiden Zellen positiv aus.

Durch die morphologische Erscheinung von dendritischen Zellformen, das Vorkommen von cytoplasmatischen Granula in den Zellen, die zum Teil schwarz pigmentiert waren, den Nachweis von humanen melanocyten-spezifischen Antigenen zusammen mit den Expressionsergebnissen, gefunden für *Xi-X* in den Flossen, Peritoneum, der Zelllinie PSM und im Melanom (siehe S. 277ff.), kann angenommen werden, dass die Zelllinie aus Pigmentzellen besteht. Das *Xi-X* Transkript von 2,3 kb spricht für Pigmentzellen, die als Makropigmentzellen determiniert sind.

Die gentamycin-induzierte Differenzierung schien, im Gegensatz zu der retinsäure-induzierte Differenzierung (siehe unten), über mehrere Wochen irreversibel zu sein, was auf das erreichte, nur geringfügig teilungsaktive Zellstadium zurückzuführen sein könnte. Dieser differenzierungs-induzierender Effekt von Gentamycin ist, meines Wissens nach, nicht in der Literatur beschrieben worden, aber ein entsprechender Effekt anderer Antibiotika konnte gezeigt werden. Tunicamycin induziert die Differenzierung von Erythrophorom-Zellen des Goldfisches *in vitro* (Matsumoto *et al.*, 1985). Für *Xiphophorus* konnte für Chloramphenicol ein Promotor-Effekt auf die Melanomzellen *in vivo* gezeigt werden, während Actinomycin D keinen Einfluss auf die Melanomzellen ausübte (Anders, A. *et al.*, 1991a,b). Es wurde eine hohe Konzentration des Gentamycins für die Zellkultur DRLI angewendet (1 mg/ml), die sich in einem nahezu toxischen Bereich befindet. Die durch Gentamycin induzierte Differenzierung könnte daher durch die unterdrückte Proliferation verursacht werden. Derselbe Effekt könnte sich für die durch eine alkalische pH-induzierte Differenzierung geltend machen.

Die Zellen der Zelllinie DRLI wurden durch die Zugabe von 10^{-6} M Retinsäure zum Medium zu einer reversiblen Differenzierung induziert. Eine sowohl stimulatorische als auch hemmende Effekt von Retinsäure auf die Proliferation konnte für Melanocyten und Melanomzellen der Säuger nachgewiesen werden (Sherman, 1986; Quevedo & Holstein, 1992). Ein dualistischer Effekt von Retinsäure auf die Proliferation von Melanomzellen konnte auch für *Xiphophorus in vivo* gezeigt werden (Anders, A. *et al.*, 1994a): Je nach genetischem Hintergrund kann Retinsäure, in das Becken verabreicht, die transformierten Melanocyten in das für die Transformation kompetente Zellstadium treiben, und damit zur Malignifizierung des Melanoms beitragen. Alternativ werden die Melanomzellen zu einer terminalen Differenzierung getrieben, und Retinsäure übt damit ein benignifizierender Effekt auf den Tumor aus. Ein Promotor-Effekt einer Reihe anderer Substanzen, wie z.B. cAMP, Phenolbarbital, TPA, DMSO, Testosteron, Cyclamat und Saccharin, konnte bei geeigneten Stämmen von *Xiphophorus* gezeigt werden (Anders, A. *et al.*, 1991a,b). Die stärksten Promotoren zeigten sich auch als die stärksten Regressoren (Anders, A. *et al.*, 1994a). Der Effekt dieser Substanzen auf die Differenzierung der Melanomzellen ist besonders in bezug auf die differenzierungs-bezogene Expression von *Xi-X* in den Pigmentzellen interessant.

Eine Interaktion von Retinsäure mit *Hox*-Genen ist gut dokumentiert. Die Zugabe von Retinsäure zu den humanen EC-Zelllinien führte in allen vier *HOX*-Clustern zu einer temporalen, sequentiellen Aktivierung der Gene in 3'-5'-Richtung (siehe Zusammenfassung Boncinelli *et al.*, 1991). Ein Effekt von Retinsäure auf die Homöobox-Genfunktion scheint für verschiedene Aspekte der embryonalen Musterbildung von Bedeutung zu sein und ist mit homöotischen Transformationen verbunden (Kessel & Gruss, 1991; Huang *et al.*, 1998; Essner *et al.*, 1999; Ross *et al.*,

2000). Auch das Gen *pdx-1*, das Paralog von *Xi-X*, kann durch eine retinsäure-induzierte Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu endodermalen Zellen aktiviert werden (Micallef *et al.*, 2005).

Eine Rolle der 5'- oder 3'-Regionen verschiedener *Hox*-Gene bei der retinsäure-induzierten Genaktivität konnte nachgewiesen und Retinsäure-Responselemente (RARE) in diesen Regionen identifiziert werden (Dupe *et al.*, 1997; Langston *et al.*, 1997). Es wäre interessant, das Gen *Xi-X* bei *Xiphophorus* in bezug auf RARE zu untersuchen, die für die Regulation der *Xi-X*-Transkription verantwortlich sein könnten. Es ist nicht auszuschließen, dass der Einfluss von Retinsäure auf die *Xi-X*-Aktivität indirekt abläuft, eventuell über die Aktivität anderer Homöobox Gene, wie für andere Gene dieser Klasse vermutet werden konnte (Houle *et al.*, 2000). Eine mögliche Bedeutung von *Xi-X* bei der pigmentalen Musterbildung als Teil einer komplexeren Morphogenese ist damit erklärbar.

Zusätzlich zu der Zelllinie DRLI wurden noch zwei weitere Pigment-Zelllinien von *Xiphophorus*, die ihren Ursprung in den melanocytären Zellen finden, auf *Xi-X* Aktivität untersucht; die Zelllinien PSM (Wakamatsu, 1981; Wakamatsu *et al.*, 1984) und FM (Tantithakura, 1990). Die Zelllinie PSM besteht aus Melanomzellen, dem Makromelanophoren-Muster *Sp* abstammend. Die FM-Zellen sind von einer melanösen Region der Haut eines Genotyps *Sd^T* angelegt worden. Die PSM-Zellen weisen von den beiden *Xi-X*-Transkripten in Pigmentzellen nur das Fragment von 1,5 kb auf, bei den FM-Zellen waren keine *Xi-X*-Transkripte nachweisbar. Die Ergebnisse gefunden in dieser Arbeit haben Hinweise darauf ergeben, dass die makromelanophoren-determinierten Zellen schon im Blasten-Stadium *Xi-X*-Transkripte von 2,3 kb produzieren. Es war somit etwas überraschend, dass die Zellen der Zelllinien PSM und FM das Transkript von 2,3 kb nicht bilden. Dieses stimmt übrigens mit dem Ergebnis, gefunden für isoliertes, natives Melanom überein, das ausschließlich das 1,5 kb *Xi-X*-Transkript synthetisiert.

Eine natürliche Erklärung finden diese widersprüchigen Ergebnisse durch die Tatsache, dass die Zelllinie PSM und das native Melanom aus neoplastisch transformierten Zellen bestehen. Das native Melanom war besonders wuchernd und bösartig, und die Zelllinie ist langfristig auf teilungsaktive Zellen selektioniert worden, für die PSM-Zellen wurden Passagen von über 250 verwendet. Die Zellen sind vermutlich deswegen vorwiegend auf Proliferation und weniger auf Differenzierung ausgerichtet. Das *Xi-X*-Transkript von 2,3 kb, das angenommen für die Differenzierung der Makromelanophoren essentiell ist, wird demzufolge nicht gebildet. Das Melanom und die Zelllinie PSM produzieren das Transkript von 1,5 kb, mit einer Funktion dieses Transkriptes in allen Pigmentzellen übereinstimmend. Die fehlenden *Xi-X*-Transkripte in den FM-Zellen könnte entweder mit der Eigenschaft dieser Kultur als eine Mischkultur, nur die Hälfte der Zellen produzieren Melanin (Tantithakura, 1990; Tantithakura *et al.*, 1993), oder ein Artefakt, bedingt durch die Züchtung von Zellkulturen, zusammenhängen. Eine andere Möglichkeit ist, dass das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript in Zusammenhang mit den Genaktivitäten von *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) und *R_{Diff}* oder mit den unterschiedlichen Wachstumseigenschaften der makromelanophoren-determinierten Zellen verschiedener Musterungen gebracht werden könnte, was im nächsten Hauptabschnitt diskutiert wird (siehe S. 285ff.).

Es ist nicht auszuschließen, dass die Zelllinie DRLI aus den erythrophen-determinierten Zellen abstammt. Eine Produktion der 1,5 und 2,3 kb Transkripte in den erythrophen-determinierten Zellen und nur das 1,5 kb Transkript in den makromelanophoren-

determinierten Zellen würde das unterschiedliche Expressionsmuster der Zelllinien DRLI und PSM bzw. Melanom erklären. Dagegen spricht der Nachweis von melanocyten-spezifischen Antigenen der Zelllinie DRLI, eine schwarze Pigmentierung der retinsäure-stimulierten Zellen und die Synthese des 2,3 kb *Xi-X*-Transkriptes im Peritoneum, das keine Pterinophoren enthält (siehe auch unten).

Differenzierungseigenschaften

Eine genaue Festlegung der Zellen der Zelllinie DRLI auf eine bestimmte Differenzierungsrichtung der Pigmentzellen ist nicht gegeben. Farblose Granula, die sowohl bei der schwarzen Differenzierungsreihe in Form von Prämelanosomen in den Melanoblasten (Diehl, 1980) als auch bei der goldenen Differenzierungsreihe in Form von Pterinophoren in den Pterinoblasten und Xanthophoren (Brix, 1986) vorzufinden sind, hilft bei dieser Fragestellung nicht. Nach der retinsäure- und alkalischen pH-induzierten Differenzierung wiesen wenige Zellen eine geringfügige, schwarze Pigmentierung auf, was auf die schwarze Differenzierungsreihe andeutet, aber eventuell auch auf die Kultivierungsbedingungen zurückzuführen sein könnte. Keine Tyrosinase-Aktivität, ein Marker der Melanin-Synthese (Vielkind *et al.*, 1976; Schmidt, H. & Anders, 1989), war in den unstimulierten Zellen *in situ* nachweisbar, was entweder auf die rote Differenzierungsreihe oder auf die frühen S- oder I-Stadien der Melanoblasten hinweist. Die Anwesenheit von humanen, melanocyten-spezifischen Antigenen spricht für die Differenzierungsreihe der Melanophoren, schließt aber nicht eine Kreuzreaktion der Antikörper mit den goldenen Pigmentzellen aus. Die untersuchten Antigene sind evolutionsmäßig gut konserviert und nicht auf eine Kreuzreaktion mit den rot pigmentierten Zellen untersucht worden. Anders *et al.* (1973b) haben aufgrund der nahen Verwandtschaft von Makromelanophoren und Pterinophoren gemeinsame Vorläufer dieser Zellen vorgeschlagen, und damit wäre eine Anknüpfung der DRLI-Zellen zu beiden Differenzierungs-Richtungen verständlich.

Wenn man annimmt, dass die Zelllinie DRLI aus Pigmentzellen der schwarzen Differenzierungsreihe besteht, spricht die fehlende Pigmentierung für Stadien der Melanoblasten oder sehr junge Melanocyten. (Eine Zusammenfassung der differenzierungs-bezogenen Eigenschaften der Melanophoren wird von Anders, F. & Zechel, 1994 gegeben, siehe auch Abb. 3, S. 19). Der *in situ*-Nachweis von Tyrosinase-Aktivität der unstimulierten DRLI-Zellen fiel negativ aus, und daher müssten die Zellen sich vor dem Stadium der DOPA-positiven A-Melanoblasten befinden. Die cytoplasmatischen Granula konnten erst in den epitheloiden Zellstadien nach der induzierten Differenzierung beobachtet werden, und dieses Stadium könnte sich um das I- oder A-Stadium der Melanoblasten befinden. Die Granulierung ist relativ spärlich, was mit einem frühen Blastenstadium Unterstützung findet, da die Prämelanosomen erst in dem A-Melanoblasten-Stadium stark vertreten sind (Diehl, 1980). Bei den epitheloiden Zellen in der unstimulierten Kultur sind keine Granula nachweisbar, was auf frühe Blasten-Stadien, wie die S- oder eventuell I-Melanoblasten spricht. Die S-Melanoblasten sind *in vivo* sessil und ruhen in den Geweben, können sich aber auch reproduzieren oder zu den I-Melanoblasten differenzieren, die sich irreversibel weiter zu den A-Melanoblasten, Melanocyten und Melanophoren differenzieren (Diehl, 1980). Mit der Ausnahme der Melanophoren besitzen alle Differenzierungsstadien eine gewisse

proliferative Aktivität. Vielleicht repräsentieren die epitheloiden Zellen der Zelllinie DRLI die S-Melanoblasten, die sich in einer Homeostasis mit den spindelförmigen, teilungsaktiven S- und I-Melanoblasten befinden, und nach einer retinsäure-induzierten Differenzierung sich zu den A-Melanoblasten und frühen, dendritischen Melanocyten-Stadien differenzieren. Für die Differenzierung der Melanophoren bei *Xiphophorus* ist es hier wichtig hervorzuheben, dass die Makromelanophoren der Platyfische, die in bestimmten, interspezifischen Kreuzungen sich zu einem Melanom entwickeln, sich in ihrem Differenzierungsweg von dem der normalen Melanophoren unterscheiden. Das I-Stadium der Melanoblasten ist das für die neoplastische Transformation kompetente Zellstadium, und die transformierten I-Melanoblasten (*TrI*-Melanoblasten) differenzieren danach zu *TrA*-Melanoblasten, *Tr*-Melanocyten und *Tr*-Melanophoren (Anders, F. *et al.*, 1980; Diehl, 1980). Die DRLI-Zellen, die möglicherweise makromelanophorendeterminiert und vom Locus *Li* bedingt sind, wären denn eventuell in diesem Zusammenhang als transformierte Zellen zu betrachten. Daher beinhaltet die Zelllinie DRLI Zellen, die sich um das kompetente Zellstadium befinden und für Studien der neoplastischen Transformation besonders interessant sind. Die *Xi-X*-Transkription mit einem 2,3 kb makropigmentzell-spezifischen Transkript und einem Verlust des 1,5 kb Transkriptes, möglicherweise bei dem Übergang vom I-Stadium zum *TrI*- und *TrA*-Stadium der Melanoblasten, ist in dieser Hinsicht von äußerstem Interesse.

Zusammenfassung/weitere Fragestellungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine Determination der DRLI-Zellen Makropigmentzellen zu bilden, und sie stehen somit unter dem Einfluss des Pterinophoren-Locus *Dr* bzw. des Makromelanophoren-Locus *Li*. Schon frühe Blastenstadien sind in bezug auf das Gen *Xi-X* differenziert, durch ein Transkript von 2,3 kb zu erkennen, auf ihre Determination Makropigmentzellen zu bilden, und unterscheiden sich somit im Blastenstadium von den Pigmentzellen, die bei der Grundfärbung eingehen (ausschließlich ein 1,5 kb *Xi-X*-Transkript). Die DRLI-Zellen produzieren auch ein Transkript von 1,5 kb, das durch eine retinsäure-induzierte Differenzierung verloren geht. *Xi-X* spielt möglicherweise bei der Determination und Differenzierung der Makropigmentzellen eine wichtige Rolle und mit dieser Zelllinie könnten die molekularen Prozesse, die für die Spezifizierung der Muster-Pigmentzellen ablaufen, erforscht werden.

Die Zelllinie DRLI besteht vermutlich aus Zellen in Differenzierungsstadien, die sich um das für die neoplastische Transformation kompetente I-Stadium der Melanoblasten befinden. Eine Funktion des Gens *Xi-X* bei dem Prozess der neoplastischen Transformation könnte mit dieser Zelllinie erkundet werden.

Determination und Differenzierung der Muster-Pigmentzellen

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit sich ergebenden, morphologischen Beobachtungen der Farbmusterzellen und der nachgewiesenen differenzierungsbezogenen Expression von *Xi-X* in den Pigmentzellen, wobei die Transkripte in den Pigmentzellen des Grundmusters und der spezifischen Farbmusterung sich unterscheiden (siehe S. 277ff.), wird die Determination und Differenzierung der Pigmentzellen von

Xiphophorus in diesem Abschnitt diskutiert. Die beobachtete, kutane Pigmentzell-Differenzierung bei *X. helleri* wird beschrieben und mit der Determination und Differenzierung der besonderen PSP-Loci bedingten Zellen der Platyfische verglichen (siehe unten). Ein Modell wird vorgestellt, wie die Differenzierung der Pigmentzellen in bezug auf *Xi-X* ablaufen könnte (siehe S. 288). Einige Gedanken zu den molekularen Mechanismen der Farbmusterentstehung, mit einem denkbaren Einfluss des Gens *Xi-X* auf die Proliferations- und Differenzierungseigenschaften der Zellen der verschiedenen Pigmentzellmuster und einer eventuellen Interaktion von *Xi-X* mit den Genen *R_{Diff}* und *x-erbB^a* (*Xmrk*) werden festgehalten (siehe S. 292ff.). Zum Schluss werden die Ergebnisse zusammengefasst (siehe S. 298) und weitere Fragestellungen aufgelistet (siehe S. 299).

Vergleich der Farbmusterungen von *X. helleri* und *X. maculatus*

Bei *X. helleri* hebt sich neben dem farbreichen Schwert der Männchen, auf dem es in dieser Arbeit nicht eingegangen wird, die rote Seitenlinie und Flecken der dorsalen Flosse von der Grundfärbung hervor. Eine mikroskopische Betrachtung der Rückenflossen lässt ein lokales Differenzierungssignal in der Mitte der rötlichen Pigmentflecken vermuten, das an Konzentration nach außen abnimmt (siehe Abb. 66, S. 191): Man kann eine zunehmende Differenzierung von den Xanthophoren der Grundfärbung über größere, intensiv gefärbte Xanthophoren des Fleckenrandes, Xanthoerythrophoren bis zu den end-differenzierten Erythrophoren in der Mitte beobachten. Auch die Melanophoren nehmen zur Mitte des Pigmentfleckes an Größe zu. Nach diesen Beobachtungen kann vermutet werden, dass lokale, differenzierungsfördernde Faktoren für die Bildung der Pigmentflecken in der Rückenflosse verantwortlich sind. Diese Faktoren sind sowohl für Zellen der goldenen, als auch der schwarzen Differenzierungsreihe der Pigmentzellen zuständig, wobei sie für die Melanophoren nur die Größe betreffen. Der Grad der Differenzierung hängt von der Konzentration der Faktoren ab.

Es stellt sich die Frage, ob nur bestimmte Pigmentzellen auf die Differenzierungssignale ansprechen können oder ob alle Zellen, die dem Differenzierungssignal ausgesetzt sind, zu einer Differenzierung induziert werden. Für die Melanophoren konnte bei *X. helleri* zusätzlich zu den großen Zellen im Fleckeninneren auch wenige Mikromelanophoren beobachtet werden. Dieses spricht eventuell für zwei Typen Melanocyten, wobei die eine Gruppe determiniert ist, auf das Differenzierungssignal zu antworten, während die andere Gruppe sich unempfindlich verhält. Mehrere Gruppen Melanocyten sind für Zebrafisch beschrieben worden, die unter unterschiedlichen genetischen Kontrollen stehen (Mellgren & Johnson, 2002). Eine ähnliche Komplexität ist für die Melanocyten der Säuger nicht beobachtet worden, was auf Gen-Duplikationen mit anschließender Spezifizierung der Genfunktionen bei den Teleosten zurückgeführt wird (Braasch *et al.*, 2006, 2007). Für die xiphophorinen Pterinophoren scheint es, inwieweit dieses rein mikroskopisch betrachtet werden kann, als ob keine Xanthophoren im Fleckeninneren vorhanden sind, wenn rot pigmentierten Zellen vorkommen. Dieses deutet auf keine spezifische Determination der Erythrophoren hin, sondern ausschließlich auf eine Korrelation des Differenzierungsstadiums mit der Anwesenheit eines Differenzierungssignals, wobei alle Zellen, die diesem Signal ausgesetzt sind, auf das Signal antworten.

Es steht noch offen, was zu der Produktion von lokalen differenzierungs-fördernden Faktoren in der Rückenflosse von *X. helleri* führt. Man kann auffallend häufig einen Fleck in einer Region nah an der Flossenstrahl-Vergabelung beobachten, so dass es denkbar ist, dass dieser Prozess der Vergabelung eine Einwirkung auf die Pigmentzell-Differenzierung hat bzw. die Vergabelung und die Fleckenbildung stehen unter der Regulation gemeinsamer Faktoren. Bei vollständig regenerierten Flossen von *X. helleri* kann das gleiche Farbmuster wie bei den ursprünglichen Flossen beobachtet werden, was auch für den Zebrafisch beschrieben worden ist (Rawls & Johnson, 2000). Das Fleckenmuster wird anscheinend durch die Flossen-Topographie bestimmt. Der posteriore Bereich der xiphophorinen Flossen haben einen größeren Anteil an Makromelanophoren und am dorsalen Rand der Rückenflossen bestehen die Flecken nur aus Makromelanophoren. Eine unterschiedliche anterior-posteriore und dorso-ventrale Regulation der Melanophoren- und Pterinophoren-Differenzierung ist damit festzustellen. Für *X. helleri* können die Pigmentflecken und die Seitenlinie eine leicht braune, vor allem bei Jungtieren und Weibchen, bis eine stark rote Farbe bei fortpflanzungsfähigen Männchen annehmen. Anscheinend stehen die Pigmentzellen unter Hormoneinfluss, wobei das männliche Hormon Testosteron bei *X. helleri* bevorzugt die Enddifferenzierung der goldenen Pigmentzellen zu Erythrophen fördert. Ein differenzierungs-induzierender Effekt von Geschlechtshormonen konnte für *Xiphophorus in vivo* gezeigt werden: Verschiedene Derivate von Testosteron und Östrogen, in das Becken verabreicht, führen zu einer Differenzierung der transformierten Melanocyten der melanomtragenden Fische (Anders, A. *et al.*, 1991b).

Für die Platyfische ist bekannt, dass die Makromelanophoren- und Pterinophoren-Loci für die spezifische Farbmusterung der verschiedenen Arten, Rassen und Populationen und somit für die Determination der Muster-Chromatophoren eine Voraussetzung sind (Anders, A. *et al.*, 1973a,b). Anders, F. *et al.* (1972) schlugen vor, dass der Makromelanophoren-Locus *Sd* spätestens im frühen Melanocytenstadium determinierend eingreift, später wurde die neoplastische Transformation der Makromelanophoren zum I-Stadium der Blasten festgelegt (Diehl, 1980). Diese vorgeschlagene, frühe Determination der Makromelanophoren findet mit der Determination der Zellen der DRLI-Zelllinie, durch das *Xi-X*-Transkript von 2,3 kb erkennbar, schon im Blastenstadium Makropigmentzellen zu bilden einklang (siehe S. 281ff.). Auch die sich regenerierenden Flossen des Phänotyps *Dr* zeigen in bezug auf *Xi-X* eine frühe Determination, Pterinophoren zu bilden (siehe S. 278). Die Determination der Muster-Pigmentzellen bei den Platyfischen unterscheidet sich somit von der lokal induzierten Differenzierung dieser Zellen in den Rückenflossen von *X. helleri*.

Es ist noch unklar, inwieweit *X. helleri* Pigmentzellloci besitzt, die mit den Makromelanophoren- und Pterinophoren-Loci der Platyfische homolog und für die Differenzierung zu Makropigmentzellen verantwortlich sind. Die Schwerträger haben die Fähigkeit ähnliche Pigmentzellmuster wie die Platyfische zu produzieren, z.B. weist die Population *X. helleri Db* ("dabbed") ein Muster von schwarzen Flecken auf der Körperseite auf. Das Muster *Db* von *X. helleri* ist dem Muster *Sp* von *X. maculatus* ähnlich, die entsprechenden Pigmentzell-Loci sind aber nicht auf homologen Chromosomenpaaren lokalisiert (Wolf & Anders, 1975). Die Pigmentzellloci von *X. helleri* stehen anscheinend unter einer viel strengeren Expressionskontrolle, als für die spezifischen Loci von *X. maculatus* der Fall ist; eine maligne Entartung der Melanocyten

von *X. helleri* ist nicht beschrieben worden (Anders, F. *et al.*, 1984). Vermutlich beruht ein wichtiger Unterschied der Pigmentzellloci der beiden *Xiphophorus*-Arten auf die Abwesenheit des Onkogens *x-erbB*^{*a} (*Xmrk*) in *X. helleri*, das mit dem Makromelanophoren-Locus in *X. maculatus* eng verknüpft ist (Zechel *et al.*, 1988).

Modell zur Differenzierung und *Xi-X*-Transkription

Ein Modell zur Differenzierung der Pigmentzellen in bezug auf *Xi-X* kann aufgestellt werden. Die Ergebnisse sprechen für die Möglichkeit von verschiedenen Wegen, die Bildung von spezifischen Pigmentzellmustern zu stimulieren (siehe Abb. 85, S. 290; Abb. 86, S. 291): Die eine Möglichkeit ist, dass die Musterfarbzellen schon im Blastenstadium determiniert werden und früh eine Differenzierung zu Makropigmentzellen einschlagen, was z.B. für die PSPL-bedingten Zellen der Platyfische zutreffen könnte (Weg B). Diese Zellen produzieren schon ab dem Blastenstadium bis zu den ausdifferenzierten Erythrophoren bzw. Makromelanophoren 2,3 kb *Xi-X* Transkripte; die *Xi-X*-Transkripte von 1,5 kb werden nur in den Blastenstadien synthetisiert. Die Zellen der Grundfärbung, die Xanthophoren und Mikromelanophoren, produzieren in *X. helleri* und *X. maculatus* vermutlich in allen Stadien nur das Transkript von 1,5 kb (Weg A). Ein anderer Syntheseweg der Xanthoerythrophoren/Erythrophoren und Makromelanophoren ist von den PSP-Loci unabhängig und die Zellen könnten, z.B. durch lokale Signale, zu einer weiteren Differenzierung induziert werden, ein Mechanismus, der vermutlich bei der Bildung von roten Flecken in den Rückenflossen von *X. helleri* zutrifft. Diese Farbmusterzellen produzieren auch das *Xi-X*-Transkript von 2,3 kb. Es muss in Frage gestellt werden, ob Pigmentzellmuster, die nicht von den PSP-Loci abhängen, durch spezifische Differenzierungssignale von Zellen des Grundmusters abstammen und später das 2,3 kb *Xi-X* Transkript erwerben (Weg C), oder als determinierte Vorläuferzellen mit einem 2,3 kb *Xi-X*-Transkript in den Geweben vorliegen.

Es verbleibt unbeantwortet, ob die erythrophoren-determinierten (Ed) Zellen von *Xiphophorus* ein Differenzierungsstadium über Xanthophoren durchlaufen. Wenn das der Fall wäre, fragt sich, ob die Ed-Xanthophoren die *Xi-X*-Transkripte von 1,5 und 2,3 kb synthetisieren, die für die Xanthophoren der Grundfärbung bzw. Erythrophoren charakteristisch sind. Wolf & Anders (1975) beschreiben eine Entwicklungsfolge der Erythrophoren, die das Stadium der Xanthophoren zurücklegen. In den Xanthophoren besteht ein gelber Tropfen in der Zellmitte und die Pterinosomen liegen unpigmentiert am Rand vor. In den Xanthoerythrophoren und Erythrophoren sind diese Organellen mit roten Pigmenten gefüllt. In den Xanthoerythrophoren besteht noch der zentrale gelbe Tropfen, der in den Erythrophoren nicht beobachtet werden kann. Brix (1986) konnte auch durch elektronenmikroskopische Studien der Pterinosomen diese Entwicklungsfolge feststellen. Eine genauere Betrachtung der Pigmentflecken in den Rückenflossen von *X. helleri* zeigt auch deutlich eine zunehmende Differenzierung bis zur Fleckenmitte hin, die von den kleinen Xanthophoren der Grundfärbung über größere, intensiv gelb gefärbte Xanthophoren am Rand bis zu den Xanthoerythrophoren und Erythrophoren der Mitte reichen (siehe auch S. 286). Die Beobachtungen der sich regenerierenden *Dr*-Flossen dieser Arbeit, mit einer schwach roten Pigmentierung schon in frühen Stadien der Entwicklung von den Pterinophoren, ohne, dass eine gelbe Vakuole beobachtet werden kann, spricht für die andere Möglichkeit mit einer frühen Determination und

DISKUSSION

Differenzierung der rot pigmentierten Farbzellen, die nicht über das Stadium der Xanthophoren laufen. In der Literatur werden für andere Tierarten die Xanthophoren und Erythrophoren in ihrer Erwähnung kaum getrennt und eine Entwicklungsfolge der phänotypisch unterschiedlichen Pterinophoren selten diskutiert. Eine Ausnahme stellt die Arbeit von Ichikawa *et al.* (1998), die sich mit der Frage beschäftigte, ob die Erythrophoren in der braunen Haut des Frosches *Rana ornativentris* aus Xanthophoren entstehen. Ihre Ergebnisse durch morphologische Vergleiche der Differenzierung und Migration der Zellen schlagen vor, dass eine Erythrophore nicht einer transformierten Xanthophore entspricht. Die Vermutung, gefunden für die goldenen Zellen bei *Xiphophorus* in Respekt auf *Xi-X*, dass Erythrophoren sich früh in der Entwicklung von der der Xanthophoren trennen kann, wird damit unterstützt.

Der PSP-Locus *Ye* bedingt eine schwache Gelbfärbung der Rückenflossen von *X. variatus*. Bei verpflanzungsfähigen Männchen können die Rückenflossen von Xanthophoren intensiv gelb gefärbt werden. Da diese Zellen von einem PSP-Locus determiniert werden, wäre es sehr interessant, ob diese gelb pigmentierten Zellen, wie die PSPL-bedingten Zellen der spezifischen, roten Farbmustern, auch das 2,3 kb *Xi-X* Transkript produzieren. Sie würden sich dann in dieser Hinsicht von den Xanthophoren der Grundfärbung mit nur einem 1,5 kb Transkript unterscheiden. Vielleicht könnte ein Vergleich der schwach pigmentierten Flossen der Weibchen und Jungtiere mit der stark gelb pigmentierten Flossen der Männchen eine eventuelle geschlechtshormon-induzierte Produktion der 2,3 kb *Xi-X*-Transkripte enthüllen?

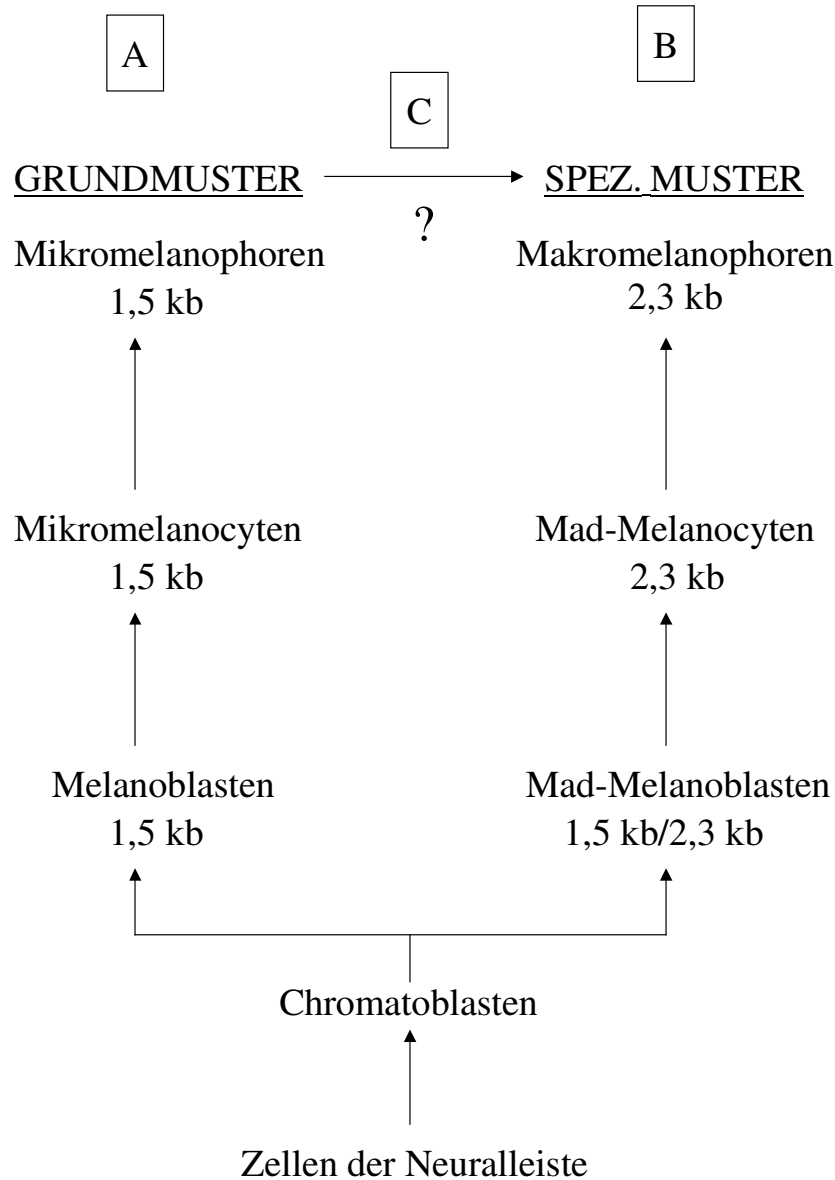


Abb. 85

Ein Modell zur Synthese der *Xi-X*-Transkripte von 1,5 und 2,3 kb in den Pigmentzellen der schwarzen Differenzierungsreihe.

Die Melanophoren, die bei dem Grundmuster eingehen (A), laufen unabhängig von dem Makromelanophoren-Locus und dem Gen *R_{Diff}*. Das spezifische Muster der Platyfische (B) ist vom Makromelanophoren-Locus abhängig, in einigen Musterungen (*Sd* und *Sp*) auch vom Gen *R_{Diff}*. Es muss in Frage gestellt werden, ob Pigmentzellmuster, die nicht von den PSP-Loci abhängen (wie bei den Schwerträgern) von Zellen des Grundmusters abstammen und später das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript erwerben (C), oder, wie bei den PSPL-bedingten Zellen, als determinierte Vorläuferzellen mit einem 2,3 kb *Xi-X*-Transkript in den Geweben vorliegen (B).

Mad=Makromelanophoren-determiniert

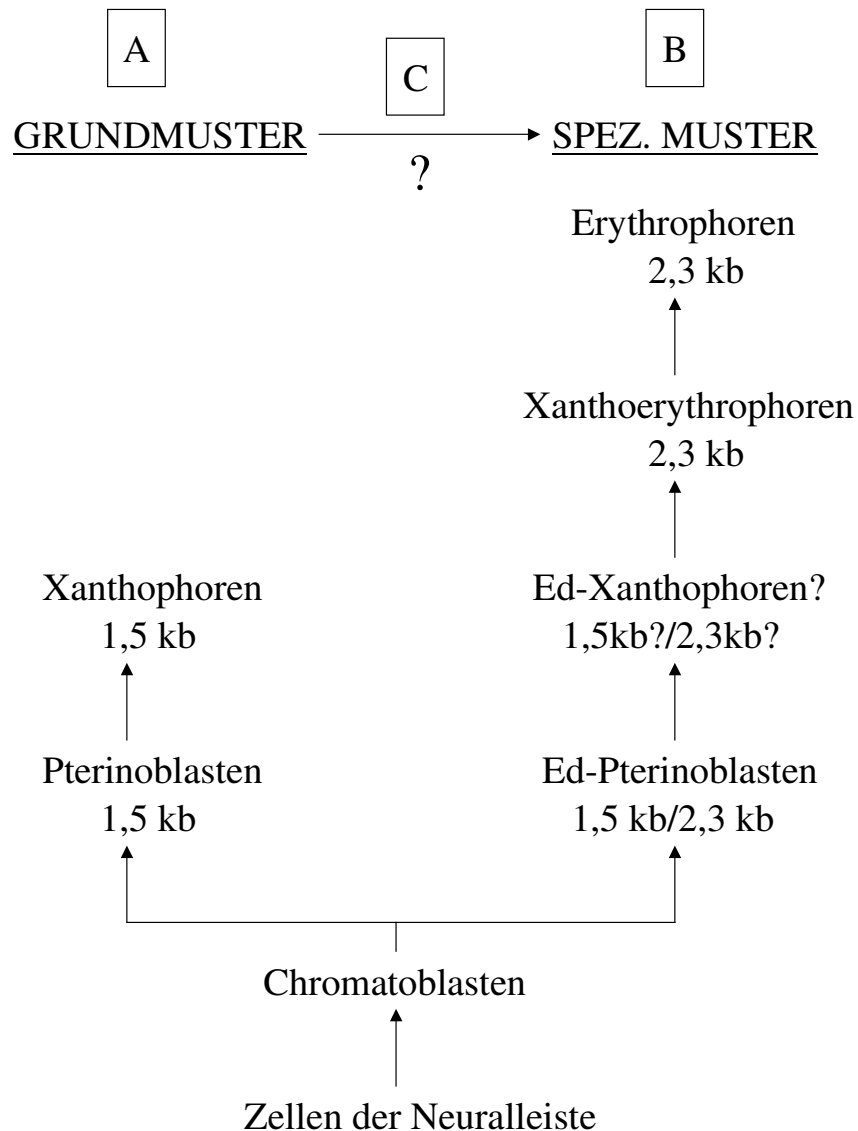


Abb. 86

Ein Modell zur Synthese der *Xi-X*-Transkripte von 1,5 und 2,3 kb in den Pigmentzellen der goldenen Differenzierungsreihe.

Die Xanthophoren, die bei dem Grundmuster eingehen (A), laufen unabhängig von dem Pterinophoren-Locus. Das spezifische Muster der Platyfische ist von diesem Locus abhängig (B). Es muss in Frage gestellt werden, ob goldene Pigmentzellmuster, die nicht vom Pterinophoren-Locus bedingt sind, eventuell durch spezifische Differenzierungssignale von Zellen des Grundmusters abstammen und später das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript erwerben (C), oder als determinierte Vorläuferzellen mit einem 2,3 kb *Xi-X*-Transkript in den Geweben vorliegen (B).

Es verbleibt unbeantwortet (siehe Text, S. 288-289), ob die Ed-Zellen über einem Differenzierungsstadium der Xanthophoren, mit einem 1,5 kb und/oder einem 2,3 kb Transkript, durchlaufen (B) und ob die Xanthophoren, bedingt vom PSP-Locus *Ye*, die beiden *Xi-X*-Transkripte produzieren (nicht in der Abbildung berücksichtigt).

Ed=Erythrophen-determiniert

Molekulare Mechanismen der Farbmusterentstehung

Mögliche Funktionen von *Xi-X*

Um nach einer Funktion von *Xi-X* zu suchen, müsste man sich fragen, was eine spezifische Farbmusterzelle, eine Makropigmentzelle, von einer Zelle der Grundfärbung unterscheidet:

Für die Ausbildung eines Musters müsste die Lokalisation im Körper von den Zellen festgestellt werden. *Xi-X* könnte bei der Interpretation der lokalen Signale eingehen, entweder schon vor bzw. während der Migration oder in den Zielgeweben. Dieses Wahrnehmen der Lokalisation und die regulatorische Funktion von *Xi-X* findet möglicherweise in Interaktion mit anderen Homöobox Genen statt.

Die Makromelanophoren unterscheiden sich von den Mikromelanophoren vor allem an die Größe. Die Zellen beinhalten mehrere Kerne und *Xi-X* könnte mit der Unterdrückung der mitotischen Zellteilung einhergehen. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die Skelettmuskelzellen auch ein 2,3 kb *Xi-X* Transkript aufweisen (siehe S. 268ff.), obwohl nicht nachgegangen wurde, ob die beiden Transkripte identisch sind. Auch die Muskelzellen sind groß und besitzen mehrere Zellkerne. Eine Rolle eines Homöobox-Gens, *HoxA11*, in der Differenzierung von den einkernigen Cytotrophoblasten zu den mehrkernigen Syncytiotrophoblasten wird vermutet (Zhang, Y.M. *et al.*, 2002).

Eine andere gemeinsame Charakteristik von Melanocyten und Muskelzellen ist, dass sie kontraktile Fähigkeiten besitzen. Die Pigmentzellen können, zusätzlich zu der Dendritenbildung, die Position ihrer pigmentbeladenen Melanosomen bzw. Pterinosomen in den Zellen verändern und dadurch das Farbmuster bzw. die Farbprägung der Fische regulieren. *Xi-X* könnte eine Funktion vermitteln, die mit diesen kontrahierenden Eigenschaften in Verbindung steht.

Bei den Erythrophoren könnte *Xi-X* zusätzlich zu dem Größengewinn die Pterinosomen-Entwicklung und Pigmentbildung beeinflussen.

Eine Möglichkeit ist, dass die Makromelanophoren- und Pterinophoren-Loci die Farbzellen mit Rezeptoren versorgen, die unter einer kompartimentalen Regulation stehen. Eine denkbare Funktion von *Xi-X*, als ein Homöobox Gen, könnte die kompartimentale Entstehung dieser rezeptor-beladenen Zellen betreffen (siehe auch S. 297). Zwei verwandte Tyrosin Kinase Rezeptoren, kodiert von den Genen *kit* und *fms*, und der Endothelin-Rezeptor *ednrb1* spielen bei *D. rerio* eine Rolle in der Bildung von Pigmentzellmustern (Zusammenfassung von Parichy, 2006).

Auch im xiphophorinen System konnte ein modifizierter Tyrosin Kinase Rezeptor, vom Gen *erbB^{*a}* (*Xmrk*) kodiert und durch eine Translokation vom Gen *erbB^{*i}* (*EGFR*) entstanden, in den transformierten Makromelanophoren festgestellt werden (Zechel *et al.*, 1988; Wittbrodt *et al.*, 1989; Adam *et al.*, 1993). Das Gen ist an den PSP-Loci lokalisiert und der Rezeptor triggert eine konstitutive mitogene Signalisierung in Melanomzellen (Wellbrock *et al.*, 1999; Wellbrock & Schartl, 2000). Spekulativ könnte das Protoonkogen *erbB^{*i}* (*EGFR*) für die Pigmentzellen des Grundmusters und/oder die gut regulierte, spezifische Musterung von *X. maculatus* und *X. helleri* verantwortlich sein. Das Gen ist im Genom aller xiphophorinen Arten präsent und dicht an die PSP-Loci der Platyfische lokalisiert (Schartl, 1990). Gomez *et al.* (2001) berichten von keinen neoplastischen Eigenschaften des Gens, aber eine Aktivität in verschiedenen Melanomen und anderen Malignomen konnte von Zechel *et al.* (1992a) festgestellt werden. Das Gen

*erbB^{*i}* (*EGFR*) wird außer in den Kiemen und im Melanom auch schwach in der Haut und in den Flossen exprimiert (Peters, 1990; Adam *et al.*, 1991; Zechel *et al.*, 1992b), Gewebe mit Pigmentzellen und einer nachgewiesenen *Xi-X*-Expression. Woolcock *et al.*, (2006) schlagen vor, dass *erbB^{*i}* (*EGFR*) ein Bestandteil des Makromelanophorenlocus sein könnte und an der Bildung der Makromelanophoren beteiligt. Mutanten dieses Gens zeigen ein mutiertes Pigmentzellmuster (Gutbrod & Schartl, 1999; Schartl *et al.*, 1999). Eine Interaktion von *Xi-X* mit dem Gen *erbB^{*i}* (*EGFR*) anhand der *Xi-X*-Transkripte von 1,5 kb und 2,3 kb könnte daher für die Grundmusterung bzw. spezifische Farbmusterung möglich sein. Eine geänderte Interaktion von *Xi-X* mit dem Gen *erbB^{*a}* (*Xmrk*) könnte bei der unkontrollierten Proliferation der Melanocyten mitwirken (siehe auch S. 296).

Eine Beteiligung von homöobox-enhaltenden Genen bei der Entstehung von Pigmentzellmustern wurde auch von Quevedo & Holstein (1992) für die Säuger vorgeschlagen. Sie fundierten ihre Theorie durch Arbeiten mit der weißen Fleckenbildung bei Mäusen, inzwischen hat man 10 Gene charakterisieren und zusätzlich 15 Genloci identifizieren können, die hierfür verantwortlich sind (Baxter *et al.*, 2004). Die weiße Fleckenbildung betrifft Gene, die die Proliferation, das Überleben, die Migration, die Invasion in die Haut, den Eintritt in die Haarfollikel und die Erneuerung der Stammzellen der Melanocyten regulieren. Bei den Menschen ist das Homöobox Gen *Pax-3* Gen für bestimmte Untertypen des Waardenburg Syndroms verantwortlich, das u.a. durch eine weiße Stirnlocke und eine abnormale Pigmentierung der Augen und der Haut gekennzeichnet wird (Tassabehji *et al.*, 1992; DeStefano *et al.*, 1998).

Ist die Synthese des 2,3 kb Xi-X-Transkriptes in den Musterungen Sd und Sp vom Gen R_{Diff} abhängig?

Die Synthese des 2,3 kb *Xi-X*-Transkriptes in den vermuteten makropigmentzell-determinierten DRLI-Zellen steht in Kontrast zu der Abwesenheit des Transkriptes in den melanösen Zelllinien PSM und FM und im nativen Melanom, den Mustern *Sp*, *Sd^T* bzw. *Sd* abstammend (siehe auch S. 283). Ein Aspekt der Melanomzellen ist, dass sie keine oder nur eine Kopie des Gens *R_{Diff}* besitzen. Das Gen *R_{Diff}* wurde aufgrund der biologischen, morphologischen und biochemischen Daten Funktionen bei der Differenzierung der Makromelanophoren zugeschrieben (Vielkind, 1976; Anders & Anders, 1978). Die Teilungsrate der transformierten, makromelanophoren-determinierten Zellen und damit die Malignität der Melanome, korreliert in einer inversen Beziehung zu der Dosis des Gens *R_{Diff}* und der Differenzierung der Zellen. Auch für das Gen *Xi-X* konnte durch die spezifische Synthese des 2,3 kb Transkriptes in makromelanophoren/erythrophoren-determinierten Zellen, im Gegensatz zu den Pigmentzellen der Grundfärbung, eine Rolle bei der Differenzierung dieser Muster-Pigmentzellen vorgeschlagen werden. Somit ist es denkbar, dass eine Interaktion, direkt oder indirekt, zwischen den beiden Genen *R_{Diff}* und *Xi-X* bzw. deren Genprodukten stattfinden könnte. Der Reaktionsablauf der Gen-Aktivitäten von *R_{Diff}* und *Xi-X* in den Makromelanophoren ist gegeben; die Aktivität des Gens *R_{Diff}* ist für die Synthese des 2,3 kb *Xi-X*-Transkriptes erforderlich. Die makropigmentzell-determinierten Zellen mit zwei *R_{Diff}*-Kopien könnten, vielleicht mit Hilfe des 2,3 kb *Xi-X*-Transkriptes, sich ihrer Determination entsprechend differenzieren. Bei den Melanomzellen, die keine (wie für die untersuchten Zellen zutrifft) oder nur eine Kopie des Gens *R_{Diff}* besitzen, kann das *Xi-X*-Transkript von 2,3 kb nicht oder nur geringfügig synthetisiert werden, und die

Differenzierung zu Makromelanophoren findet sehr verzögert statt, sie verbleiben in den proliferativen Zellstadien.

Die proliferative Regulation der Makromelanophoren sind nicht für alle Farbmuster vom Gen R_{Diff} abhängig. Die Makromelanophoren-Musterungen Sp , Sd , Li , Sr und Pu wurden durch klassische genetische Kreuzungsexperimente auf ihre Regulation untersucht (Anders, A. *et al.*, 1973a): Die Loci Sd und Sp von *X. maculatus* werden von mehreren Genen reguliert, die über viele Chromosomen verteilt sind. Das Gen R_{Diff} auf einem autosomalen Chromosom übt hier eine übergeordnete Rolle aus. Andere Makromelanophoren-Loci der Platyfische besitzen Regulationsgene, die an Zahl gering und vorwiegend auf demselben Chromosom wie die Makromelanophoren-Loci lokalisiert sind, wie für die Loci Li und Pu von *X. variatus* und Sr von *X. maculatus* nachgewiesen werden konnte. Diese Loci sind von einem autosomalen Gen R_{Diff} , auf entsprechender Art wie die Musterungen Sd und Sp , unabhängig. Diese in der Proliferation R_{Diff} -unabhängigen Makromelanophoren bestimmter Musterungen produzieren in den Rückkreuzungsbastarden spontan keine malignen Melanome. Die Unabhängigkeit der Differenzierung und Proliferation der Li -bedingten Zellen vom Gen R_{Diff} , wie auch für die Makromelanophoren des Peritoneums und der *X. helleri*-Flecken zutrifft, könnte mit der Produktion des 2,3 kb Xi - X -Transkriptes in diesen Zellen in Zusammenhang gebracht werden. Womöglich spiegelt das 2,3 kb Xi - X -Transkript die unterschiedliche Regulation der Makromelanophoren-Differenzierung bzw. -Proliferation in R_{Diff} -abhängigen und R_{Diff} -unabhängigen Zellen wider: In den R_{Diff} -abhängigen Zellen (Sd , Sp) ist R_{Diff} eventuell für die Synthese des 2,3 kb Transkriptes erforderlich, die R_{Diff} -unabhängigen Makromelanophoren (Li , Peritoneum, *X. helleri*) produzieren immer das 2,3 kb Transkript. Die Frage stellt sich, ob Platyfische des Genotyps Sd/Sd mit zwei Kopien von R_{Diff} im Genom das 2,3 kb Xi - X -Transkript synthetisieren, oder ob grundlegend unterschiedliche, regulatorische Systeme der verschiedenen Pigmentzellmuster bestehen. Ebenso ist die Frage interessant, ob das 2,3 kb Xi - X Transkript auch in anderen R_{Diff} -unabhängigen Makromelanophoren-Musterungen (Pu , Sr , Ni , Ni^e) produziert wird. Diese offenen Fragen müssten durch weitere Analysen beantwortet werden.

Die Dr -determinierten Erythrophoren zeigen in Bastarden und Rückkreuzungsbastarden mit *X. helleri* eine erweiterte Ausbreitung und intensiviertere Farbe. Diese erhöhte Pterinophoren-Differenzierung entsteht entweder durch den Gewinn von farbintensivierenden Substanzen von *X. helleri* oder durch einen Wegfall von Inhibitoren, die in *X. maculatus* vorhanden sind. Es ist ungewiss, ob das Gen R_{Diff} eine Rolle als Inhibitor der Erythrophoren-Differenzierung spielt. Jedenfalls steht diese Hemmung nicht in einer Dosis-Abhängigkeit vom Gen. Die Erythrophoren produzieren möglicherweise ein 2,3 kb Xi - X -Transkript, wie für die R_{Diff} -unabhängigen Makromelanophoren vermutet, weil die Differenzierung auf jeden Fall ohne das Gen R_{Diff} abläuft.

Wie durch die Entwicklung von Melanomen in Kreuzungsprodukten von *X. maculatus* und *X. helleri* zu schließen ist, besitzt *X. helleri* nicht das Gen R_{Diff} , das dem Gen R_{Diff} von *X. maculatus* entspricht. Bei *X. helleri* müsste der Differenzierungsweg von Makromelanophoren, auch in Peritoneum, unabhängig vom Gen R_{Diff} laufen. Trotzdem müssten die Schwertträger einen Faktor mit ähnlichen, differenzierungs-fördernden Eigenschaften aufweisen: Experimente mit malignem Melanom, transplantiert in Embryonen von *X. helleri*, haben gezeigt, dass *X. helleri* auch über einen diffusierbaren Gewebefaktor verfügt, der die auswandernden transformierten Melanocyten zu einer

Differenzierung induzieren kann. Dieser Faktor unterscheidet sich in dieser Hinsicht funktionell nicht vom Faktor DIFF der Platyfische (Schartl *et al.*, 1981).

Inwieweit der DIFF-Faktor von *X. maculatus* und der nachgewiesene differenzierungs-induzierender Faktor von *X. helleri* mit dem Gen *Xi-X* eine Interaktion eingehen, direkt oder indirekt, bleibt weitere Analysen überlassen.

Ist das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript mit spezifischen Eigenschaften der Makropigmentzellen in den verschiedenen Farbmusterungen verbunden?

Ein Grund der unterschiedlichen Expression der 2,3 kb *Xi-X* Transkripte in den Zellen determiniert von den Makromelanophoren-Loci *Sd* und *Sp* (ohne das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript) bzw. *Li* (mit einem 2,3 kb *Xi-X*-Transkript) könnte an den verschiedenen Mustertypen selbst liegen. Die *Sd*- und *Sp*-Musterungen bestehen aus kleinen Flecken, die in der Rückenflosse bzw. auf der Körperseite lokalisiert sind und zufällig in diesen Körperkompartimenten verteilt sind. Das Muster *Li* dagegen besteht aus Linien, die sich, in der Lokalisation streng reguliert, entlang der Seitenlinie des Körpers erstreckt. Hierfür könnte grundsätzlich unterschiedliche regulatorische Systeme beteiligt sein. Dagegen spricht, dass die Flecken der *X. helleri*-Flossen auch ein 2,3 kb *Xi-X* produzieren, obwohl die Lokalisation dieser Flecken in Vergleich zu der Lokalisation der Flecken der Platyfische, relativ streng reguliert zu sein scheint.

Eine andere mögliche, für die zelluläre Entartung sehr interessante Funktion von *Xi-X* kann durch die unterschiedlichen Proliferationseigenschaften der Zellen verschiedener Makropigmentzellmuster vorgeschlagen werden. Für die Melanophoren des Peritoneums und der Flecken der *X. helleri*-Flosse besteht eine Dichteregulation, d.h. bei Berührung der Dendriten hört die Zellteilung auf. Die Zellen, die durch den PS-Makromelanophoren-Locus *Li* bedingt sind, besitzen keine Dichteregulation, aber kein wucherndes, dreidimensionales Wachstum kann entweder in den Genomen von *X. variatus* oder den Rückkreuzungsbastarden beobachtet werden; eine regulierte, begrenzte Proliferation findet statt. Dasselbe trifft für die *Dr*-Zellen zu. In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben über die Erhöhung der Expression von *Li* in Rückkreuzungsbastarden, die von einer kaum erhöhten Expression bis zu einer schweren Melanosis reicht, aber kein bösartiges Melanom entsteht spontan (Anders, A. *et al.*, 1973a; Weis & Schartl, 1998). Die Translokationsmutante *DrLi*, von der die Zelllinie *DRLi* abstammt, zeigt eine stark erhöhte Expression des Makromelanophoren-Locus *Li* in F_1 -Bastarden im Vergleich zu den Tieren des ursprünglichen Phänotyps *YeLi*, aber in Rückkreuzungsbastarden ist die Expression nicht weiter erhöht und die Unabhängigkeit des Locus *Li* vom Gen *R_Ddiff* ist in diesem Genotyp erhalten. Diese Makropigmentzellen (Peritoneum, *X. helleri*, *Dr*, *Li*) produzieren alle angenommenen *Xi-X*-Transkripte von 2,3 kb.

Die kontakt-inhibierte, zwei-dimensionale (Peritoneum, *X. helleri*) bzw. kontrollierte (*Dr*, *Li*) Proliferation steht in Kontrast zu dem unkontrollierten, dreidimensionalen Wachstum der Zellen der Makromelanophoren-Loci *Sd* und *Sp* in Rückkreuzungsbastarden. Die Zelllinie PSM, angelegt von Melanomzellen des Locus *Sp*, und das untersuchte Melanom, vom Muster *Sd*, produzieren nicht das längere *Xi-X*-Transkript von 2,3 kb. Das 2,3 kb *Xi-X* Transkript könnte für eine kontrollierte Proliferation erforderlich sein. Um diese Frage zu beantworten, ist es interessant zu erfahren, ob das 2,3 kb Transkript in den induzierten Melanomen der Musterung *Li* noch produziert wird.

Die unterschiedlichen proliferativen Eigenschaften der verschiedenen Pigmentzell-Musterungen könnten mit der unterschiedlichen Abhängigkeit von R_{Diff} in Zusammenhang stehen (siehe S. 293). Wenn der Unterschied zwischen einer R_{Diff} -unabhängigen, gut regulierten Proliferation und den R_{Diff} -abhängigen, dreidimensional-wachsenden Pigmentzellen durch das 2,3 kb $Xi-X$ -Transkript erfasst werden kann, wäre $Xi-X$ bei sehr zentralen Regulationskreisen der Proliferation und Differenzierung der Makromelanophoren beteiligt, die für das xiphophorine Melanom-Modell von größter Bedeutung sind.

Fische des Phänotyps $YeLi$ weisen im Vergleich zu Tieren mit den Pigmentzellmustern $DrSd$ und $DySp$ andere Restriktions-Fragmentlängen des Erbmaterials auf; dieses trifft sowohl für das Gen $Xi-X$, als auch für das Gen $erbB^{*a}$ ($Xmrk$) zu (Zechel *et al.*, 1988). Die Translokationsmutante $DrLi$ besitzt für die beiden Gene die gleichen Restriktionsfragmente wie die der Phänotypen $DrSd$ und $DySp$. Für $erbB^{*a}$ ($Xmrk$) existieren auch unterschiedliche Transkriptlängen im Melanom, bedingt durch die Loci $YeLi$ bzw. $DrLi$, wobei die Transkriptlänge des Musters $DrLi$ mit der des Musters $DrSd$ übereinstimmt (Zechel *et al.*, 1992a). Die unterschiedliche genetische Organisation der Gene $Xi-X$ und $erbB^{*a}$ ($Xmrk$) könnte die unterschiedliche Regulation der Makromelanophoren-Loci Li und Sd/Sp widerspiegeln, wobei die Organisation entsprechend der des X-Chromosoms von $X. maculatus$ (Sd/Sp -tragend) eine relaxierte Regulation und erhöhte Proliferation der Makromelanophoren-Loci, auch der der chimären Translokationsmutante $DrLi$, in den Bastarden bedeuten könnte. Trotzdem ist die R_{Diff} -Unabhängigkeit der Musterung Li in dem mutierten Genotyp $DrLi$ erhalten geblieben.

Besteht eine Beziehung zwischen den Genen $Xi-X$, R_{Diff} und $erbB^{*a}$ ($Xmrk$) und den Wachstumseigenschaften der verschiedenen Farbmusterungen?

Die Makromelanophoren-Loci wurden häufig mit den tumor-induzierenden Eigenschaften verbunden mit diesen Loci bzw. mit dem Tu -Komplex/ $erbB^{*a}$ ($Xmrk$)-Gen gleich gestellt (Anders, A. *et al.*, 1973a; Woolcock *et al.*, 1994). Inzwischen konnte nachgewiesen werden, dass es sich um zwei getrennte, aber dicht lokalisierte Einheiten handelt (Weis & Schartl, 1998). Der Makromelanophoren-Locus ist für den Phänotyp des Musters verantwortlich, $erbB^{*a}$ ($Xmrk$) für die erhöhte Proliferation, die aber durch verschiedene Faktoren reguliert werden kann. Für z.B. die Musterungen Sd und Sp ist in den F_2 -Generationen eine graduelle Expression von einer kontrollierten Musterung bis zu bösartigem Melanom zu beobachten, was auf ein polygenes, regulatorisches Netzwerk zurückzuführen ist (Anders, F. *et al.*, 1972; Anders, A. *et al.*, 1973a). Weis & Schartl (1998) schlagen eine unterschiedliche Tumorgenität der verschiedenen $erbB^{*a}$ ($Xmrk$)-Allele geknüpft an bestimmte Makromelanophoren-Loci vor, die in Hybriden mit verschiedenen Arten sich unterschiedlich ausprägt.

Ein Modell zur Beziehung der Gene $x-erbB^{*a}$ ($Xmrk$), R_{Diff} und $Xi-X$ in den Makromelanophoren kann aufgestellt werden: Die Sd - und Sp -kodierte Makromelanophoren in Rückkreuzungsbastarden exprimieren $x-erbB^{*a}$ ($Xmrk$) und das 2,3 kb $Xi-X$ -Transkript wird nicht gebildet. Das 2,3 kb $Xi-X$ -Transkript ist eventuell für eine Differenzierung und eine kontrollierte Proliferation der Makromelanophoren erforderlich. In den $x-erbB^{*a}$ ($Xmrk$)-exprimierenden Zellen wird vom Tyrosin Kinase

Rezeptor in der Zellmembran die Signale zum Zellkern übertragen, wo die Synthese des 2,3 kb *Xi-X* Transkriptes möglicherweise unterbunden wird. Das Gen *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) hat über verschiedene Signalwege einen Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung, Migration und Überleben der transformierten Melanocyten (Übersicht von Meierjohann & Schartl, 2006).

Es wurde vorgeschlagen, dass das Gen *R_{Diff}* die Expression von *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) unterdrücken könnte (Adam *et al.*, 1993; Meierjohann & Schartl, 2006), die Signalkette wird demzufolge nicht initiiert und das längere *Xi-X*-Transkript könnte gebildet werden, die Zellen differenzieren und zeigen ein kontrolliertes Wachstum. Diese Theorie stimmt mit der vorne diskutierten Abhängigkeit des 2,3 kb *Xi-X*-Transkriptes in *Sd/Sp*-Zellen vom Gen *R_{Diff}* überein (siehe S. 293). Nur in Melanocyten, die in Proliferation und Differenzierung vom Gen *R_{Diff}* abhängen, ist *R_{Diff}* für eine 2,3 kb *Xi-X*-Synthese erforderlich. In den *X. helleri*-Flossen, im Peritoneum und in den *Li*-Zellen, sowie auch in den *Dr*-Zellen, wird *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) angenommen nicht oder streng reguliert exprimiert, und das 2,3 kb *Xi-X* Transkript wird, unabhängig vom Gen *R_{Diff}*, gebildet. Unterschiedliche zelluläre Signalübertragungswege, bzw. der Regulation dieser Wege, würden die abweichenden Eigenschaften der Proliferation, Differenzierung und Dichteregulation der verschiedenen Makromelanophoren-Musterungen, und damit auch die vorgeschlagene unterschiedliche Tumorgenität der verschiedenen *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*)-Allele geknüpft an bestimmte Makromelanophoren-Loci (Weis & Schartl; 1998), erklären können.

Spekulativ existieren Rückkopplungsmechanismen, und das Genprodukt von *Xi-X* könnte an die regulatorischen Elemente der PSP-Loci bzw. des *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*)-Gens binden. Nach dem alten, klassischen *Xiphophorus*-Modell könnte *Xi-X* an die kompartiment-spezifischen, regulatorischen Gene (*R_{Co}*) des *onc*-Gens binden und dadurch die Expression des Makromelanophoren-Locus bzw. *onc*-Gens in den entsprechenden Kompartimenten regulieren. Hiermit findet die vorgeschlagene Funktion von *Xi-X* bei der Wahrnehmung der Lokalisation im Körper und Rolle bei der Pigmentzellmusterung eine Erklärung (siehe auch S. 292). Neben der vorgeschlagenen direkten Regulation der *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*)-Expression vom Gen *R_{Diff}* und die Bedeutung für die *Xi-X*-Expression, könnte *R_{Diff}*, direkt oder indirekt, über andere Signalwege mit der *Xi-X*-Expression verbunden sein.

Neben der Vielfalt von Pigmentmustern bei *Xiphophorus* gibt es andere Fisch-Gattungen, die verschiedene Farbmuster besitzen. Über 40 Farbmustermutanten konnten von Wildtyp-Populationen von Medaka (*Oryzias latipes*) gesammelt werden (Kelsh *et al.*, 2004) und über 90 Farbmustermutanten vom Zebrafisch (*Danio rerio*) sind durch Mutagenscreens erzeugt worden (Kelsh, 2004; Parichy, 2006). Eine systematische Herstellung und Analyse von Pigmentmustermutanten konnte z.B. für Zebrafisch 17 Gene (65 Mutanten), verantwortlich für die Entwicklung der Xanthophoren, aufdecken (Odenthal *et al.*, 1996).

Für die Melanocyten der Säuger sind aus der Literatur über 130 Gene bekannt, deren zelluläre Funktionen sich von Rezeptoren und deren Liganden bzw. Wachstumsfaktoren über Transkriptionsfaktoren und Enzyme reichen und neben der Pigmentbildung eine Einwirkung auf Prozesse wie das Überleben der Melanoblasten, Migration, Proliferation und Differenzierung ausüben (Übersicht von Goding, 2007). Sie stehen unter der

Regulation vielzähliger Signalwege, mit Komponenten wie MSH, kit/scf und WNT/ β -catenin (Übersichte von Widlund & Fisher, 2003; Larue & Delmas, 2006).

Bei *Xiphophorus* gibt es vermutlich verschiedene Typen Pigmentzellen, die in Eigenschaften wie Morphologie, Lokalisation, Determination, Migration, Proliferation und Differenzierung eine Vielfalt aufweisen und unter verschiedenen regulatorischen Systemen stehen. Die genetisch und molekular-biologisch erkannten Gene, wie die Pterinophoren- und Makromelanophoren-Loci, der *Tu*-Komplex und die Gene *R_{Diff}*, *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) und *Xi-X*, vielleicht auch das Gen *x-erbB^{*i}* (*EGFR*), sind sicherlich nur wenige von den Genen, die in einem komplexen System bei der Bildung spezifischer Farbmuster bei *Xiphophorus* von Bedeutung sein könnten, und einen möglichen Versuch eines Zusammenhangs dieser Faktoren kann nur fragmentarisch sein. Es ist aber anzunehmen, dass die erwähnten Gene eine zentrale Rolle bei der Farbmusterentstehung bzw. bei der Entartung der Pigmentzellen unter einem Regulationskreis von Proliferation, Differenzierung und Apoptose innehaben könnten.

Zusammenfassung/weitere Fragestellungen

Zusammenfassung

Folgende Theorie konnte aufgrund der Ergebnisse aufgestellt werden: Die Zellen der Grundfärbung, die Xanthophoren und Mikromelanophoren, produzieren in *X. helleri* und *X. maculatus* vermutlich in allen Differenzierungsstadien nur das Transkript von 1,5 kb. Die spezifischen Makropigmentzellen, die ein *Xi-X*-Transkript von 2,3 kb synthetisieren, können auf zwei verschiedene Wege gebildet werden: Die eine Möglichkeit ist, dass die Musterfarbzellen schon in einem frühen Blastenstadium determiniert werden, eine Differenzierung zu Makropigmentzellen einzuschlagen (die PSPL-bedingten Zellen der Platyfische). Diese Zellen produzieren schon ab dem Blastenstadium bis zu den ausdifferenzierten Erythrophoren bzw. Makromelanophoren 2,3 kb *Xi-X* Transkripte; die *Xi-X*-Transkripte von 1,5 kb werden nur in den Blastenstadien gebildet. Ein anderer Syntheseweg der Xanthoerythrophoren, Erythrophoren und Makromelanophoren ist von den PSP-Loci unabhängig (rote Flecken in den Rückenflossen von *X. helleri*, Peritoneum).

Die Gene *Xi-X* und *R_{Diff}* sind beide vermutlich für die Differenzierung der Makromelanophoren von Bedeutung, eine Interaktion der beiden Gene bzw. Genprodukte ist daher denkbar. Aufgrund der Abwesenheit von 2,3 kb *Xi-X*-Transkripten in malignen Melanomzellen (*Sp*, *Sd^T*, *Sd*), die keine *R_{Diff}*-Gene besitzen, könnte das Gen *R_{Diff}* für die Produktion des 2,3 kb *Xi-X*-Transkriptes erforderlich sein.

Möglicherweise spiegelt das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript die unterschiedliche *R_{Diff}*-Abhängigkeit der verschiedenen Farbmusterungen wider. Die *Sd/Sp*-Musterungen (ohne das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript) sind in ihrer Differenzierung vom Gen *R_{Diff}* abhängig. Die Musterungen *Li*, *Dr*, Flecken der *X. helleri*-Rückenflossen und Peritoneum (mit dem 2,3 kb *Xi-X*-Transkript) sind *R_{Diff}*-unabhängig. Diese Eigenschaften decken sich auch mit den unterschiedlichen proliferativen Eigenschaften verschiedener Makropigmentzellen ab. Dichteregulierte bzw. proliferativ gut regulierte Farbmusterungen (*X. helleri*, Peritoneum, *Dr*, *Li*; *R_{Diff}*-unabhängig) zeigen eine Produktion des 2,3 kb *Xi-X*-

Transkriptes, die unkontrollierten, dreidimensional wachsenden Musterungen (*Sd*, *Sp*; R_{Diff} -abhängig) produzieren das 2,3 kb Transkript nicht.

Wenn das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript die dichteregulierte bzw. proliferativ gut regulierte kontra dreidimensionale, unkontrollierte Teilung der Makromelanophoren widerspiegelt und auch den möglichen Zusammenhang dieser Eigenschaften mit der Abhängigkeit vom Gen R_{Diff} bestimmter Pigmentzellmuster von Bedeutung sein sollte, würde *Xi-X* eine sehr wichtige Rolle bei signifikanten, regulatorischen Kreisen der Makromelanophoren im xiphophorinen Melanom-Modell in bezug auf Proliferation und Differenzierung innehaben können.

Ein Modell über den Zusammenhang zwischen den Genen $x-erbB^{*a}$ (*Xmrk*), R_{Diff} und *Xi-X* und den Wachstumseigenschaften der Makropigmentzellen kann aufgestellt werden: Der Tyrosin Kinase Rezeptor in der Zellmembran, kodiert vom Gen $x-erbB^{*a}$ (*Xmrk*), unterbindet über eine Signalübertragungskette die Synthese des 2,3 kb *Xi-X*-Transkriptes im Zellkern. Das Gen *Xi-X* ist vermutlich für die Differenzierung dieser Zellen erforderlich und ohne das Transkript proliferieren die Zellen unkontrolliert, ein Melanom entsteht. Das Gen R_{Diff} hemmt die Expression von $x-erbB^{*a}$ (*Xmrk*), die Signalübertragungskette wird unterbunden und das längere *Xi-X*-Transkript kann hergestellt werden, die Zellen differenzieren. Rückkopplungsmechanismen existieren möglicherweise, bei denen das Genprodukt von *Xi-X* an die regulatorischen Elemente der PSP-Loci bzw. des $x-erbB^{*a}$ (*Xmrk*)-Gens bindet. R_{Diff} und *Xi-X* könnten auch, direkt oder indirekt, über andere Signalwege verbunden sein.

Weitere Fragestellungen

Aufgrund der möglichen zentralen Funktionen von *Xi-X* bei denen für das xiphophorine Melanomsystem wichtigen Eigenschaften, wie Proliferation und Differenzierung der Makromelanophoren, könnte dieses Gen als ein Schlüsselgen dienen, um diese Prozesse analysieren zu können. Aktivitäts- und Bindungsstudien könnten eine Interaktion von *Xi-X* mit bekannten Genen ausfindig machen, sowie eventuell neue Gene enthüllen, die für die Pigmentzell-Musterung und Melanom-Entwicklung wichtig sein könnten. Durch *in situ*-Hybridisierungen mit spezifischen Sonden der *Xi-X*-Transkripte von 1,5 und 2,3 kb, bevorzugt an den Flossen der Tiere, könnte der Synthese der beiden Transkripte in den phänotypisch verschiedenen Farbzellen nachgegangen werden. Da die Pigmentzellen schon in den Blastenstadien in bezug auf *Xi-X* determiniert sind, Makropigmentzellen zu bilden (ein 2,3 kb Transkript), könnte *Xi-X* als ein Marker dieser Zellen bei der Ontogenese benutzt werden.

Weitere Fragen, die sich in bezug auf die *Xi-X*-Expression, Pigmentzell-Determination, -Proliferation und -Differenzierung, sowie neoplastische Transformation von Makromelanophoren, stellen:

- 1) Sind die Vorläufer der Pigmentzellen schon bei der Ablösung von der Neuralleiste determiniert, Makropigmentzellen zu bilden oder werden sie entweder während der Migration, oder erst im richtigen Kompartiment angekommen, auf die Differenzierungsrichtung festgelegt? Wie unterscheidet sich die Determination der Musterpigmentzellen zwischen *X. maculatus* und *X. helleri*?

DISKUSSION

- 2) Sind viele Zellen determiniert, Makropigmentzellen zu bilden, und durch Apoptose werden die überflüssigen Zellen in den falschen Kompartimenten bzw. in bestimmten Regionen innerhalb der Ziel-Kompartimente eliminiert?
- 3) Stammen die Makropigmentzellen, die nicht PSPL-bedingt sind, von Zellen des Grundmusters ab und erwerben später das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript oder ruhen sie als determinierte Vorläuferzellen mit einem 2,3 kb *Xi-X*-Transkript in den Geweben?
- 4) Inwieweit spielen Differenzierungssignale (z.B. *R_{Diff}*, Retinsäure) bzw. der Wegfall von Differenzierungsinhibitoren für die Synthese des 2,3 kb *Xi-X*-Transkriptes eine Rolle?
- 5) Induziert Retinsäure, die, wie vermutet, für die Differenzierung der Makropigmentzellen eine Rolle spielt, die Bildung der Pigmentflecken in den Rückenflossen von *X. helleri*?
- 6) In weiteren Experimenten wäre ein Aktivitätsnachweis von *Xi-X* in den kontrollierten Musterungen von *X. maculatus* (z.B. Genotyp *Sd/Sd* oder *Sp/Sp* mit zwei Kopien von *R_{Diff}*), sowie auch in den Pigmentzellen der Rückkreuzungsbastarde dergleichen mit *X. helleri*, interessant, um die Frage nach der *R_{Diff}*-Abhängigkeit der Synthese des 2,3 kb *Xi-X*-Transkriptes in *Sd*- und *Sp*-Zellen zu beantworten.
- 7) Ein Aktivitätsnachweis von *Xi-X* in Makromelanophoren-Musterungen (*Ni*, *Ni^e*, *Sr*, *Pu*), die, wie die Musterung *Li*, in ihrer Proliferation in Rückkreuzungsbastarden unabhängig vom Gen *R_{Diff}* sind, würde weitere Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen dem 2,3 kb *Xi-X*-Transkript und dem Gen *R_{Diff}* ergeben. Die Fische dieser Phänotypen zeigen alle eine begrenzte, regulierte Proliferation in den Rückkreuzungsbastarden und für die Frage nach einer Rolle von *Xi-X* bei der proliferativen Regulation wären diese Tiere auch aufschlussreich. Phänotypen könnten gesucht werden, bei denen in den Rückkreuzungsbastarden die Eigenschaften *R_{Diff}*-Abhängigkeit und unkontrollierte Proliferation sich unterscheiden, um eine eventuelle getrennte Bedeutung von *Xi-X* für diese beiden Charakteristika zu erkennen.
- 8) Laufen erythrophoren-determinierte Zellen über ein Stadium der Xanthophoren, das, im Gegensatz zu den Xanthophoren der Grundfärbung, das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript produzieren? Produzieren diese erythrophoren-determinierte Xanthophoren das *Xi-X*-Transkript von 1,5 kb, das für die Xanthophoren der Grundfärbung charakteristisch ist?
- 9) Bilden die intensiv gelb gefärbten, PSPL-bedingten (*Ye*) Xanthophoren der Männchen von *X. variatus*, im Gegensatz zu den Xanthophoren der Grundfärbung, das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript?
- 10) Könnte ein Vergleich der *Xi-X*-Expression in den schwach gelb gefärbten Flossen der *YeLi*-Weibchen mit den intensiv gelb gefärbten Flossen der *YeLi*-Männchen eine eventuell geschlechtshormon-induzierte Produktion der 2,3 kb *Xi-X*-Transkripte in den Xanthophoren aufdecken?
- 11) Wird die Aktivität des Gens *Xi-X* durch den genetischen Differenzierungsblock der Mikro- und Makromelanophoren, bedingt durch das Gen „golden“ (*g/g*) (Anders, F. et al., 1985), beeinflusst? Produzieren die im S-Stadium blockierten Melanocyten die *Xi-X*-Transkripte von 1,5 bzw. 2,3 kb? Ändert die Lösung des Differenzierungsblocks durch Promotoren die Transkriptionsaktivität?

DISKUSSION

- 12) Könnte eine unterschiedliche Produktion des 2,3 kb *Xi-X*-Transkriptes in den Platyfischen in Abhängigkeit von dem Musterungstyp, Linien (*Li*, *Sr*) kontra Flecken (*Sd*, *Sp*, *Pu*), stehen?
- 13) Produzieren die Pigmentzellen in der Musterung *Db* in *X. helleri* das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript?
- 14) Werden die verschiedenen Farbmusterungen der Platyfische, sowie die Flecken der *X. helleri*-Flossen und Peritoneum, über verschiedene zelluläre Signalwege übermittelt und könnten diese unterschiedliche Signalwege die verschiedenen proliferativen Eigenschaften, die Abhängigkeit vom Gen *R_{Diff}* und die unterschiedliche *Xi-X*-Transkription erklären?
- 15) Um die Hypothese über den Zusammenhang zwischen der *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*)-Aktivität und dem 2,3 kb *Xi-X* Transkript zu überprüfen, wäre es wichtig, die Aktivität der beiden Gene in der Zelllinie DRLI, die ein 2,3 kb Transkript bildet, sowie in den kontrollierten und unkontrollierten Pigmentzell-Musterungen zu überprüfen. Wenn eine *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*)-Aktivität in den DRLI-Zellen vorliegen sollte, bleibt sie während der retinsäure-induzierten Differenzierung und Verlust des 1,5 kb Transkripts erhalten?
- 16) Ist *Xi-X* bei der kompartimentalen Expression von *x-erbB^{*a}* (*Xmrk*) oder anderen, für die Pigmentzellen wichtigen Rezeptoren, vielleicht von den PSP-Loci bedingt, beteiligt? Bindet *Xi-X* an die klassisch erkannten regulatorischen Gene (*R_{Gew}*, *R_{Co}*) des *Tu*-Gens?
- 17) Ist es möglich, dass *x-erbB^{*i}* (*EGFR*) bei der kontrollierten Grundmusterung bzw. spezifischen Farbmusterung in einer Interaktion mit *Xi-X* anhand der *Xi-X*-Transkripte von 1,5 und 2,3 kb beteiligt ist?
- 18) Haben Makromelanophoren-Musterungen, die normal das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript produzieren und keine kreuzungs-bedingten Tumore verursachen, das Transkript in induzierten Tumoren (durch z.B. karzinogene Substanzen, Promotoren oder Strahlen) verloren?
- 19) Könnte die Vererbung von invasiven Melanomen schon gleich nach der Geburt in Rückkreuzungsbastarden mit einem mutierten *DrLi*-Loci im genetischen Hintergrund von *X. helleri*, aber mit einer spontanen Tumor-Regression nach wenigen Wochen (Meierjohann & Schartl, 2006), mit der Produktion des 2,3 kb Transkriptes in den transformierten Melanocyten in Zusammenhang stehen? Der bis jetzt unbekanntes „tumor modifier“ ist, wie *Xi-X*, X-chromosomal lokalisiert.
- 20) Wie die Musterpigmentzellen produzieren auch die Skelettmuskelzellen ein *Xi-X*-Transkript von 2,3 kb. Ist das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript in den Skelettmuskelzellen mit dem der Musterpigmentzellen identisch? Spiegelt das 2,3 kb Transkript gemeinsame Aufgabenbereiche der Gene in den beiden Zelltypen wider, wie z.B. die Endoploidisierung oder kontraktile Fähigkeiten?
- 21) Besonders in bezug auf eine mögliche Funktion von *Xi-X* bei der Endopolyloidisierung der Makromelanophoren, ist es interessant zu erkunden, ob eine Funktion und Interaktion der Gene *Xi-X* und *R_{Diff}* (ein Gen der Zellzyklus-überwachung? Siehe S. 257) mit dem Übergang von der Phase G(2) zu M stattfindet.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Hauptfragestellung dieser Arbeit, ob ein Zusammenhang zwischen den musterbildenden Homöobox Genen und den Pigmentzellmustern besteht, konnte positiv beantwortet werden. Ein struktureller Zusammenhang eines Homöobox Gens, *Xi-X*, konnte durch eine Kopplung von 15 cM mit den PSP-Loci bzw. dem *Tu*-Komplex gefunden werden. Eine weitere Beziehung zu den Pigmentzellen konnte durch die Expressionsanalysen Bestätigung finden. Ein Transkript von 1,5 kb charakterisiert die Zellen der Grundfärbung (Mikromelanophoren, Xanthophoren) und die undifferenzierten Zellstadien. Ein anderes Transkript von 2,3 kb ist für die Musterpigmentzellen charakteristisch (Makromelanophoren, Xanthoerythrophoren, Erythrophoren).

Die Zellen der Zelllinie DRLI sind vermutlich als Makropigmentzellen determiniert und könnten benutzt werden, um die molekularen Prozesse, die für die Spezifizierung dieser Zellen ablaufen und die neoplastische Transformation von Makromelanophoren zu analysieren. Die unstimulierten Zellen produzieren *Xi-X*-Transkripte von 1,5 und 2,3 kb, eine retinsäure-stimulierte Differenzierung wird von einem Verlust des 1,5 kb Transkriptes begleitet. Schon frühe Blastenstadien von PSPL-kodierten Zellen sind vermutlich determiniert, durch ein 2,3 kb *Xi-X*-Transkript zu erkennen, Makropigmentzellen zu bilden. Das 1,5 kb Transkript ist in den Blastenstadien dieser Zellen anwesend und geht während der weiteren Differenzierung verloren.

Die Frage wird gestellt, ob die Synthese des 2,3 kb *Xi-X* Transkriptes vom Gen *R_{Diff}* in den *R_{Diff}*-regulierten Pigmentzellmusterungen *Sd* und *Sp* abhängig sein könnte. In den *R_{Diff}*-unabhängigen Makromelanophoren (Musterung *Li*, *X. helleri*-Flecken, Peritoneum), sowie in den Erythrophoren, wird das Transkript dagegen gebildet. Ebenso wird diskutiert, ob das 2,3 kb *Xi-X* Transkript mit dem Mustertyp (Flecken in *Sd* und *Sp* gegen Linien in *Li*) oder mit den Proliferationseigenschaften der Zellen verschiedener Makropigmentzellmusterungen in Relation steht, die wiederum mit der unterschiedlichen *R_{Diff}*-Abhängigkeit in Zusammenhang stehen könnte. Wenn der Unterschied zwischen einer *R_{Diff}*-unabhängigen, gut regulierten Proliferation (mit dem 2,3 kb *Xi-X*-Transkript) und den *R_{Diff}*-abhängigen, dreidimensional wachsenden Pigmentzellmustern (ohne das 2,3 kb *Xi-X*-Transkript) durch das 2,3 kb *Xi-X* Transkript erfasst werden kann, würde *Xi-X* eine sehr wichtige Rolle bei signifikanten, regulatorischen Kreisen der Makromelanophoren in bezug auf Proliferation und Differenzierung innehaben können; dies sind Eigenschaften, die für die Neoplasie von zentraler Bedeutung sind.

Die Homologie von *Xi-X* zum Gen *pdx-1* ist hoch (zum Zebrafisch 82% in einer Region von 259 nt), aber das abweichende Expressionsmuster der beiden Gene spricht dafür, dass *Xi-X* ein neues Mitglied der *Xlox*-Familie ist. *Xi-X* könnte bei *Xiphophorus* zusätzlich zum Gen *pdx-1* ein zweites *Xlox*-Gen eines der *ParaHox*-Cluster repräsentieren, das möglicherweise nur in einem begrenzten Zweig der Fischevolution erhalten geblieben ist; eine Homologie konnte nur unter den Zahnkarpfen (*Atheriniformes*) nachgewiesen werden.

Xi-X wird in der Leber (0,8 kb), Skelettmuskulatur (2,3 kb) und Herzen (0,8 kb) exprimiert. Vermutlich werden durch ein differenzielles Spleißen eines primären Transkripts von 3,1 kb mindestens 4 verschiedene Transkripte aus der *Xi-X*-Region produziert. Wie die anderen *ParaHox*-Gene wird auch *Xi-X* im Gastrointestinaltrakt

ZUSAMMENFASSUNG

exprimiert, aber von dieser Gruppe Gene hat nur *Xi-X* die Leber als Expressionsdomäne. In der Leber steht die Expression von zwei verschiedenen Transkripten gleicher Länge in einem quantitativ reziproken Verhältnis zu den Alimentationsvorgängen, in der Muskulatur kann auf Differenzierungsfunktionen hingewiesen werden. Das Lebertranskript C beinhaltet nur die 3'-Region C vom isolierten *Xi-X*-Bereich und nicht die Homöobox oder Poly(GTCT/GACA), die in dem Lebertranskript B anwesend sind. Die beiden Lebertranskripte werden möglicherweise in entgegengesetzten Richtungen transkribiert. Keine Motive oder Funktionen sind für die 3'-liegende Region bekannt, aber homologe EST-Sequenzen konnte in anderen Fischarten gefunden werden (zur Forelle und Zebrafisch jeweils 73% in 353 bzw. 199 nt).

Eine Funktion bzw. gegenseitige Regulation der verwandten Gene *Xi-X* und *pdx-1* bei der Spezifizierung der Organe Leber und Pankreas im posterioren Vorderdarm wird unter dem Aspekt der phylogenetischen Entwicklung der Verdauungsorgane angesprochen.

Eine atypische Vererbung der PS- und HS-*Xi-X*-Fragmente konnte in den Bastarden beobachtet werden (8,6% der 70 einzeln untersuchten Bastarde). Eine Beziehung von Aberrationen der *Xi-X* Genorganisation in Bastarden zu den Kopplungsgruppen *Tu*-Komplex und *R_{Diff}* konnte gezeigt werden: Die Kopplungsgruppe *Tu*-Komplex fördert die Instabilität, die durch die Kopplungsgruppe *R_{Diff}* unterbunden wird. Eine eventuelle Zuordnung von *R_{Diff}* als ein Gen der Zellzyklus-Überwachung wird diskutiert. Spielt *R_{Diff}* eine Rolle für die Unterdrückung der meiotischen Rekombination in abweichenden DNA-Bereichen und somit eine Rolle für die Differenzierung von Geschlechtschromosomen?

Das isolierte *Xi-X*-Fragment (2,2 kb) enthält simple repetitive Sequenzen, SSRs. Der RFLP von *Xi-X* und poly(GTCT/GACA)-enthaltenden Fragmenten, sowie die Aberrationen in den Bastarden, findet durch die Instabilität von SSRs eine Erklärung. Ein eventueller Zusammenhang zwischen der restriktiven Poly(GTCT/GACA)-Organisation bei *X. maculatus*, im Gegensatz zu *X. helleri*, und einer gut regulierten Expression des *Tu*-Komplexes wird angesprochen.

Eine mögliche Rolle von Poly(GTCT/GACA)/*Xi-X* bei einer röntgenstrahl-induzierten, transgenerationellen, nicht-mendelschen Vererbung der Melanomentstehung wird diskutiert.

Die Möglichkeit besteht, dass gewisse Aspekte der Geschlechtsbestimmung (*X. helleri* Männchen, die männliche und weibliche Heterogamete bei *X. maculatus*) durch die isolierte Genregion *Xi-X* widerspiegelt wird.

7 weitere Homöoboxen konnten isoliert werden und sind vermutlich Bestandteile von zwei *Hox*-Clustern, *Xiox-1.1/1.2/1.3* und *Xiox-2.1/2.2/2.3/(3.1)*, vorwiegend der paralogenen Gruppen 5-7 zugehörend. Die Gesamtzahl von Homöoboxen mit einer hohen Homologie (über 70%) zu den eingesetzten, dipteren homöobox-enthaltenden Genfragmenten von *Antp* und *ftz* im xiphophorinen Genom konnte auf 10 geschätzt werden.

7. ANHANG

LÖSUNGEN UND MEDIEN

Die Lösungen wurden generell mit bidestilliertem Wasser (Aqua bidest.) angesetzt und anschließend entweder autoklaviert oder sterilfiltriert* (Porenweite 0,15-0,20 µm; Millipore, Nalgene, Schleicher & Schüll oder Sartorius). Für einige Lösungen** war ein Sterilisationsvorgang nicht erforderlich.

Wenn kein Produzent der Chemikalien angegeben wird, wurden sie von der Firma Merck bezogen.

Bakterien-Verfahren

L-Broth

1,0% (w/v) Bacto-Tryptone (Difco)

0,5% (w/v) Hefeextrakt (Difco)

0,5% (w/v) NaCl

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt.

NZCYM-Medium

1,0% (w/v) N-Z Amine A (Otto Aldag, Hamburg)

0,5% (w/v) Hefeextract (Difco)

0,5% (w/v) NaCl

0,1% (w/v) Bacto Vitamin assay casamino acids (Difco)

0,2% (w/v) MgSO₄·7 H₂O

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt.

ψ-Medium

2,0% (w/v) Bacto-Tryptone (Difco)

0,5% (w/v) Hefeextrakt (Difco)

10 mM KCl

0,4% (w/v) MgSO₄·7 H₂O

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,6 eingestellt.

2YT-Medium

1,6% (w/v) Bacto-Peptone (Difco)

1,0% (w/v) Hefeextrakt (Difco)

0,5% (w/v) NaCl

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt.

ANHANG

Ampicillin (1000x)*

Ampicillin (Sigma) wurde in steriles Wasser in einer Konzentration von 50 mg/ml gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Die Gebrauchskonzentration betrug 50 µg/ml Medium.

Tetracyclin (1000x)**

Tetracyclin (Boehringer) wurde in einer Konzentration von 12,5 mg/ml in 50% Äthanol angesetzt und lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt. Die Gebrauchskonzentration betrug 12,5 µg/ml Medium.

Chloramphenicol (200x)**

Chloramphenicol (Boehringer) wurde in absolutem Äthanol in einer Konzentration von 34 mg/ml gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Gebrauchskonzentration betrug 170 µg/ml.

X-Gal (500x)**

X-Gal (Sigma) für die OJA-Platten wurde in einer Konzentration von 20 mg/ml in Dimethylformamid gelöst und lichtgeschützt bei -20°C aufgehoben. Die Gebrauchskonzentration betrug 40 µg/ml.

OJA-Platten

Die OJA-Platten bestehen aus 50 µg Ampicillin (Sigma) und 40 µg X-Gal (Sigma) pro ml 2YT-Medium mit 1% (w/v) Agar-Agar (Serva). Die OJA-Platten können für kürzere Zeit lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt werden.

Transformations-Puffer I*

100 mM RbCl₂ (Sigma)
50 mM MnCl₂
30 mM Kalium-Acetat (Fluka)
10 mM CaCl₂
15% (v/v) Glycerol

Mit 0,2 M Essigsäure wurde der pH-Wert auf 5,8 eingestellt. Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

Transformations-Puffer II*

10 mM RbCl₂ (Sigma)
75 mM CaCl₂
10 mM MOPS (Sigma)
15% (v/v) Glycerol

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt. Der Puffer wurde bei 4°C aufbewahrt.

Phagen-Verfahren

SM-Puffer

0,1 M NaCl
10 mM MgSO₄
0,1% Gelatine (Difco)
50 mM Tris·Cl pH 7,5

Ca²⁺/Mg²⁺-Lösung

10 mM CaCl₂
10 mM MgCl₂

DNA-Isolierung

Extraktions-Puffer (DNA)**

0,2 M NaCl
0,1 M EDTA
0,2% SDS
100 µg/ml Proteinase K (Sigma)

Proteinase K**

Eine Stammlösung von 10 mg/ml Proteinase K (Sigma) im sterilem Wasser wurde bei -20°C gelagert.

Phenol**

Phenol wurde bei 68°C geschmolzen, mit 0,1% 8-Hydroxychinolin versetzt und wiederholt mit einem gleichen Volumen Tris·Cl-Puffer (pH 8,0) extrahiert. Das erste Mal wurde ein 1 M Puffer verwendet, die folgenden Extraktionen erfolgte mit 0,1 M Puffer mit 0,2% 2-Mercaptoäthanol. Die Extraktionen wurden bis der pH-Wert der wässrigen Phase größer als 7,6 war wiederholt. Das Phenol könnte lichtgeschützt bei 4 °C bis zu einem Monat aufbewahrt werden.

Chloroform/Isoamylalkohol**

Chloroform wurde mit Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 (v/v) verwendet.

TE-Puffer

1 mM EDTA (Serva)
10 mM Tris·Cl (pH 7,6)

RNase A (1000x)**

10 mg/ml RNase (Boehringer)
in TE-Puffer

Durch eine Erhitzung für 10 Minuten auf 70°C gefolgt von einer langsamen Abkühlung wurde das Enzym frei von DNase-Aktivität gemacht. Die RNase A-Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

ANHANG

DNase I (1000x)**

10 mg/ml DNase (Boehringer)
in TE-Puffer

Die DNase I-Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Zaccharose-Puffer**

25% Zaccharose (Serva)
50 mM Tris·Cl (pH 8,0)

Lysozym-Lösung**

5 mg/ml Lysozyme (Boehringer)
0,25 M Tris·Cl (pH 8,0)

Detergenz-Lösung**

1% Brij 58 (Polyäthylenglycolmonostearyläther) (Serva)
0,4% Natriumdesoxycholat (K&K Laboratories)
60 mM EDTA
50 mM Tris·Cl (pH 8,0)

TES-Puffer

5 mM EDTA
50 mM NaCl
3 mM Tris·Cl (pH 8,0)

CsCl/TES-gesättigtes Isopropanol**

CsCl (Serva) und TES-Puffer wurden bis zu einem Refraktionsindex von 1,397 (in Verhältnis 65 g CsCl und 55 ml TES) vermischt. Dazu wurde ein gleiches Volumen Isopropanol gesetzt, gut vermischt, und die Phasen getrennt.

Puffer P1 (Diagen)

10 mM EDTA
400 µg RNase A/ml
50 mM Tris·Cl (pH 8,0)

Puffer P2 (Diagen)

0,2 M NaOH
1% SDS

Puffer P3 (Diagen)

2,55 M K-Acetat (pH 4,8)

Puffer QB (Diagen)

0,75 M NaCl
15% Äthanol
50 mM MOPS (pH 7,0)

Puffer QC (Diagen)

1,0 M NaCl

15% Äthanol

50 mM MOPS (pH 7,0)

Puffer QF (Diagen)

1,2 M NaCl

15% Äthanol

50 mM MOPS (pH 8,8)

PEB I

50 mM Glucose

10 mM CDTA

25 mM Tris·HCl (pH 8,0)

PEB II**

0,1 N NaOH

1 % SDS

Die Lösung wurde immer frisch angesetzt.

PEB III

3 M Na-Acetat (pH 6,0)

Der pH-Wert wurde mit Eisessig eingestellt.

Analyse der DNA

Restriktionsenzyme

Die Restriktionsenzyme waren von der Firma Boehringer. Als Restriktionsenzym-Puffer wurde entweder die "low-salt"-, "medium-salt"-, "high-salt"-Puffer oder "SmaI"-Puffer, beschrieben von Maniatis *et al.* (1982), oder die kommerziell zugänglichen Restriktionsenzym-Puffer A, B, M und H (Boehringer) benutzt.

Mit der Ausnahme des Enzyms *SmaI*, das eine Inkubationstemperatur von 25°C erforderte, war die Reaktionstemperatur der Enzyme 37°C.

| Enzym | Puffer |
|----------------|------------|
| <i>AvaI</i> | Medium/M |
| <i>BamHI</i> | Medium / B |
| <i>BglII</i> | Low / M |
| <i>EcoRI</i> | High / H |
| <i>HindIII</i> | Medium / B |
| <i>HpaI</i> | Low/M |
| <i>PstI</i> | Medium/H |
| <i>PvuII</i> | Medium / M |
| <i>SalI</i> | High / H |
| <i>Sau3A</i> | Medium / A |
| <i>SmaI</i> | Sma |
| <i>SphI</i> | H |
| <i>XbaI</i> | High / H |
| <i>XhoI</i> | High / H |

DTT-Stammlösung*

1 M DTT (BRL) in 0,01 M Na-Acetat (pH 5,2) wurde für die Restriktionsenzym-Puffer angesetzt, sterilfiltriert und als Stammlösung verwendet.

"Low salt"-Puffer

10 mM MgCl₂
 1 mM DTT* (BRL)
 10 mM Tris·Cl (pH 7,5)

"Medium salt"-Puffer

50 mM NaCl
 10 mM MgCl₂
 1 mM DTT* (BRL)
 10 mM Tris·Cl (pH 7,5)

"High salt"-Puffer

100 mM NaCl
 10 mM MgCl₂
 1 mM DTT* (BRL)
 50 mM Tris·Cl (pH 7,5)

"SmaI"-Puffer

20 mM KCl
10 mM MgCl₂
1 mM DTT* (BRL)
10 mM Tris·Cl (pH 8,0)

Puffer A (Boehringer)

10 mM Mg-Acetat
66 mM K-Acetat
0,5 mM DTT
33 mM Tris·Acetat (pH 7,9)

Puffer B (Boehringer)

100 mM NaCl
5 mM MgCl₂
1 mM Mercaptoäthanol
10 mM Tris·Cl (pH 8,0)

Puffer M (Boehringer)

50 mM NaCl
10 mM MgCl₂
1 mM DTE
10 mM Tris·Cl (pH 7,5)

Puffer H (Boehringer)

100 mM NaCl
10 mM MgCl₂
1 mM DTE
50 mM Tris·Cl (pH 7,5)

DNA-Längenstandards

Der DNA-Marker I, λ DNA geschnitten mit *EcoRI*, besaß DNA-Fragmente der Längen 21,2, 7,4, 5,8, 5,6, 4,9 und 3,5 kb.

Der DNA-Marker II, λ DNA geschnitten mit *HindIII*, besaß DNA-Fragmente der Längen 23,1, 9,4, 6,7, 4,4, 2,3, 2,0 und 0,56 kb.

Der DNA-Marker III, λ DNA geschnitten mit *EcoRI* und *HindIII*, besaß DNA-Fragmente der Längen 21,2, 5,1, 5,0, 4,3, 3,5, 2,0, 1,9, 1,7, 1,4, 0,95, 0,83 und 0,56 kb.

Der DNA-Marker VI, eine Mischung von pBR328 DNA geschnitten mit *BglI* bzw. *Hinfi*, besaß DNA-Fragmente der Längen 2,2, 1,8, 1,2, 1,0 kb und 653, 517, 453, 394, 298, 234, 220 und 154 bp.

TBE-Puffer

89 mM Tris
89 mM Borsäure
2 mM EDTA (Serva)
pH 8,0

Gellade-Puffer (DNA) (5x)**

0,25% Bromphenol Blau
1% SDS
0,1 M EDTA (Serva)
50% Glycerol

Ethidiumbromid-Lösung (1000x)**

Die Stammlösung von Ethidiumbromid (Sigma) betrug 10 mg/ml H₂O. Die Gelfärbelösung betrug 10 µg/ml TBE-Puffer. Die Ethidiumbromid-Lösungen wurden dunkel bei 4°C aufgehoben.

10xSSC

1,5 M NaCl
0,15 M Na-Citrat (pH 7,0)

Denaturierungs-Lösung (Southern Blot)**

0,4 N NaOH
0,6 M NaCl

Neutralisations-Puffer (Southern Blot)

1,5 M NaCl
0,5 M Tris·Cl (pH 7,5)

Isolierung spezifischer DNA-Fragmente

Puffer A

0,2 M NaCl in TE (pH 7,2)

Puffer B

1,0 M NaCl in TE (pH 7,2)

Puffer C

0,5 M NaCl in TE (pH 7,2)

Puffer D

2,0 M NaCl in TE (pH 7,2)

Elutionspuffer

0,5 M Ammonium-Acetat
1 mM EDTA

Der pH-Wert wurde mit Eisessig auf 8,0 eingestellt. Die Lösung wurde dunkel aufbewahrt.

Herstellen, screenen und charakterisieren rekombinanter DNA

Ligase-Puffer

10 mM MgCl₂
0,5 mM ATP
5 mM DTT* (BRL)
50 mM Tris·Cl (pH 7,4)

CIP-Puffer

1 mM MgCl₂
50 mM Tris·Cl (pH 8,5)

Exonuklease III-Puffer

0,66 mM MgCl₂
66 mM Tris·Cl (pH 8,0)

Nuklease S1-Puffer

1 mM ZnSO₄
250 mM NaCl
5 % Glycerin
1 mM Na-Acetat (pH 4,6)

Stopper-Lösung (6x)

20 mM EDTA
80 mM MgCl₂
0,8 M Tris·Cl (pH 8,0)

Sequenz-Verfahren

Die Lösungen für die Sequenzreaktionen sind für die beiden verwendeten Sequenzierungs-Strategien, mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I von *E. coli* bzw. mit dem gentechnologisch hergestellten Enzym Sequenase^R Version 2,0 des Phagen T7, das letzte als Kit von der Firma United States Biochemical Corporation (USB) erhalten, beschrieben worden. Für das Sequenzierungs-Verfahren mit dem Kit Sequenase^R wurde zwei parallele Reaktionen häufig verwendet, die eine mit dem Nukleotid dGTP, bei der anderen wurde das Nukleotid dGTP mit dem Nukleotid dITP ersetzt. Die Bedingungen für die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzierungsprodukte sind für beide Verfahren gleich.

Klenow-Fragment

Denaturierungs-Lösung (Sequenz)**

0,2 M NaOH
0,2 mM EDTA

Hybridisierungs-Puffer

30 mM NaCl
7 mM MgCl₂
10 mM DTT*
0,1 mM EDTA
7 mM Tris·Cl (pH 7,5)

Primer**

Die Primer für das Sequenzieren wurden in steriles Aqua bidest. in der Konzentration 2,5 pmol/µl gelöst und in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

"Sequencing Primer" (-20, 17mer, Biolabs):
5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

"Reverse Sequencing Primer" (16mer, Boehringer):
5'-AACAGCTATGACCATG-3'

Stammlösungen der Nukleotide**

Die Desoxy- und Didesoxynukleotide (Boehringer) wurden als 10 mM Stammlösungen in steriles Aqua bidest. angesetzt und in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

A-Mix

10 µM dATP
100 µM dGTP
100 µM dTTP
200 µM ddATP
in Hybridisierungs-Puffer

C-Mix

100 µM dATP
100 µM dGTP
100 µM dTTP
50 µM ddCTP
in Hybridisierungs-Puffer

G-Mix

100 μ M dATP
5 μ M dGTP
100 μ M dTTP
120 μ M ddGTP
in Hybridisierungs-Puffer

T-Mix

100 μ M dATP
100 μ M dGTP
10 μ M dTTP
240 μ M ddTTP
in Hybridisierungs-Puffer

Verlängerungs-Lösung ("Chase")

31,25 μ M dATP
31,25 μ M dCTP
31,25 μ M dGTP
31,25 μ M dTTP

Kit „Sequenase^R Version 2,0“ (USB)

Denaturierungs-Lösung^{**}

0,2 M NaOH
2 mM EDTA

Sequenzierungs-Puffer

20 mM MgCl₂
50 mM NaCl
40 mM Tris·Cl (pH 7,5)

Enzym Verdünnungs-Puffer

5 mM DTT
0,5 mg/ml BSA
10 mM Tris·Cl (pH 7,5)

Primer (-40, 17-mer)

5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'

Markierungs-Lösung (unverdünnt)

7,5 μ M dGTP bzw. 15 μ M dITP
7,5 μ M dCTP
7,5 μ M dTTP

ddG Terminationsmix

80 μ M dGTP bzw. 160 μ M dITP
80 μ M dATP
80 μ M dCTP
80 μ M dTTP
8 μ M ddGTP bzw. 1,6 μ M ddGTP
50 mM NaCl

ddA Terminationsmix

80 μ M dGTP bzw. 80 μ M dITP
80 μ M dATP
80 μ M dCTP
80 μ M dTTP
8 μ M ddATP
50 mM NaCl

ddT Terminationsmix

80 μ M dGTP bzw. 80 μ M dITP
80 μ M dATP
80 μ M dCTP
80 μ M dTTP
8 μ M ddTTP
50 mM NaCl

ddC Terminationsmix

80 μ M dGTP bzw. 80 μ M dITP
80 μ M dATP
80 μ M dCTP
80 μ M dTTP
8 μ M ddCTP
50 mM NaCl

Elektrophoretische Analyse

Gellade-Puffer (Sequenz)**

98% Formamid
0,05% Bromphenol-Blau
0,05% Xylen-Cyanol
20 mM EDTA (pH 8,0)

Binde-Silan**

0,4% Binde-Silan (γ -methacryloxy-propyltrimethoxysilane; Sigma)
0,3% Essigsäure
in Äthanol

Repel-Silane**

4% Dimethyldichlorosilane (Sigma)
in Chloroform

TBE-Puffer (Sequenz)

1 mM EDTA
83 mM Borsäure
0,1 M Tris·Cl (pH 8,8)

RNA-Verfahren

Extraktions-Puffer (RNA)*

4 M Guanidin Isothiocyanat (BRL, ultrapur)
25 mM EDTA
0,5% Lauroylsarcosine (Sigma)
0,1 M 2-Mercaptoäthanol (Sigma)

Die Lösung wurde immer frisch angesetzt und vor die Zugabe von Mercaptoäthanol filtriert (0,8 µm; Sartorius).

5,7 M CsCl*

Das CsCl wurde mit sterilem, DEPC-behandeltem Wasser angesetzt und anschließend filtriert (0,8 µm; Sartorius).

Lade-Puffer [Oligo-(dT)-Cellulose]

0,5 M NaCl
1 mM EDTA
0,1% SDS**
20 mM Tris·Cl (pH 7,6)

MAE-Puffer

0,2 M MOPS (Sigma)
0,05 M Na-Acetat
0,01 M EDTA

Der pH-Wert wurde für 1 Liter MAE-Puffer mit 10-15 NaOH-Plätzchen auf 6,5-7,0 eingestellt. Für die pH-Messung wurde nur ein Aliquot des MAE-Puffers verwendet und anschließend der Aliquot verworfen.

Gellade-Puffer (RNA)**

48% Formamide
6,4% Formaldehyd
5,3% Glycerol
0,05% Bromphenolblau
in MAE-Puffer

RNA-Längenstandards (Boehringer)

Der RNA-Marker I besitzt RNA mit den Längen 7,4, 5,3, 2,8, 1,9, 1,6, 1,0, 0,6, 0,4, und 0,3 kb. Der Marker II besitzt die fünf längsten und Marker III die fünf kürzesten Längenstandards von Marker I.

Auffinden spezifischer Sequenzen gebunden an Filtermembranen (Southern und Northern Blot Analysen, Genbibliothek-Durchmusterung)

Nick-Translation (Amersham, N-5000)

100 ng Insert
20 µM dATP
20 µM dGTP
20 µM cTTP
0,33 µM [α -³²P]dCTP, 20 µCi (3000 Ci/mmol, Amersham)
0,5 U DNA Polymerase I
10 pg DNase I
30 mM MgCl₂
0,4% Mercaptoäthanol
0,15 M Tris·Cl (pH 7,7)

Formamid**

Formamid wurde immer frisch entionisiert verwendet. Mit einem Ionenaustauscher (Bio-Rad, AG 501-X8) wurde das Formamid für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter intensivem Rühren behandelt (1 g/10 ml) und anschließend von dem Ionenaustauscher durch eine Filtration (Schleicher & Schüll, Rundfilter 100) getrennt.

Dextransulfat**

50% Dextransulfat (Pharmacia) wurde in steriles, bidestilliertes Wasser angesetzt und bei -20°C aufbewahrt.

Natriumdodecylsulfat (SDS)**

Eine Stammlösung von 20% SDS in H₂O wurde angesetzt. Eine Erwärmung auf 68°C erleichterte das Auflösen. Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Salzsäure (HCl) auf 7,2 eingestellt.

Kalbsthymus-DNA**

10 mg/ml Kalbsthymus-DNA (Serva) wurde in Aqua bidest. gelöst und mit Ultraschallen, bis eine durchschnittliche Fragmenten-Länge von 1-5 kb erreicht war, geschert.

Vorhybridisierungs-Lösung**

43% oder 50% Formamid
10% Dextran Sulfat
1 % SDS
1 M NaCl

Nach 10 Minuten Inkubation bei 42°C wurde eine Lösung von Formamid, Dextransulfat und SDS mit dem NaCl versehen und für 15 Minuten bei 42°C weiter inkubiert.

"Stripping"-Lösung**

50% Formamid
3xSSC
0,5% SDS

Zellkultur-Verfahren

Nährmedium*

Eine Mischung von MEM Dulbecco und F12 (1:1), beide von der Firma Boehringer, wurde als Zuchtmedium benutzt. Es wurde mit 2,438 g NaHCO₃ pro Liter und 10% fötales Kälberserum (Boehringer) versetzt. Der pH-Wert wurde mit 0,1 M NaOH oder 0,1 M HCl auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde das Medium sterilfiltriert und portionsweise bei -20°C eingefroren.

Streptomycin/Penicillin-Stammlösung (100x)*

Streptomycin/Penicillin (500 mg/500000 U; Boehringer) wurden mit 50 ml destilliertem Wasser angesetzt, sterilfiltriert und in kleinen Portionen bei -20 °C aufbewahrt.

Retinsäure (100x)**

Retinsäure (Serva) wurde in der Konzentration 1 mM in absolutem Äthanol angesetzt und dunkel bei 4°C aufbewahrt.

PBS (Boehringer)

8,00 g NaCl
0,20 g KCl
1,44 g Na₂HPO₄·2H₂O
0,20 g KH₂PO₄

ABKÜRZUNGEN

DNA/Gen-Bezeichnungen

| | |
|-----------------------------------|---|
| <i>abd-A</i> | abdominal-A |
| <i>Abd-B</i> | Abdominal-B |
| <i>ANT-C</i> | Antennapedia-Complex |
| <i>Antp</i> | Antennapedia |
| <i>bcd</i> | bicoid |
| <i>Bkm</i> | banded krait minor satellite |
| <i>BX-C</i> | Bithorax-Complex |
| <i>CDKN2</i> | cyclin-dependent kinase inhibitor 2 |
| <i>Cdx</i> | caudal-type homeobox |
| <i>Dfd</i> | Deformed |
| <i>Diff</i> | differenzierung-induzierendes Gen, gleich <i>R_{Diff}</i> |
| <i>EGFR</i> | epidermal growth factor receptor |
| <i>en</i> | engrailed |
| <i>erb</i> | erythroblastosis (virus) |
| <i>erb^{*a}</i> | ”accessory” <i>erb[*]</i> -Gen |
| <i>erb^{*i}</i> | ”indispensable” <i>erb[*]</i> -Gen |
| <i>ftz</i> | fushi tarazu |
| <i>g</i> | golden |
| <i>Gsx</i> | genomic screened homöobox |
| <i>hb</i> | hunchback |
| <i>HOM-C</i> | homöotischer Gen-Cluster |
| <i>HOX, Hox</i> | Homöobox-Gen der HOX-Cluster |
| <i>HOX-Cluster</i> | Cluster mit Hox-Genen |
| <i>I-Gene</i> | intensifying genes |
| <i>Ipf-1</i> | insulin promoting factor 1 |
| <i>lab</i> | labial |
| <i>LG 24</i> | linkage group 24 |
| <i>MITF</i> | Microphtalmia-associated transcription factor |
| <i>onc</i> | oncogene |
| <i>Pax</i> | Gen(e) mit einer paired Box |
| <i>pb</i> | proboscipedia |
| <i>pbx</i> | pre-B-cell leukemia transcription factor |
| <i>pdx-1</i> | pancreas and duodenal homeobox gene 1 |
| <i>PI</i> | phosphatidylinositol |
| <i>prd</i> | paired |
| <i>Ptr</i> | Pterinophoren-Locus |
| <i>R_{Co}</i> | kompartiments-spezifische regulatorische Gene |
| <i>R_{Df}</i> | <i>R_{Co}</i> der dorsalen Flosse |
| <i>R_{Df}^r</i> | <i>R_{Co}</i> der dorsalen Flosse, mutiert |
| <i>R_{Diff}</i> | regulatorisches Gen der Differenzierung |
| <i>R_{Gew}</i> | gewebs-spezifische regulatorische Gene |
| <i>R_{Epi}</i> | epitheleales regulatorisches Gen |
| <i>R_{mel}</i> | regulatorisches Gen der Melanophoren |

ANHANG

| | |
|-------------------------|---|
| <i>R_{mel}'</i> | regulatorisches Gen der Melanophoren, mutiert |
| <i>R_{mes}</i> | mesenchymales regulatorisches Gen |
| <i>R_{neu}</i> | neurales regulatorisches Gen |
| <i>R_{Pp}'</i> | R _{Co} des hinteren Körperteils (posterior part) |
| <i>Scr</i> | Sex combs reduced |
| SSR | simple sequence repeat |
| <i>Tu</i> -Gen | Tumor-Gen |
| <i>Tu</i> -Komplex | Tumor-Komplex |
| <i>Ubx</i> | <i>Ultrabithorax</i> |
| <i>Xi-X</i> | <i>Xiphophorus</i> , X-Chromosom |
| <i>Xiox</i> | <i>Xiphophorus</i> , Homöobox |
| <i>Xlox</i> | von XIHbox 8: <i>Xenopus laevis</i> homeobox |
| <i>Xmrk</i> | <i>Xiphophorus melanoma</i> receptor kinase |

Pigmentzell-Loci

| | |
|---------------------------|-------------------------------|
| <i>Ar</i> | anal red |
| <i>Br</i> | brown |
| <i>Db</i> | dabbed |
| <i>Dr</i> | dorsal red |
| <i>DrSd^{rec}</i> | <i>DrSd</i> , rekombiniert |
| <i>Dy</i> | diluted yellow |
| <i>Li</i> | lineatus |
| <i>Ni</i> | nigra |
| <i>Ni^e</i> | nigra extended |
| <i>Or</i> | orange |
| <i>Pu</i> | punctatus |
| <i>Sd</i> | spotted dorsal |
| <i>Sd'</i> | spotted dorsal, mutiert |
| <i>Sd^T</i> | <i>Sd</i> -Locus, tranloziert |
| <i>Sp</i> | spotted |
| <i>Sr</i> | striped |
| <i>Sr'</i> | striped, mutiert |
| <i>Ye</i> | yellow |

ANHANG

Aminosäuren (Drei- und Ein-Buchstabencode)

| | | | | | |
|-----------|-----|---|--------------|-----|---|
| Alanin | Ala | A | Leucin | Leu | L |
| Arginin | Arg | R | Lysin | Lys | K |
| Asparagin | Asn | N | Methionin | Met | M |
| Aspartat | Asp | D | Phenylalanin | Phe | F |
| Cystein | Cys | C | Prolin | Pro | P |
| Glutamin | Gln | Q | Serin | Ser | S |
| Glutamat | Glu | E | Threonin | Thr | T |
| Glycin | Gly | G | Tryptophan | Trp | W |
| Histidin | His | H | Tyrosin | Tyr | Y |
| Isoleucin | Ile | I | Valin | Val | V |

Diverse

| | |
|--------------------|----------------------------------|
| As | Aminosäure |
| BC | Rückkreuzung |
| BMP | bone morphogenetic protein |
| bp | Basenpaare |
| Ci | Curie |
| CIP | calf intestine.phosphatase |
| Co | Kompartiment(e) |
| cpm | counts per minute |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DTT | Dithiothreitol |
| EC | embryonale Karzinom-Zelllinie |
| Ed | Erythrophoren determiniert |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EST | expressed sequence tag |
| <i>et al.</i> | <i>et alii</i> (und andere) |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| ff. | folgende (Seiten) |
| HS | hellerispezifisch |
| kb | Kilobasen |
| LMP | low melting point |
| LOH | loss of heterozygosity |
| Mad | Makromelanophoren determiniert |
| MAE | Mops-aceticacid-EDTA |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| Melanoblasten: | |
| S-Melanoblasten | “stem“-Melanoblasten |
| I-Melanoblasten | “intermediate“-Melanoblasten |
| A-Melanoblasten | “advanced“-Melanoblasten |
| Tr-I-Melanoblasten | transformierte I-Melanoblasten |
| Tr-A-Melanoblasten | transformierte A-Melanoblasten |
| Tr-Melanocyten | transformierte Melanocyten |
| Tr-Melanophoren | transformierte Melanophoren |

ANHANG

| | |
|-------------|---|
| MOPS | γ -Morpholinopropansulfonsäure |
| MSH | melanocyte stimulating hormone |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| nt | Nukleotide |
| Nukleotide: | |
| ((d)d)ATP | ((di)desoxy)adenosintriphosphat |
| ((d)d)CTP | ((di)desoxy)cytosintriphosphat |
| ((d)d)GTP | ((di)desoxy)guanintriphosphat |
| ((d)d)ITP | ((di)desoxy)inosintriphosphat |
| ((d)d)TTP | ((di)desoxy)thymintriphosphat |
| OD | optische Dichte |
| <i>p</i> | Plasmid |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PEG | Polyethylenglykol |
| <i>pfu</i> | plaque forming unit(s) |
| P-Locus | pituitary-locus |
| PS | platyspezifisch |
| PSPL | platyspezifische Pigmentzellloci |
| PSPM | platyspezifische Pigmentzellmuster |
| RACE | rapid amplification of cDNA ends |
| RARE | Retinsäure Responselement |
| RFLP | Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus |
| SDS | sodiumdodecylsulfate |
| SSC | sodium salt citrate |
| TALE | three amino acid loop extension |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin |
| TPA | 12-O-tetradecanoye-phorboe-13-acetat |
| Tris | Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan |
| U | Unit |
| UV | Ultraviolett |
| TE | Tris-EDTA |
| v | Volumen |
| VNTR | variable number of tandem repeats |
| w | Gewicht |
| x g | Vielfaches der Erdbeschleunigung |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid |

8. LITERATURVERZEICHNIS

Abate-Shen, C. (2003): Homeobox genes and cancer: new OCTaves for an old tune. *Cancer Cell* 4, 329-330.

Abzhanov, A., Kaufman, T.C. (1999): Homeotic genes and the arthropod head: expression patterns of the *labial*, *proboscipedia*, and *Deformed* genes in crustaceans and insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 10224-10229.

Adam, D., Mäueler, W., Schartl, M. (1991): Transcriptional activation of the melanoma inducing *Xmrk* oncogene in *Xiphophorus*. *Oncogene* 6, 73-80.

Adam, D., Dimitrijevic, N., Schartl, M. (1993): Tumor suppression in *Xiphophorus* by an accidentally acquired promoter. *Science* 259, 816-818.

Ahlgren, U., Jonsson, J., Edlund, H. (1996): The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in *IPF1/PDX1*-deficient mice. *Development* 122, 1409-1416.

Akam, M. (1987): The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* 101, 1-22.

Akam, M. (1989): *Hox* and *HOM*: Homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell* 57, 347-349.

Alani, E., Reenan, R.A.G., Kolodner, R.D. (1994): Interaction between mismatch repair and genetic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137, 19-39.

Ali, S., Müller, C.R., Epplen, J.T. (1986): DNA finger printing by oligonucleotide probes specific for simple repeats. *Hum Genet* 74, 239-243.

Aloni-Grinstein, R., Zan-Bar, R., Alboum, I., Goldfinger, N., Rotter, V. (1993): Wild-type p53 functions as a control protein in the differentiation pathway of the B-cell lineage. *Oncogene* 8, 3297-3305.

Amores, A., Force, A., Yan, Y.-L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R.K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y.-L., Westerfield, M., Ekker, M., Postlethwait, J.H. (1998): Zebrafish *hox* clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 282, 1711-1714.

Amores, A., Suzuki, T., Yan, Y., Pomeroy, J., Singer, A., Amemiya, C., Postlethwait, J.H. (2004): Developmental roles of pufferfish *Hox* clusters and genome evolution in ray-fin fish. *Genome Res* 14, 1-10.

Anders, A., Anders, F. (1978): Etiology of cancer as studied in the platyfish-swordtail system. *Biochim Biophys Acta* 516, 61-95.

LITERATURVERZEICHNIS

Anders, A., Anders, F., Klinke, K. (1973a): Regulation of gene expression in the Gordon-Kosswig melanoma system. I. The distribution of the controlling genes in the genome of the xiphophorin fish, *Platypoecilus maculatus* and *Platypoecilus variatus*. In "Genetics and mutagenesis of fish." Schröder, J.H. (ed.), Springer-Verlag, Heidelberg, New York, pp. 33-52.

Anders, A., Anders, F., Klinke, K. (1973b): Regulation of gene expression in the Gordon-Kosswig melanoma system. II. The arrangement of chromatophore determining loci and regulating elements in the sex chromosomes of xiphophorin fish, *Platypoecilus maculatus* and *Platypoecilus variatus*. In "Genetics and mutagenesis of fish." Schröder, J.H. (ed.), Springer-Verlag, Heidelberg, New York, pp. 53-63.

Anders, A., Dess, G., Nishimura, S., Kersten, H. (1985): A molecular approach to the study of malignancy and benignancy in melanoma of *Xiphophorus*. In "Pigment Cell 1985." Bagnara, J., Klaus, S.N., Paul, E., Schartl, M. (eds.), University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 315-324.

Anders, A., Gröger, H., Anders, F., Zechel, C., Smith, A., Schlatterer, B. (1991a): Discrimination of initiating and promoting carcinogens in fish. *Ann Rech Vet* 22, 273-294.

Anders, A., Zechel, C., Schlatterer, B., Gröger, H., Schmidt, D., Smith, A., Anders, F. (1991b): Genetic and molecular approach for breeding and use of laboratory fish for the detection of agents with carcinogenic and or promoting activity. *Bull Cancer* 78, 415-433.

Anders, A., Gröger, H., Fleming, C., Schneider, H., Renschler, A., Anders, F. (1994a): Development and regression of neoplasia in the platyfish-swordtail model. Rao, R.S., Deo, M.G., Sanghvi, L.D., Mitra, I. (eds.), XVI. International Cancer Congress, New Delhi (India), pp. 133-137.

Anders, A., Petry, H., Fleming, C., Petry, K., Brix, P., Lüke, W., Gröger, H., Schneider, E., Kiefer, J., Anders, F. (1994b): Increasing melanoma incidence: putatively explainable by retrotransposons. Experimental contributions of the xiphophorine Gordon-Kosswig melanoma system. *Pigment Cell Res* 7, 433-450.

Anders, F. (1967): Tumour formation in platyfish-swordtail hybrids as a problem of gene regulation. *Experientia* 23, 1-10.

Anders, F. (1983): The biology of an oncogene, based upon studies on neoplasia in *Xiphophorus*. In „Modern Trends in Human Leukemia V.“ Neth, R. *et al.* (eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. *Haematology and Blood Transfusion* 28, pp. 186-206.

Anders, F. (1989): The Mildred Scheel 1988 memorial lecture. A biologist's view of human cancer. In „Modern Trends in Human Leukemia VIII.“ Neth, R., Gallo, R.C., Greaves, M.F., Gaedicke, G., Gohla, S., Mannweiler, K., Ritter, J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 23-45.

Anders, F. (1991): Contributions of the Gordon-Kosswig melanoma system to the present concept of neoplasia. *Pigment Cell Res* 3, 7-29.

Anders, F., Zechel, C. (1994): Oncogenes in melanoma. In „Malignant melanoma: medical and surgical management.“ Lejeune, F.J., Chaudhuri, P.K., Das Gupta, T.K. (eds.), McGraw-Hill, Inc., New York, pp. 51-64.

LITERATURVERZEICHNIS

Anders, F., Klinke, K., Vielkind, U. (1972): Genregulation und Differenzierung im Melanom-System der Zahnkärpflinge. *Biol Zeit* 2, 35-45.

Anders, F., Anders, A., Vielkind, U. (1974): Regulation of tumor expression in the Gordon-Kosswig melanoma system, and the origin of malignancy. XI. International Cancer Congress, Florence, Panels 3, pp. 305-306.

Anders, F., Diehl, H., Scholl, E. (1980): Differentiation of normal melanophores and neoplastically transformed melanophores in the skin of fishes of genus *Xiphophorus*. In "The Skin of Vertebrates." Spearman, R.I.C. and Riley, P.A. (eds.), Linnean Soc Symp Ser 9, pp. 211-224.

Anders, F., Chatterjee, K., Schwab, M., Scholl, E., Anders, A. (1981): Tumor gene expression and interphase chromatin appearance in *Xiphophorus*. *Amer Zool* 21, 535-548.

Anders, F., Scharl, M., Barnekow, A., Anders, A. (1984): *Xiphophorus* as an *in vivo* model for studies on normal and defective control of oncogenes. *Adv Cancer Res* 42, 191-275.

Anders, F., Scharl, M., Barnekow, A., Schmidt, C.R., Lüke, W., Jaenel-Dess, G., Anders, A. (1985): The genes that carcinogenes act upon. In „Modern Trends in Human Leukemia VI.“ Neth, R., Gallo, R.C., Greaves, M.F., Janka, G. (eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. *Haematology and Blood Transfusion* 29, pp. 228-252.

Anders, F., Fleming, C., Petry, H., Petry, K., Lüke, W., Brix, P., Schneider, H., Gröger, H., Schneider, E., Kiefer, J., Anders, A. (1994): Increasing tumor incidences putatively explainable by retrotransposons. Rao, R.S., Deo, M.G., Sanghvi, L.D., Mitra, I. (eds.), XVI. International Cancer Congress, New Delhi (India), pp. 127-131.

Andrew, S.E., Goldberg, Y.P., Theilmann, J., Zeisler, J., Hayden, M.R. (1994): A CCG repeat polymorphism adjacent to the CAG repeat in the Huntington disease gene: implications for diagnostic accuracy and predictive testing. *Hum Mol Genet* 3, 65-67.

Aparicio, S., Hawker, K., Cottage, A., Mikawa, Y., Zuo, L., Venkatesh, B., Chen, E., Krumlauf, R., Brenner, S. (1997): Organization of the *Fugu ribripes Hox* complexes: evidence for continuing evolution of vertebrate *Hox* complexes. *Nat Genet* 16, 79-83.

Arantes, V.C., Teixeira, V.P.A., Reis, M.A.B., Latorraca, M.Q., Leite, A.R., Carneiro, E.M., Yamada, A.T., Boschero, A.C. (2002): Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation. *J Nutr* 132, 3030-3035.

Argiropoulos, B., Humphries, R.K. (2007): Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* 26, 6766-6776.

Armstrong, B.K., Kricker, A. (1993): How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma Res* 3, 395-401.

Arnemann, J., Jakubiczka, S., Schmidtke, J., Schäfer, R., Epplen, J.T. (1986): Clustered GATA repeats (*Bkm* sequences) on the human Y chromosome. *Hum Genet* 73, 301-303.

LITERATURVERZEICHNIS

- Atz, J.W. (1962): Effects of hybridization on pigmentation in fishes of the genus *Xiphophorus*. *Zoologica* (NY) 47, 153-181.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1989): „Current protocols in molecular biology.“ John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Aviv, H., Leder, P. (1972): Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 69, 1408-1412.
- Awgulewitsch, A., Utset, M.F., Hart, C.P., McGinnis, W., Ruddle, F.H. (1986): Spatial restriction in expression of a mouse homoeo box locus within the central nervous system. *Nature* 320, 328-335.
- Bachrati, C.Z., Hickson, I.D. (2003): RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochem J* 374, 577-606.
- Baker, S.M., Bronner, C.E., Zhang, L., Plug, A.W., Robatzek, M., Warren, G., Elliott, E.A., Yu, J., Ashley, T., Arnheim, N., Flavell, R.A., Liskay, R.M. (1995): Male mice defective in the DNA mismatch repair gene *PMS2* exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell* 82, 309-319.
- Balmain, A., Gray, J., Ponder, B. (2003): The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet* 33, 238-244.
- Banerjee-Basu, S., Ryan, J.F., Baxevanis, A.D. (2000): The Homeodomain Resource: a prototype database for a large protein family. *Nucleic Acids Res* 28, 329-330.
- Banerjee-Basu, S., Moreland, T., Hsu, B.J., Trout, K.L., Baxevanis, A.D. (2003): The homeodomain resource: 2003 update. *Nucleic Acids Res* 31, 304-306.
- Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J.N., Ried, T., Tagle, D., Wynshaw-Boris, A. (1996): *Atm*-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* 86, 159-171.
- Barron, L.H., Rae, A., Holloway, S., Brock, D.J.H., Warner, J.P. (1994): A single allele from the polymorphic CCG rich sequence immediately 3' to the unstable CAG trinucleotide in the IT 15 cDNA shows almost complete disequilibrium with Huntington's disease chromosomes in the Scottish population. *Hum Mol Genet* 3, 173-175.
- Basolo, A.L. (2006): Genetic linkage and color polymorphism in the southern platyfish (*Xiphophorus maculatus*): a model system for studies of color pattern evolution. *Zebrafish* 3, 65-84.
- Bateson, W. (1894): *Materials for the study of variation*. New York: Macmillan.
- Baur, J.A., Wright, W.E., Shay, J.W. (2004): Analysis of mammalian telomere position effect. *Methods Mol Biol* 287, 121-136.
- Baxter, L.L., Hou, L., Lofthus, S.K., Pavan, W.J. (2004): Spotlight on spotted mice: a review of white spotting mouse mutants and associated human pigmentation disorders. *Pigment Cell Res* 17, 215-224.

LITERATURVERZEICHNIS

- Benton, W.D., Davis, R.W. (1977): Screening lambda-gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* 196, 180-182.
- Bertwistle, D., Ashworth, A. (1998): Functions of the *BRCA1* and *BRCA2* genes. *Curr Opin Genet Dev* 8, 14-20.
- Biemar, F., Argenton, F., Schmidtke, R., Epperlein, S., Peers, B., Driever, W. (2001): Pancreas development in zebrafish: early dispersed appearance of endocrine hormone expressing cells and their convergence to form the definitive islet. *Dev Biol* 230, 189-203.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Blin, W., Stafford, D.W. (1976): A general method for isolation of high molecular weight DNA from eucaryotes. *Nucleic Acids Res* 3, 2303-2309.
- Bodner, M., Castrillo, J.-L., Theill, L.E., Deerinck, T., Ellisman, M., Karin, M. (1988): The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* 55, 505-518.
- Bolivar, F., Backman, K. (1979): Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol* 68, 245-267.
- Boncinelli, E., Simeone, A., Acampora, D., Mavilio, F. (1991): *HOX* gene activation by retinoic acid. *Trends Genet* 7, 329-334.
- Bordogna, W., Hudson, J.D., Buddle, J., Bennett, D.C., Beach, D.H., Carnero, A. (2005): *EMX* homeobox genes regulate microphthalmia and alter melanocyte biology. *Exp Cell Res* 311, 27-38.
- Boyer, H.W., Roulland-Dussoix (1969): A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41, 459-472.
- Braasch, I., Salzburger, W., Meyer, A. (2006): Asymmetric evolution in two fish-specifically duplicated receptor tyrosine kinase paralogs involved in teleost coloration. *Mol Biol Evol* 23, 1192-1202.
- Braasch, I., Schartl, M., Volff, J.N. (2007): Evolution of pigment synthesis pathways by gene and genome duplication in fish. *BMC Evol Biol* 7, 74.
- Brakefield, P.M., Gates, J., Keys, D., Kesbeke, F., Wijngaarden, P.J., Monteiro, A., French, V., Carroll, S.B. (1996): Development, plasticity and evolution of butterfly eyespot patterns. *Nature* 384, 236-242.
- Breider, H., Seeliger, R. (1938): Die Farbzellen der Gattungen *Xiphophorus* und *Platypoecilus* und deren Bastarde. *Z Wiss Zool A* 151, 243-285.
- Brix, P. (1986): Untersuchungen an Xanthophoren, Xanthoerythrophoren und deren Pterinosomen bei verschiedenen Genotypen der Gattung *Xiphophorus* (Pisces) unter dem Einfluß des *golden* Gens (*g*). Diplomarbeit, Universität Gießen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.-P., Hudson, T., *et al.* (1992): Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 799-808.
- Brooke, N.M., Garcia-Fernández, J., Holland, P.W.H. (1998): The *ParaHox* gene cluster is an evolutionary sister of the *Hox* gene cluster. *Nature* 392, 920-922.
- Bruford, M.W., Wayne, R.K. (1993): Microsatellites and their application to population genetic studies. *Curr Opin Genet Dev* 3, 939-943.
- Burcin, M. (1991): Untersuchungen zur Struktur des zur Thyroidhormonrezeptor-Genfamilie gehörenden Genes *x-thr-3*. Diplomarbeit, Universität Gießen.
- Bürglin, T. (1993): A comprehensive classification of homeobox genes. In "Guide to the homeobox genes." Duboule, D. (ed.), Oxford Univ. Press, Oxford.
- Bürglin, T.R., Ruvkun, G. (1993): The *Caenorhabditis elegans* homeobox gene Cluster. *Curr Opin Genet Dev* 3, 615-620.
- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., Phillips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C., Sutherland, G.R. (1993): Incidence and origin of 'null alleles' in the (AC)*n* microsatellite markers. *Am J Hum Genet* 52, 922-927.
- Canapa, A., Biscotti, M.A., Olmo, E., Barucca, M. (2005): Isolation of *Hox* and *ParaHox* genes in the bivalve *Pecten maximus*. *Gene* 348, 83-88.
- Carè, A., Silvani, A., Meccia, E., Mattia, G., Stoppacciaro, A., Parmiani, G., Peschle, C., Colombo, M.P. (1996): HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cell Biol* 16, 4842-4851.
- Carè, A., Felicetti, F., Meccia, E., Bottero, L., Parenza, M., Stoppacciaro, A., Peschle, C., Colombo, M.P. (2001): HOXB7: a key factor for tumor-associated angiogenic switch. *Cancer Res* 61, 6532-6539.
- Carney, J.P., Maser, R.S., Olivares, H., Davis, E.M., Le Beau, M., Yates, J.R. 3rd, Hays, L., Morgan, W.F., Petrini, J.H.J. (1998): The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen Breakage Syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93, 477-486.
- Carpenter, A.T.C. (1979): Recombination nodules and synaptonemal complex in recombination-defective females of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* 75, 259-292.
- Carr, A.M. (1996): Checkpoints take the next step. *Science* 271, 314-315.
- Carrasco, A.E., McGinnis, W., Gehring, W.J., De Robertis, E.M. (1984): Cloning of an *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes. *Cell* 37, 409-414.

LITERATURVERZEICHNIS

- Carroll, S.B., Grenier, J.K., Weatherbee, S.D. (2005): In „From DNA to diversity.“ Carroll, S. (ed.), Blackwell Science, London, pp. 1-214.
- Casselton, L.A., Olesnicky, N.S. (1998): Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 55-70.
- Chakraborty, R., De Andrade, M., Daiger, S.P., Budowle, B. (1992): Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Am J Hum Genet* 56, 45-57.
- Chandra, H.S. (1985): Sex determination: a hypothesis based on noncoding DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 1165-1169.
- Charames, G.S., Bapat, B. (2003): Genomic instability and cancer. *Curr Mol Med* 3, 589-596.
- Chauhan, C., Dash, D., Grover, D., Rajamani, J., Mukerji, M. (2002): Origin and instability of GAA repeats: insights from *Alu* elements. *J Biomol Struct Dyn* 20, 253-264.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., Rutter, W.J. (1979): Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- Chung, M., Ranum, L.P.W., Duvick, L.A., Servadio, A., Zoghbi, H.Y., Orr, H.T. (1993): Evidence for a mechanism predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. *Nat Genet* 5, 254-258.
- Cleary, J.D., Pearson, C.E. (2003): The contribution of *cis*-elements to disease-associated repeat instability: clinical and experimental evidence. *Cytogenet Genome Res* 100, 25-55.
- Clewell, D.B., Helinski, D.R. (1969): Supercoiled circular DNA-protein complex in *Escheria coli*: purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc Natl Acad Sci USA* 62, 1159-1166.
- Cliby, W.A., Roberts, C.J., Cimprich, K.A., Stringer, C.M., Lamb, J.R., Schreiber, S.L., Friend, S.H. (1998): Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *EMBO J* 17, 159-169.
- Cobb, J., Duboule, D. (2005): Comparative analysis of genes downstream of the *Hoxd* cluster in developing digits and external genitalia. *Development* 132, 3055-3067.
- Connor, F., Bertwistle, D., Mee, P.J., Ross, G.M., Swift, S., Grigorieva, E., Tybulewicz, V.L., Ashworth, A. (1997): Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating *Brca2* mutation. *Nat Genet* 17, 423-430.
- Coulier, F., Burtey, S., Chaffanet, M., Birg, F., Birnbaum, D. (2000): Ancestrally-duplicated para*HOX* gene clusters in humans. *Int J Oncol* 17, 439-444.
- Dahms, Kerstin (1985): Schwesterchromatidaustausch bei verschiedenen Genotypen von *Xiphophorus* (Pisces, *Poeciliidae*). Diplomarbeit, Universität Gießen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Dasika, G.K., Lin, S.-C.J., Zhao, S., Sung, P., Tomkinson, A., Lee, E.Y.-H.P. (1999): DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 18, 7883-7899.
- Davies, S.L., North, P.S., Dart, A., Lakin, N.D., Hickson, I.D. (2004): Phosphorylation of the Bloom's syndrome helicase and its role in recovery from S-phase arrest. *Mol Cell Biol* 24, 1279-1291.
- Davis, L.G., Dibner, M.D., Battey, J.F. (1986): „Basic methods in molecular biology.“ Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.
- de Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M., te Riele, H. (1995): Inactivation of the mouse *Msh2* gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell* 82, 321-330.
- Deng, C.X., Brodie, S.G. (2000): Roles of BRCA1 and its interacting proteins. *Bioessays* 22, 728-737.
- Deschamps, J., Meijlink, F. (1992): Mammalian homeobox genes in normal development and neoplasia. *Crit Rev Oncog* 3, 117-173.
- Deschamps, J., van Nes, J. (2005) : Developmental regulation of the *Hox* genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development* 132, 2931-2942.
- DeStefano, A.L., Cupples, L.A., Arnos, K.S., Asher, J.H. Jr., Baldwin, C.T., Blanton, S., Carey, M.L., da Silva, E.O., Friedman, T.B., Greenberg, J., *et al.*, (1998): Correlation between Waardenburg syndrome phenotype and genotype in a population of individuals with identified *PAX3* mutations. *Hum Genet* 102, 499-506.
- Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M., Lora, J., Zaret, K.S. (2001): A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 128, 871-881.
- Di Lauro, R., Damante, G., De Felice, M., Arnone, M.I., Sato, K., Lonigro, R., Zannini, M. (1995): Molecular events in the differentiation of the thyroid gland. *J Endocrinol Invest* 18, 117-119.
- Diehl, H. (1980): Über den zellulären Ursprung der Melanome von *Xiphophorus*. Untersuchung der Differenzierung normaler und neoplastisch transformierter Melanophoren bei verschiedenen Genotypen. Dissertation, Universität Gießen.
- Dietmaier, W., Wallinger, S., Bocker, T., Kullmann, F., Fishel, R., Ruschoff, J. (1997): Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 57, 4749-4756.
- Dillon, N., Festenstein, R. (2002): Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet.* 18, 252-258.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A. Jr., Butel, J.S., Bradley, A. (1992): Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.

LITERATURVERZEICHNIS

- Doolittle, W.F., Sapienza, C. (1980): Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 284, 601-603.
- Dorer, D.R., Henikoff, S. (1994): Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing. *Cell* 77, 993-1002.
- Duboule, D., Dollé, P. (1989): The structural and functional organization of the murine *HOX* gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J* 8, 1497-1505.
- Dupe, V., Davenne, M., Brocard, J., Dollé, P., Mark, M., Dierich, A., Chambon, P., Rijli, F.M. (1997): *In vivo* functional analysis of the *Hoxa-1* 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 124, 399-410.
- Dutta, S., Gannon, M., Peers, B., Wright, C., Bonner-Weir, S., Montminy, M. (2001): PDX:PBX complexes are required for normal proliferation of pancreatic cells during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 1065-1070.
- Duval, A., Reperant, M., Hamelin, R. (2002): Comparative analysis of mutation frequency of coding and non-coding short mononucleotide repeats in mismatch repair deficient colorectal cancers. *Oncogene* 21, 8062-8066.
- Edelmann, W., Cohen, P.E., Kane, M., Lau, K., Morrow, B., Bennett, S., Umar, A., Kunkel, T., Cattoretti, G., Chaganti, R., Pollard, J.W., Kolodner, R.D., Kucherlapati, R. (1996): Meiotic pachytene arrest in *MLH1*-deficient mice. *Cell* 85, 1125-1134.
- Eichler, E.E., Holden, J.J.A., Popovich, B.W., Reiss, A.L., Snow, K., Thibodeau, S.N., Richards, C.S., Ward, P.A., Nelson, D.L. (1994): Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the *FMR1* gene. *Nat Genet* 8, 88-94.
- Ellis, N.A., Proytcheva, M., Sanz, M.M., Ye, T.Z., German, J. (1999): Transfection of *BLM* into cultured bloom syndrome cells reduces the sister-chromatid exchange rate toward normal. *Am J Hum Genet* 65, 1368-1374.
- Epplen, J.T., McCarrey, J.R., Sutou, S., Ohno, S. (1982): Base sequence of a cloned snake W-chromosome DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 3798-3802.
- Epplen, J.T., Cellini, A., Romero, S., Ohno, S. (1983): An attempt to approach the molecular mechanisms of primary sex determination: W- and Y-chromosomal conserved simple repetitive DNA sequences and their differential expression in mRNA. *J Exp Zool* 228, 305-312.
- Epplen, J.T., Studer, R., McLaren, A. (1988): Heterogeneity in the *SXR* (*sex-reversal*) locus of the mouse as revealed by synthetic GAC/TA probes. *Genet Res* 51, 239-246.
- Epplen, J.T., Ammer, H., Epplen, C., Kammerbauer, C., Mitreiter, R., Roewer, L., Schwaiger, W., Steimle, V., Zischler, H., Albert, E., *et al.* (1991): In "DNA Fingerprinting: Approaches and Applications". Edited by Burke, T., Dolf, G., Jeffreys, A.J., Wolff, R. (eds.), Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 50-69.

LITERATURVERZEICHNIS

- Essner, J.J., Johnson, R.G., Hackett, P.B. (1999): Overexpression of thyroid hormone receptor alpha 1 during zebrafish embryogenesis disrupts hindbrain patterning and implicates retinoic acid receptors in the control of *hox* gene expression. *Differentiation* 65, 1-11.
- Ferrier, D.E.K. (2004): *Hox* genes: Did the vertebrate ancestor have a *Hox14*? *Curr Biol* 14, 210-211.
- Ferrier, D.E.K., Minguillon, C., Holland, P.W.H., Garcia-Fernández, J. (2000): The amphioxus *Hox* cluster: deuterostome posterior flexibility and *Hox 14*. *Evol Dev* 2, 284-293.
- Filippova, G.N., Thienes, C.P., Penn, B.H., Cho, D.H., Hu, Y.J., Moore, J.M., Klesert, T.R., Lobanenko, V.V., Tapscott, S.J. (2001): CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat Genet* 28, 335-343.
- Finnerty, J.R., Martindale, M.Q. (1998): The evolution of the *Hox* cluster: insights from outgroups. *Curr Opin Genet Dev* 8, 681-687.
- Frischauf, A.M., Lehrach, H., Poustka, A., Murray, N. (1983): Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J Mol Biol* 170, 827-842.
- Froschauer, A., Korting, C., Bernhardt, W., Nanda, I., Schmid, M., Scharl, M., Volf, J.N. (2001): Genomic plasticity and melanoma formation in the fish *Xiphophorus*. *Mar Biotechnol (NY)* 3 (Suppl 1), 72-80.
- Fu, Y.-H., Kuhl, D.P.A., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Richards, S., Verkerk, A.J.M.H., Holden, J.J.A., Fenwick Jr., R.G., Warren, S.T., Oostra, B.A., Nelson, D.L., Caskey, C.T. (1991): Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67, 1047-1058.
- Funahashi, J., Sekido, R., Murai, K., Kamachi, Y., Kondoh, H. (1993): Delta-crystallin enhancer binding protein deltaEF1 is a zinc finger-homeodomain protein implicated in postgastrulation embryogenesis. *Development* 119, 433-446.
- Galibert, M.D., Yavuzer, U., Dexter, T.J., Goding, C.R. (1999): *Pax3* and regulation of the melanocyte-specific tyrosinase-related protein-1 promoter. *J Biol Chem* 274, 26894-26900.
- Gamer, L.W., Wright, C.V. (1993): Murine *Cdx-4* bears striking similarities to the *Drosophila caudal* gene in its homeodomain sequence and early expression pattern. *Mech Dev* 43, 71-81.
- Gamer, L.W., Wright, C.V. (1995): Autonomous endodermal determination in *Xenopus*: Regulation of expression of the pancreatic gene *XIHbox 8*. *Dev Biol* 171, 240-251.
- Garber, R.L., Kuroiwa, A., Gehring, W.J. (1983): Genomic and cDNA clones of the homeotic locus *Antennapedia* in *Drosophila*. *EMBO J* 2, 2027-2036.
- Garcia-Fernández, J. (2005a): *Hox*, *ParaHox*, *ProtoHox*: facts and guesses. *Heredity* 94, 145-152.

LITERATURVERZEICHNIS

- Garcia-Fernández, J. (2005b): The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat Rev Genet* 6, 881-892.
- Gaunt, S.J., Miller, J.R., Powell, D.J., Duboule, D. (1986): Homeo box gene expression in mouse embryos varies with position by the primitive streak stage. *Nature* 324, 662-664.
- Gaunt, S.J., Sharpe, P.T., Duboule, D. (1988): Spatially restricted domains of homeo-gene transcripts in mouse embryos: relation to a segmented body plan. *Development* 104 Suppl., 169-179.
- Gehring, W.J., Qian, Y.Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A.F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G., Wüthrich, K. (1994): Homeodomain-DNA recognition. *Cell* 78, 211-223.
- German, J. (1995): Bloom's syndrome. *Dermatol Clin* 13, 7-18.
- Gerrish, K., Gannon, M., Shih, D., Henderson, E., Stoffel, M., Wright, C.V., Stein, R. (2000): Pancreatic beta cell-specific transcription of the *pdx-1* gene. The role of conserved upstream control regions and their hepatic nuclear factor 3beta sites. *J Biol Chem* 275, 3485-3492.
- Gibson, G. (1999): Insect evolution: Redesigning the fruitfly. *Curr Biol* 9, 86-89.
- Goding, C.R. (2007): Melanocytes: the new Black. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 275-279.
- Goldman, A., Ramsay, M., Jenkins, T. (1995): New founder haplotypes at the myotonic dystrophy locus in southern Africa. *Am J Hum Genet* 56, 1373-1378.
- Gomez, A., Wellbrock, C., Gutbrod, H., Dimitrijevic, N., Schartl, M. (2001): Ligand-independent dimerization and activation of the oncogenic *Xmrk* receptor by two mutations in the extracellular domain. *J Biol Chem* 276, 3333-3340.
- Gordon, M. (1927): The genetics of a viviparous top minnow *Platyphacis*; the inheritance of two kinds of melanophores. *Genetics* 12, 253-283.
- Gordon, M. (1958): A genetic concept for the origin of cancer. *Ann N. Y. Acad Sci* 71, 1213-1222.
- Goutte, C., Johnson, A.D. (1994): Recognition of a DNA operator by a dimer composed of two different homeodomain proteins. *EMBO J.* 13, 1434-1442.
- Graham, A., Papalopulu, N., Krumlauf, R. (1989): The murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 57, 367-378.
- Grapin-Botton, A., Melton, D.A. (2000): Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet* 16, 124-130.
- Gremlich, S., Bonny, C., Waeber, G., Thorens, B. (1997): Fatty acids decrease *IDX-1* expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *J Biol Chem* 272, 30261-30269.

LITERATURVERZEICHNIS

Grewal, S.I., Elgin, S.C. (2007): Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447, 399-406.

Gröger, H. (1987): Isolierung und Charakterisierung von *c-myc* spezifischen Klonen aus einer EMBL4 Genbank von *Xiphophorus maculatus* (*DrLi/Sr''*). Diplomarbeit, Universität Gießen.

Gronau, T. (1987): Untersuchungen zur Organisation, Aktivität und Wirkung des zellulären Onkogens *c-src* im *Xiphophorus*-Tumorsystem. Dissertation, Universität Gießen.

Grunstein, M., Hogness, D. (1975): Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNA's that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 3961-3965.

Gualdi, R., Bossard, P., Zheng, M., Hamada, Y., Coleman, J.R., Zaret, K.S. (1996): Hepatic specification of the gut endoderm *in vitro*: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev* 10, 1670-1682.

Guazzi, S., Price, M., De Felice, M., Damante, G., Mattei, M.-G., Di Lauro, R. (1990): Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO J* 9, 3631-3639.

Guo, L.-H., Yang, R.C.A., Wu, R. (1983): An improved strategy for rapid direct sequencing of both strands of long DNA molecules cloned in a plasmid. *Nucleic Acids Res* 11, 5521-5540.

Gutbrod, H., Scharl, M. (1999): Intragenic sex-chromosomal crossovers of *Xmrk* oncogene alleles affect pigment pattern formation and the severity of melanoma in *Xiphophorus*. *Genetics* 151, 773-783.

Guz, Y., Montminy, M.R., Stein, R., Leonard, J., Gamer, L.W., Wright, C.V.E., Teitelman, G. (1995): Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in β cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* 121, 11-18.

Haber, J.E. (1998): The many interfaces of Mre11. *Cell* 95, 583-586.

Haber, J.E. (2000): Partners and pathways; repairing a double-strand break. *Trends Genet* 16, 259-264.

Hamdoon, N.E.-D.T. (1984): Sister chromatid exchanges in different genotypes of *Xiphophorus* before and after treatment with N-Methyl-N-Nitrosurea. Dissertation, Universität Gießen.

Harley, H.G., Brook, J.D., Rundle, S.A., Crow, S., Reardon, W., Buckler, A.J., Harper, P.S., Housman, D.E. (1992): Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* 355, 545-546.

Harrison, J.C., Haber, J.E. (2006): Surviving the breakup: The DNA damage checkpoint. *Annu Rev Genet* 40, 209-235.

Hart, C.P., Awgulewitsch, A., Fainsod, A., McGinnis, W., Ruddle, F.H. (1985): Homeo box gene complex on mouse chromosome 11: molecular cloning, expression in embryogenesis, and homology to a human homeo box locus. *Cell* 43, 9-18.

LITERATURVERZEICHNIS

- Harvey, R.P., Tabin, C.J., Melton, D.A. (1986): Embryonic expression and nuclear localization of *Xenopus* homeobox (*Xhox*) gene products. *EMBO J* 5, 1237-1244.
- Häussler, G. (1928): Über Melanombildung bei Bastarden von *Xiphophorus helleri* und *Platypoecilus maculatus* var. Rubra. *Klin Wochenschr* 7, 1561-1562.
- Hawley, R.S., Friend, S.H. (1996): Strange bedfellows in even stranger places: the role of ATM in meiotic cells, lymphocytes, tumors, and its functional links to p53. *Genes Dev* 10, 2383-2388.
- Hay, A., Kaur, H., Phillips, A., Hedden, P., Hake, S., Tsiantis, M. (2002): The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans. *Curr Biol* 12, 1557-1565.
- Hennessy, B.T., Mills, G.B. (2006): Ovarian cancer: homeobox genes, autocrine/paracrine growth, and kinase signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1450-1456.
- Henze, M., Rempeters, G., Anders, F. (1977): Pteridines in the skin of xiphophorine fish. *Comp Biochem Physiol* 56B, 35-46.
- Hersh, B.M., Nelson, C.E., Stoll, S.J., Norton, J.E., Albert, T.J., Carroll, S.B. (2007): The UBX-regulated network in the haltere imaginal disc of *D. melangomaster*. *Dev Biol* 302, 717-727.
- Hoegg, S., Meyer, A. (2005): *Hox* clusters as models for vertebrate genome evolution. *Trends Genet* 21, 421-424.
- Hoegg, S., Brinkmann, H., Taylor, J.S., Meyer, A. (2004): Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish. *J Mol Evol* 59, 190-203.
- Hohn, B. (1979): *In vitro* packaging of lambda and cosmid DNA. *Methods Enzymol* 68, 299-309.
- Hohn, B., Murray, K. (1977): Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 3259-3263.
- Holland, P.W.H. (1997): Vertebrate evolution: Something fishy about *Hox* genes. *Curr Biol* 7, 570-572.
- Horb, M.E., Shen, C.-N., Tosh, D., Slack, J.M.W. (2003): Experimental conversion of liver to pancreas. *Curr Biol* 13, 105-115.
- Hornyak, T.J., Hayes, D.J., Chiu, L., Ziff, E.B. (2001): Transcription factors in melanocyte development: distinct roles für *Pax-3* and *Mitf*. *Mech Dev* 101, 47-59.
- Houle, M., Prinos, P., Iulianella, A., Bouchard, N., Lohnes, D. (2000): Retinoic acid regulation of *Cdx1*: an indirect mechanism for retinoids and vertebral specification. *Mol Cell Biol* 20, 6579-6586.
- Hoyt, M.A., Knight, D.M., Das, A., Miller, H.I., Echols, H. (1982): Control of phage Lambda development by stability and synthesis of cII protein: role of the viral cIII and host *hflA*, *himA*, and *himD* genes. *Cell* 31, 565-573.

LITERATURVERZEICHNIS

- Huang, D., Chen, S.W., Langston, A.W., Gudas, L.J. (1998): A conserved retinoic acid responsive element in the murine *Hoxb-1* gene is required for expression in the developing gut. *Development* 125, 3235-3246.
- Hunter, N., Chambers, S.R., Louis, E.J., Borts, R.H. (1996): The mismatch repair system contributes to meiotic sterility in an interspecific yeast hybrid. *EMBO J* 15, 1726-1733.
- Huynh, T.V., Young, R.A., Davis, R.W. (1984): Constructing and screening cDNA libraries in λ -gt10 and λ -gt11. In „DNA cloning techniques: A practical approach.“ Glover, D. (ed.), IRL Press, Oxford, pp. 49-78.
- Ichikawa, Y., Ohtani, H., Miura, I. (1998): The erythrophore in the larval and adult skin of the brown frog, *Rana ornativentris*: its differentiation, migration, and pigmentary organelle formation. *Pigment Cell Res* 11, 345-354.
- Ingham, P.W. (1988): The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* 335, 25-34.
- Ingraham, H.A., Chen, R., Mangalam, J., Elsholtz, H.P., Flynn, S.E., Lin, C.R., Simmons, D.M., Swanson, L., Rosenfeld, M.G. (1988): A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55, 519-529.
- Irvine, S.Q., Warinner, S.A., Hunter, J.D., Martindale, M.Q. (1997): A survey of homeobox genes in *Chaetopterus variopedatus* and analysis of polychaete homeodomains. *Mol Phylogenet Evol* 7, 331-345.
- Jaillon, O., Aury, J.M., Brunet, F., Petit, J.L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E. *et al.* (2004): Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* 431, 946-957.
- Jenner, R.A., Wills, M.A. (2007): Opinion: The choice of model organisms in evo-devo. *Nat Rev Genet* 8, 311-314.
- Jiao, R., Bachrati, C.Z., Pedrazzi, G., Kuster, P., Petkovic, M., Li, J.L., Egli, D., Hickson, I.D., Stagljar, I. (2004): Physical and functional interaction between the Bloom's syndrome gene product and the largest subunit of chromatin assembly factor 1. *Mol Cell Biol* 24, 4710-4719.
- Jodice, C., Malaspina, P., Persichetti, F., Novelletto, A., Spadaro, M., Giunti, P., Morocutti, C., Terrenato, L., Harding, A.E., Frontali, M. (1994): Effect of trinucleotide repeat length and parental sex on phenotypic variation in spinocerebellar ataxia I. *Am J Hum Genet* 54, 959-965.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., Edlund, H. (1994): Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371, 606-609.
- Ju, Z., Wells, M.C., Martinez, A., Hazlewood, L., Walter, R.B. (2005): An *in silico* mining for simple sequence repeats from expressed sequence tags of zebrafish, medaka, *Fundulus* and *Xiphophorus*. *In Silico Biol* 5, 439-463.

LITERATURVERZEICHNIS

- Jung, J., Zheng, M., Goldfarb, M., Zaret, K.S. (1999): Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 284, 1998-2003.
- Kadyk, L.C., Hartwell, L.H. (1992): Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 132, 387-402.
- Kallman, K.D. (1975): The platyfish *Xiphophorus maculatus*. In „Handbook of Genetics 4“, King, R.C. (ed.), Plenum Press, New York, pp. 81-132.
- Kallman, K.D. (1983): The sex determining mechanism of the poeciliid fish, *Xiphophorus montezumae*, and the genetic control of the sexual maturation process and adult size. *Copeia* 1983, 733-769.
- Kallman, K.D., Atz, J.W. (1967): Gene and chromosome homology in fishes of the genus *Xiphophorus*. *Zoologica* 51, 107-135.
- Kallman, K.D., Borkoski, V. (1977): A sex-linked gene controlling the onset of sexual maturity in female and male platyfish (*Xiphophorus maculatus*), fecundity in females and adult size in males. *Genetics* 89, 79-119.
- Kallman, K.D., Schreibman, M.P., Borkoski, V. (1973): Genetic control of gonadotroph differentiation in the platyfish, *Xiphophorus maculatus* (Poeciliidae). *Science* 181, 678-680.
- Kappen, C., Schughart, K., Ruddle, F.H. (1989): Two steps in the evolution of *Antennapedia*-class vertebrate homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 5459-5463.
- Karlsson, O., Thor, S., Norberg, T., Ohlsson, H., Edlund, T. (1990): Insulin gene enhancer binding protein *Isl-1* is a member of proteins containing both a homeo- and Cys-His domain. *Nature* 344, 879-882.
- Karn, J., Brenner, S., Barnett, L., Cesareni, G. (1980): Novel bacteriophage Lambda cloning vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 5172-5176.
- Kaufman, T.C., Lewis, R., Wakimoto, B. (1980): Cytogenetic analysis of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: the homeotic gene complex in polytene chromosomal interval 84A,B. *Genetics* 27, 309-362.
- Kaufman, T.C., Seeger, M., Olsen, G. (1990): Molecular and genetic organization of the *Antennapedia* gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv Genet* 27, 309-362.
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., Kimura, J., Narumiya, S., Kakizuka, A. (1994): CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8, 221-228.
- Kazianis, S., Gutbrod, H., Nairn, R.S., McEntire, B.B., Coletta, L.D., Walter, R.B., Borowsky, R.L., Woodhead, A.D., Setlow, R.B., Schartl, M. (1998): Localization of a *CDKN2* gene in linkage group V of *Xiphophorus* fishes defines it as a candidate for the DIFF tumor suppressor. *Genes Chromosomes Cancer* 22, 210-220.

LITERATURVERZEICHNIS

- Kazianis, S., Coletta, L.D., Morizot, D.C., Johnston, D.A., Osterdorff, E.A., Nairn, R.S. (2000): Overexpression of a fish *CDKN2* gene in a hereditary melanoma model. *Carcinogenesis* 21, 599-605.
- Keegan, K.S., Holtzman, D.A., Plug, A.W., Christenson, E.R., Brainerd, E.E., Flaggs, G., Bentley, N.J., Taylor, E.M. *et al.* (1996): The Atr and Atm protein kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes. *Genes Dev* 10, 2423-2437.
- Kelsh, R.N. (2004): Genetics and evolution of pigment patterns in fish. *Pigment Cell Res* 17, 326-336.
- Kelsh, R.N., Inoue, C., Momoi, A., Kondoh, H., Furutani-Seiki, M., Ozato, K., Wakamatsu, Y. (2004): The Tomita collection of medaka pigmentation mutants as a resource for understanding neural crest cell development. *Mech Dev* 121, 841-859.
- Kenyon, C. (1994): If birds can fly, why can't we? Homeotic genes and evolution. *Cell* 78, 175-180.
- Kessel, M., Gruss, P. (1991): Homeotic transformations of murine vertebrae and concomitant alteration of *hox* codes induced by retinoic acid. *Cell* 67, 89-104.
- Kiel-Metzger, K., Erickson, R.P. (1984): Regional localization of sex-specific *Bkm*-related sequences on proximal chromosome 17 of mice. *Nature* 310, 579-581.
- Kiel-Metzger, K., Warren, G., Wilson, G.N., Erickson, R.P. (1985): Evidence that the human Y chromosome does not contain clustered DNA sequences (*Bkm*) associated with heterogametic sex determination in other vertebrates. *N Engl J Med* 313, 242-245.
- Kleckner, N. (1996): Meiosis: How could it work? *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 8167-8174.
- Kolodner, R. (1996): Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev* 10, 1433-1442.
- Koonin, V.F., Altschul, S.F., Bork, P. (1996): BRCA1 protein products: functional motifs. *Nat Genet* 13, 266-267.
- Kosswig, C. (1928): Über Kreuzungen zwischen den Teleostiern *Xiphophorus helleri* und *Platypoecilus maculatus*. *Z Indukt Abstamm Vererb Lehre* 47, 150-158.
- Koundrioukoff, S., Polo, S., Almouzni, G. (2004): Interplay between chromatin and cell cycle checkpoints in the context of ATR/ATM-dependent checkpoints. *DNA Repair (Amst)* 3, 969-978.
- Kourakis, M.J., Martindale, M.Q. (2000): Combined-method phylogenetic analysis of *Hox* and *ParaHox* genes of the metazoa. *J Exp Zool* 288, 175-191.
- Krekeler, G. (1991): Molekulare Analyse des zellulären *myb*-Gens bei *Xiphophorus* (Teleostei; *Poeciliidae*). Dissertation, Universität Gießen.
- Krumlauf, R. (1994): *Hox* genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191-201.

LITERATURVERZEICHNIS

- Kuhn, C., Vielkind, U., Anders, F. (1979): Cell cultures derived from embryos and melanoma of poeciliid fish. *In vitro* 15, 537-544.
- Kumar, R., Kushalappa, K., Godt, D., Pidkowich, M.S., Pastorelli, S., Hepworth, S.R., Haughn, G.W. (2007): The Arabidopsis BEL1-LIKE HOMEODOMAIN proteins SAW1 and SAW2 act redundantly to regulate KNOX expression spatially in leaf margins. *Plant Cell* 19, 2719-2735.
- Kuroiwa, A., Hafen, E., Gehring, W.J. (1984): Cloning and transcriptional analysis of the segmentation gene *fushi tarazu* of *Drosophila*. *Cell* 37, 825-831.
- Lane, T.F., Deng, C., Elson, A., Lyu, M.S., Kozak, C.A., Leder, P. (1995): Expression of *BRCA1* is associated with terminal differentiation of ectodermally and mesodermally derived tissues in mice. *Genes Dev* 9, 2712-2722.
- Lang, D., Chen, F., Milewski, R., Li, J., Lu, M.M., Epstein, J.A. (2000): *Pax3* is required for enteric ganglia formation and functions with *Sox10* to modulate expression of *c-ret*. *J Clin Invest* 106, 963-971.
- Langston, A.W., Thompson, J.R., Gudas, L.J. (1997): Retinoic acid-responsive enhancers located 3' of the *Hox A* and *Hox B* homeobox gene clusters. *J Biol Chem* 272, 2167-2175.
- Larroux, C., Fahey, B., Degnan, S.M., Adamski, M., Rokhsar, D.S., Degnan, B.M. (2007): The NK homeobox gene cluster predates the origin of Hox genes. *Curr Biol* 17, 706-710.
- Larue, L., Delmas, V. (2006) : The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma. *Front Biosci* 11, 733-742.
- Lavin, M.F., Khanna, K.K. (1999): ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol* 75, 1201-1214.
- Leers, J. (1991): Restriktionsanalyse und Sequenzierung eines *v-erbA*-homologen xiphophorinen genomischen Klones und eines cDNA-Klones. Diplomarbeit, Universität Gießen.
- Leonard, J., Peers, B., Johnson, T., Ferreri, K., Lee, S., Montminy, M.R. (1993): Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Mol Endocrinol* 7, 1275-1283.
- Lewis, E.B. (1978): A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.
- Libby, R.T., Monckton, D.G., Fu, Y.H., Martinez, R.A., McAbney, J.P., Lau, R., Einum, D.D., Nichol, K., Ware, C.B., Ptacek, L.J., Pearson, C.E., La Spada, A.R. (2003): Genomic context drives *SCA7* CAG repeat instability while expressed *SCA7* cDNAs are intergenerationally and somatically stable in transgenic mice. *Hum Mol Genet* 12, 41-50.
- Li, Y.-C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002): Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11, 2453-2465.
- Li, Y.-C., Korol, A.B., Fahima, T., Nevo, E. (2004): Microsatellites within genes: structure, function and evolution. *Mol Biol Evol* 21, 991-1007.

LITERATURVERZEICHNIS

- Lichty, B.D., Ackland-Snow, J., Noble, L., Kamel-Reid, S., Dube, I.D. (1995): Dysregulation of *HOX11* by chromosome translocations in T-cell acute lymphoblastic leukemia: a paradigm for homeobox gene involvement in human cancer. *Leuk Lymphoma* 16, 209-215.
- Lind, J. (1988): Versuche zum Aufbau eines Transformationstestsystmes bei *Xiphophorus*. Diplomarbeit, Universität Gießen.
- Liu, Y., MacDonald, R.J., Swift, G.H. (2001): DNA binding and transcriptional activation by a PDX1.PBX1b.MEIS2b trimer and cooperation with a pancreas-specific basic helix-loop-helix complex. *J Biol Chem* 276, 17985-17993.
- Lloyd, M.A., Fields, M.J., Thorgaard, G.H. (1989): *Bkm* minisatellite sequences are not sex associated but reveal DNA fingerprint polymorphism in rainbow trout. *Genome* 32, 865-868.
- Lynch, H.T., Smyrk, T.C., Watson, P., Lanspa, S.J., Lynch, J.F., Lynch, P.M., Cavalieri, R.J., Boland, C.R. (1993): Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 104, 1535-1549.
- MacDonald, M.E., Novelletto, A., Lin, C., Tagle, D., Barnes, G., Bates, G., Taylor, S., Allitto, B., Altherr, M., Myers, R., Lehrach, H., Collins, F.S., Wasmuth, J.J., Frontali, M., Gusella, J.F. (1992): The Huntington's disease candidate region exhibits many different haplotypes. *Nat Genet* 1, 99-103.
- Maddox, J. (1984): Patterns of developing embryos. *Nature* 310, 9.
- Maeda, K., Hamada, J., Takahashi, Y., Tada, M., Yamamoto, Y., Sugihara, T., Moriuchi, T. (2005): Altered expression of HOX genes in human cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer* 114, 436-441.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F. Jr., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., et al (1990): Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250,1233-1238.
- Malter, H.E., Iber, J.C., Willemsen, R., de Graaff, E., Tarleton, J.C., Leisti, J., Warren, S.T., Oostra, B.A. (1997): Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes. *Nat Genet* 15, 165-169.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982): "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Marshak, S., Benshushan, E., Shoshkes, M., Havin, L., Cerasi, E., Melloul, D. (2000): Functional conservation of regulatory elements in the *pdx-1* gene: PDX-1 and hepatocyte nuclear factor 3beta transcription factors mediate beta-cell-specific expression. *Mol Cell Biol* 20, 7583-7590.
- Martorell, L., Johnson, K., Boucher, C.A., Baiget, M. (1997): Somatic instability of the myotonic dystrophy (CTG)_n repeat during human fetal development. *Hum Mol Genet* 6, 877-880.
- Marx, J.L. (1986): The continuing saga of "homeo-madness". *Science* 232, 158-159.
- Marx, J. (1992): Homeobox genes go evolutionary. *Science* 255, 399-401.

LITERATURVERZEICHNIS

- Matsumoto, J., Akiyama, T., Taylor, J.D., Tchen, T.T. (1985): Modification of differentiation programs of goldfish erythrocyte cells by dual applications of different inducing agents: a problem of blast (stem) cells. In "Pigment Cell 1985." Bagnara, J., Klaus, S.N., Paul, E., Schartl, M. (eds.), University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 333-340.
- Mäueler, W. (1988): Untersuchungen zur tumorspezifischen Genexpression bei *Xiphophorus*, Expression von Proto-Onkogenen. Dissertation, Universität Gießen.
- Mäueler, W., Barnekow, A., Eigenbrodt, E., Raulf, F., Falk, H.F., Telling, A., Schartl, M. (1988a): Different regulation of oncogene expression in tumor and embryonal cells of *Xiphophorus*. *Oncogene* 3, 113-122.
- Mäueler, W., Raulf, W., Schartl, M. (1988b): Expression of proto-oncogenes in embryonic, adult, and transformed tissues of *Xiphophorus* (Teleostei; *Poeciliidae*). *Oncogene* 2, 421-430.
- McGinnis, W. (1994): A century of homeosis, a decade of homeoboxes. *Genetics* 137, 607-611.
- McGinnis, W., Krumlauf, R. (1992): Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68, 283-302.
- McGinnis, W., Garber, R.L., Wirz, J., Kuroiwa, A., Gehring, W.J. (1984a): A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic gene and its conservation in other metazoans. *Cell* 37, 403-408.
- McGinnis, W., Levine, M.S., Hafen, E., Kuroiwa, A., Gehring, W.J. (1984b): A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila Antennapedia* and *bithorax* complexes. *Nature* 308, 428-433.
- McLin, V.A., Zorn, A.M. (2003): Organogenesis: making pancreas from liver. *Curr Biol* 13, R96-R98.
- McVey, M., Andersen, S.L., Broze, Y., Sekelsky, J. (2007): Multiple functions of *Drosophila* BLM helicase in maintenance of genome stability. *Genetics* 176, 1979-1992.
- Meierjohann, S., Schartl, M. (2006): From Mendelian to molecular genetics: the *Xiphophorus* melanoma model. *Trends Genet* 22, 654-661.
- Mellgren, E.M., Johnson, S.L. (2002): The evolution of morphological complexity in zebrafish stripes. *Trends Genet* 18, 128-134.
- Melloul, D., Marshak, S., Cerasi, E. (2002a): Regulation of insulin transcription. *Diabetologia* 45, 309-326.
- Melloul, D., Marshak, S., Cerasi, E. (2002b): Regulation of *pdx-1* gene expression. *Diabetes* 51, 320-325.
- Messing, J., Gronenborn, B., Muller-Hill, B., Hofschneider, P.H. (1977): Single-strand filamentous DNA phage as a carrier for *in vitro* recombined DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 3642-3646.
- Meyer, A., Morrissey, J.M., Schartl, M. (1994): Recurrent origin of a sexually selected trait in *Xiphophorus* fishes inferred from a molecular phylogeny. *Nature* 368, 539-542.
- Meyer, M. (1998): *Hox* gene variation and evolution. *Nature* 391, 225-228.

LITERATURVERZEICHNIS

- Meyer, M., Schartl, M. (1979): Eine neue *Xiphophorus*-Art aus Vera Cruz, Mexico. *Senckenb Biol* 60, 747-751.
- Micallef, S.J., Janes, M.E., Knezevic, K., Davis, R.P., Elefanty, A.G., Stanley, E.G. (2005): Retinoic acid induces *Pdx-1*-positive endoderm in differentiating mouse embryonic stem cells. *Diabetes* 54, 301-305.
- Milewski, W.M., Duguay, S.J., Chan, S.J., Steiner, D.F. (1998): Conservation of *PDX-1* structure, function and expression in zebrafish. *Endocrinology* 139, 1440-1449.
- Miller, C.P., McGehee, R.E., Habener, J.F. (1994): *IDX-1*: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *EMBO J* 13, 1145-1156.
- Moghadam, H.K., Ferguson, M.M., Danzmann, R.G. (2005): Evolution of *Hox* clusters in Salmonidae: a comparative analysis between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *J Mol Evol* 61, 636-649.
- Moos, M., Gallwitz, D. (1982): Structure of a human β -actin-related pseudogene which lacks intervening sequences. *Nucleic Acids Res* 10, 7843-7849.
- Moos, M., Gallwitz, D. (1983): Structure of two human β -actin-related processed genes one of which is located next to a simple repetitive sequence. *EMBO J* 2, 757-761.
- Morgan, R., Pirard, P.M., Shears, L., Sohal, J., Pettengell, R., Pandha, H.S. (2007): Antagonism of HOX/PBX dimer formation blocks the *in vivo* proliferation of melanoma. *Cancer Res.* 67, 5806-5813.
- Mulley, J.F., Chiu, C.-h., Holland, P.W.H. (2006): Breakup of a homeobox cluster after genome duplication in teleosts. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 10369-10372.
- Murphy, M., Bartlett, P.F. (1993): Molecular regulation of neural crest development. *Mol Neurobiol* 7, 111-135.
- Nanda, I., Deubelbeiss, C., Guttenbach, M., Epplen, J.T., Schmid, M. (1990): Heterogeneities in the distribution of (GACA)*n* simple repeats in the karyotypes of primates and mouse. *Hum Genet* 85, 187-194.
- Nanda, I., Schartl, M., Feichtinger, W., Epplen, J.T., Schmid, M. (1992): Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. *Chromosoma* 101, 301-310.
- Nanda, I., Schartl, M., Epplen, J.T., Feichtinger, W., Schmid, M. (1993): Primitive sex chromosomes in poeciliid fishes harbor simple repetitive DNA sequences. *J Exp Zool* 265, 301-308.
- Narita, M., Bahar, R., Hatano, M., Kang, M.M., Tokuhisa, T., Goto, S., Saisho, H., Sakiyama, S., Tagawa, M. (2001): Tissue-specific expression of a suicide gene for selective killing of neuroblastoma cells using a promoter region of the *NCX* gene. *Cancer Gene Ther* 8, 997-1002.

LITERATURVERZEICHNIS

- Naruse, K., Fukamachi, S., Mitani, H., Kondo, M., Matsuoka, T., Kondo, S., Hanamura, N., Morita, Y., Hasegawa, K., Nishigaki, R., Shimada, A., Wada, H., Kusakabe, T., Suzuki, N., Kinoshita, M., Kanamori, A., Terado, T., Kimura, H., Nonaka, M., Shima, A. (2000): A detailed map of medaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution. *Genetics* 154, 1773-1784.
- Nelson, D.L., Warren, S.T. (1993): Trinucleotide repeat instability: when and where? *Nat Genet* 4, 107-108.
- Nelson, W.G., Kastan, M.B. (1994): The DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* 14, 1815-1823.
- Odenthal, J., Rossnagel, K., Haffter, P., Kelsh, R.N., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F.J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Kane, D.A., Mullins, M.C., Nusslein-Volhard, C. (1996): Mutations affecting xanthophore pigmentation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 391-398.
- Oefelein, M., Chin-Chance, C., Bushman, W. (1996): Expression of the homeotic gene *Hox-d13* in the developing and adult mouse prostate. *J Urol* 155, 342-346.
- Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L.M., Wright, C.V.E. (1996): PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122, 983-995.
- Ohlsson, H., Karlsson, K., Edlund, T. (1993): IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J* 12, 4251-4259.
- Ohta, K., Nicolas, A., Furuse, M., Nabetani, A., Ogawa, H., Shibata, T. (1998): Mutations in the *MRE11*, *RAD50*, *XRS2*, and *MRE2* genes alter chromatin configuration at meiotic DNA double-stranded break sites in premeiotic and meiotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 646-651.
- Orgel, L.E., Crick, F.H.C. (1980): Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284, 604-607.
- Orr, H.T., Chung, M.Y., Banfi, S., Kwiatkowski, T.J. Jr., Servadio, A., Beaudet, A.L., McCall, A.E., Duvick, L.A., Ranum, L.P.W., Zoghbi, H.Y. (1993): Expansion of an unstable trinucleotide (CAG) repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 4, 221-226.
- Otting, G., Qian, Y.Q., Müller, M., Affolter, M., Gehring, W., Wüthrich, K. (1988): Secondary structure determination for the *Antennapedia* homeodomain by nuclear magnetic resonance and evidence for a helix-turn-helix motif. *EMBO J* 7, 4305-4309.
- Otting, G., Qian, Y.Q., Billeter, M., Müller, M., Affolter, M., Gehring, W.J., Wüthrich, K. (1990): Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *EMBO J* 9, 3085-3092.
- Parichy, D.M. (2006): Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity* 97, 200-210.

LITERATURVERZEICHNIS

- Parniewski, P., Jaworski, A., Wells, R.D., Bowater, R.P. (2000): Length of CTG.CAG repeats determines the influence of mismatch repair on genetic instability. *J Mol Biol* 299, 865-874.
- Pearson, C.E., Tam, M., Wang, Y.-H., Montgomery, S.E., Dar, A., Cleary, J.D., Nichol, K. (2002): Slipped-strand DNAs formed by long (CAG)(CTG) repeats: slipped-out repeats and slip-out junctions. *Nucl Acids Res* 30, 4534-4547.
- Pearson, J.C., Lemons, D., McGinnis, W. (2005): Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet* 6, 893-904.
- Peers, B., Leonard, J., Sharma, S., Teitelman, G., Montminy, M.R. (1994): Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol Endocrinol* 8, 1798-1806.
- Peshavaria, M., Gamer, L., Henderson, E., Teitelman, G., Wright, C.V.E., Stein, R. (1994): *XIHbox* 8, an endoderm-specific *Xenopus* homeodomain protein, is closely related to a mammalian insulin gene transcription factor. *Mol Endocrinol* 8, 806-816.
- Peshavaria, M., Henderson, E., Sharma, A., Wright, C.V.E., Stein, R. (1997): Functional characterization of the transactivating properties of the PDX-1 homeodomain protein. *Mol Cell Biol* 17, 3987-3996.
- Peter, R.U. (1985): Vergleichend-anatomische Untersuchungen der extrakutanen Pigmentierungen der Poeciliiden (Pisces, Teleostei). Dissertation, Universität Gießen.
- Peter, R.U., Scharl, M., Anders, F., Duncker, H.R. (1985): Pigment pattern formation during embryogenesis in *Xiphophorus*. In "Pigment Cell 1985." Bagnara, J., Klaus, S.N., Paul, E., Scharl, M. (eds.), University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 291-302.
- Peters, H. (1990): Expression *erb A*- und *erb B*-verwandter Gene in Tumorgewebe und gesunden Gewebe von Embryonen, Jungfischen und Adulten des Teleostiers *Xiphophorus*. Diplomarbeit, Universität Gießen.
- Petersen, H.V., Serup, P., Leonard, J., Michelsen, B.K., Madsen, O.D. (1994): Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 10465-10469.
- Petit, M.A., Dimpfl, J., Radman, M., Echols, H. (1991): Control of large chromosomal duplications in *Escherichia coli* by the mismatch repair system. *Genetics* 129, 327-332.
- Petry, H. (1989): Untersuchungen über DNA Polymerasen und ein retrovirusähnliches Partikel in *Xiphophorus*. Dissertation, Universität Gießen.
- Petry, H., Petry, K., Schmidt, M., Hunsmann, G., Anders, F., Lüke, W. (1992): Isolation and characterization of a retrovirus from the fish genus *Xiphophorus*. *Virology* 188, 785-792.
- Petry, K. (1991): Charakterisierung von retrovirusähnlichen, repetitiven DNA-Sequenzen bei *Xiphophorus*. Dissertation, Universität Gießen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Pfütz, M. (1988): Sequenzierung *c-erbA*-spezifischer Sequenzen aus dem Genom von *Xiphophorus*. Diplomarbeit, Universität Gießen.
- Pitera, J.E., Smith, V.V., Thorogood, P., Milla, P.J. (1999): Coordinated expression of 3' *hox* genes during murine embryonal gut development: an enteric *Hox* code. *Gastroenterology* 117, 1339-1351.
- Pollard, S.L., Holland, P.W. (2000): Evidence for 14 homeobox gene clusters in human genome ancestry. *Curr Biol* 10, 1059-1062.
- Potterf, S.B., Furumura, M., Dunn, K.J., Arnheiter, H., Pavan, W.J. (2000): Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of *MITF* expression by *SOX10* and *PAX3*. *Hum Genet* 107, 1-6.
- Priyadarshini, P., Murthy, B.S., Nagaraju, J., Singh, L. (2003): A GATA-binding protein expressed predominantly in the pupal ovary of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* 33, 185-195.
- Prolla, T.A., Pang, Q., Alani, E., Kolodner, R.D., Liskay, R.M. (1994): Interactions between the MSH2, MLH1 and PMS1 proteins during the initiation of DNA mismatch-repair. *Science* 265, 1091-1093.
- Pröfrock, A. (1988): Untersuchungen zum Phosphatidylinosit-Turnover an ausgewählten *Xiphophorus*-Genotypen. Diplomarbeit, Universität Gießen.
- Proveniers, M., Rutjens, B., Brand, M., Smeekens, S. (2007): The Arabidopsis TALE homeobox gene *ATH1* controls floral competency through positive regulation of *FLC*. *Plant J* 52, 899-913.
- Qian, Y.Q., Billeter, M., Otting, G., Müller, M., Gehring, W.J., Wüthrich, K. (1989): The structure of the *Antennapedia* homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* 59, 573-580.
- Quevedo, W.C., Holstein, T.J. (1992): Molecular genetics and the ontogeny of pigment patterns in mammals. *Pigment Cell Res* 5, 328-334.
- Radda, A.C. (1980): Synopsis der Gattung *Xiphophorus*, Heckel. *Aquaria* 27, 39-44.
- Rawls, J.F., Johnson, S.L. (2000): Zebrafish kit mutation reveals primary and secondary regulation of melanocyte development during fin stripe regeneration. *Development* 127, 3715-3724.
- Rayssiguier, C., Thaler, D.S., Radman, M. (1989): The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* 342, 396-401.
- Reiter, J.F., Alexander, J., Rodaway, A., Yelon, D., Patient, R., Holder, N., Stainier, D.Y.R. (1999): *Gata5* is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish. *Genes Dev* 13, 2983-2995.
- Reyniers, E., Vits, L., De Boule, K., Van Roy, B., Van Velzen, D., de Graaff, E., Verkerk, A.J., Jorens, H.Z., Darby, J.K., Oostra, B. et al. (1993): The full mutation in the *FMR-1* gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nat Genet* 4, 143-146.

LITERATURVERZEICHNIS

- Richard, G.F., Dujon, B., Haber, J.E. (1999): Double-strand break repair can lead to high frequencies of deletions within short CAG/CTG trinucleotide repeats. *Mol Gen Genet* 261, 871-872.
- Richard, G.F., Goellner, G.M., McMurray, C.T., Haber, J.E. (2000): Recombination-induced CAG trinucleotide repeat expansions in yeast involve the MRE11-RAD50-XRS2 complex. *EMBO J* 19, 2381-2390.
- Robert, B., Lallemand, Y. (2006): Anteroposterior patterning in the limb and digit specification : contribution of mouse genetics. *Dev Dyn* 235, 2337-2352.
- Robertson, S.M. (1989): Isolation and characterization of *src*-related sequences from the platyfish *Xiphophorus maculatus* (Poeciliidae: Teleostei) and an evolutionary analyses of the *src* gene-family. Dissertation, Universität München.
- Roewer, L., Nagy, M., Schmidt, P., Epplen, J.T., Herzog-Schöder, G. (1993): Microsatellite and HLA class II oligonucleotide typing in a population of Yanomani indians. In „DNA Fingerprinting: State of the Science“. Pena, S.D.J., Chakraborty, R., Epplen J.T., Jeffreys, A.J. (eds.), Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 221-230.
- Rogers, J.H. (1985): The origin and evolution of retroposons. *Int Rev Cytol* 93, 187-279.
- Rosen, D.E. (1979): Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala: revisionary studies and comparative geography. *Bull Am Mus Nat Hist* 162, 267-376.
- Rosen, E.M., Fan, S., Rockwell, S., Goldberg, I.D. (1999): The molecular and cellular basis of radiosensitivity: implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. *Cancer Invest* 17, 56-72.
- Rosenthal, G.G. & García de León, F.J. (2006): Sexual behaviour, genes, and evolution in *Xiphophorus*. *Zebrafish* 3, 85-90.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., De Luca, L.M. (2000): Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80, 1021-1054.
- Rotman, G., Shiloh, Y. (1998): ATM: from gene to function. *Hum Mol Genet* 7, 1555-1563.
- Roushdy, J., Michel, J., Petry, H., Anders, A., Anders, F. (1999): Paragenetic suppressors of suppressor genes - a new class of oncodeterminants. *J Cancer Res Clin Oncol* 125, 123-133.
- Ryan, M.J., Wagner, W.E. (1987): Asymmetries in mating preferences between species: female swordtails prefer heterospecific males. *Science* 236, 595-597.
- Samee, N., de Vernejoul, M.C., Levi, G. (2007) : Role of DLX regulatory proteins in osteogenesis and chondrogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 17, 173-186.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.

LITERATURVERZEICHNIS

- Schäfer, R., Ali, S., Epplen, J.T. (1986): The organization of the evolutionarily conserved GATA/GACA repeats in the mouse genome. *Chromosoma* 93, 502-510.
- Schartl, M. (1990): Homology of melanoma-inducing loci in the genus *Xiphophorus*. *Genetics* 126, 1083-1091.
- Schartl, M., Schröder, J.H. (1988): A new species of the genus *Xiphophorus* Heckel 1948, endemic to northern Coahuila, Mexico. *Senckenb Biol* 68, 311-321.
- Schartl, M., Schartl, A., Anders, F. (1981): Phenotypic conversion of malignant melanoma to benign melanoma and vice versa in *Xiphophorus*. In „Pigment Cell 1981“, M. Seiji, (ed.), University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 507-514.
- Schartl, M., Barnekow, A., Bauer, H., Anders, F. (1982): Correlations of inheritance and expression between a tumor gene and the cellular homolog of the *Rous sarcoma* virus-transforming gene in *Xiphophorus*. *Cancer Res* 45, 4222-4227.
- Schartl, M., Schmidt, C.R., Anders, A., Barnekow, A. (1985): Elevated expression of the cellular *src* gene in tumors of differing etiologies in *Xiphophorus*. *Int J Cancer* 36, 199-207.
- Schartl, M., Erbeling-Denk, C., Hölter, S., Nanda, I., Schmid, M., Schröder, J.H., Epplen, J.T. (1993): Reproductive failure of dominant males in the poeciliid fish *Limia perugiae* determined by DNA fingerprinting. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7064-7068.
- Schartl, M., Hornung, U., Gutbrod, H., Volff, J.N., Wittbrodt, J. (1999): Melanoma loss-of-function mutants in *Xiphophorus* caused by *Xmrk*-oncogene deletion and gene disruption by a transposable element. *Genetics* 153, 1385-1394.
- Schleenbecker, U. (1988): Molekulare Analyse zellulärer Gene, die für Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren kodieren. Untersuchungen an *Xiphophorus* (Pisces; Teleostei). Dissertation, Universität Gießen.
- Schmid, M., Nanda, I., Steinlein, C., Kausch, K., Haaf, T., Epplen, J.T. (1991): Sex determining mechanisms and sex chromosomes in Amphibia. In „Amphibian cytogenetics and evolution“. D.M. Green and S.K. Session (eds.), Academic Press, New York, pp. 393-430.
- Schmidt, D.R., Schreiber, S.L. (1999): Molecular association between ATR and two components of the nucleosome remodeling and deacetylating complex, HDAC2 and CHD4. *Biochemistry* 38, 14711-14717.
- Schmidt, E.R. (1978): Chromatophore development and cell interactions in the skin of xiphophorine fish. *Wilhelm Roux's Archives* 184, 115-134.
- Schmidt, H. (1988): Phenol oxidase (EC 1.14.18.1) a marker enzyme for defense cells. *Progr Histochem Cytochem* 17, 3.

LITERATURVERZEICHNIS

- Schmidt, H., Anders, A. (1989): Phenoloxidase (EC 1.14.18.1) und präformiertes Melanin als mögliche Marker zur Unterscheidung genetisch bedingter melanomfreier und melanombildender Rückkreuzungs-Segreganten bei *Xiphophorus*. Biol Zent Bl 108, 463-475.
- Schnabel, C.A., Jacobs, Y., Cleary, M.L. (2000): *HoxA9*-mediated immortalization of myeloid progenitors requires functional interactions with TALE cofactors Pbx and Meis. Oncogene 19, 608-616.
- Scholl, F.A., Kamarashev, J., Murmann, O.V., Geertsen, R., Dummer, R., Schafer, B.W. (2001): *PAX3* is expressed in human melanomas and contributes to tumor cell survival. Cancer Res 61, 823-826.
- Schubert, F.R., Nieselt-Struwe, K., Gruss, P. (1993): The *Antennapedia*-type homeobox genes have evolved from three precursors separated early in metazoan evolution. Proc Natl Acad Sci USA 90, 143-147.
- Schughart, K., Kappen, C., Ruddle, F.H. (1989): Duplication of large genomic regions during the evolution of vertebrate homeobox genes. Proc Natl Acad Sci USA 86, 7067-7071.
- Schultheiss, T.M., Xydas, S., Lassar, A.B. (1995): Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. Development 121, 4203-4214.
- Schulz, W.A., Hatina, J. (2006): Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. J Cell Mol Med 10, 100-125.
- Schwartz, P.T., Perez-Villamil, B., Rivera, A., Moratalla, R., Vallejo, M. (2000): Pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 expressed in developing brain regulates somatostatin gene transcription in embryonic neural cells. J Biol Chem 275, 19106-19114.
- Scott, M.P. (1992): Vertebrate homeobox gene nomenclature. Cell 71, 551-553.
- Scott, M.P. (1993): A rational nomenclature for vertebrate homeobox (HOX) genes. Nucleic Acids Res 21, 1687-1688.
- Scott, M.P., Weiner, A.J. (1984): Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the *Antennapedia*, *Ultrabithorax* and *fushi tarazu* loci of *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 81, 4115-4119.
- Scott, M.P., Tamkun, J.W., Hartzell, G.W. (1989): The structure and function of the homeodomain. Biochim Biophys Acta 989, 25-48.
- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., Livingston, D.M. (1997): Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. Cell 88, 265-275.
- Sekimoto, T., Yoshinobu, K., Yoshida, M., Kuratani, S., Fujimoto, S., Araki, K., Tajima, N., Araki, K., Yamamura, K. (1998): Region-specific expression of murine *Hox* genes implies the *Hox* code-mediated patterning of the digestive tract. Genes Cells 3, 51-64.

LITERATURVERZEICHNIS

- Selva, E., New, L., Crouse, G., Lahue, R.S. (1995): Mismatch correction acts as a barrier to homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 139, 1175-1188.
- Shapiro, M.D., Marks, M.E., Peichel, C.L., Blackman, B.K., Nereng, K.S., Jonsson, B., Schluter, D., Kingsley, D.M. (2004): Genetic and developmental basis of evolutionary pelvic reduction in threespine sticklebacks. *Nature* 428, 717-723.
- Sharp, P.A. (1983): Conversion of RNA to DNA in mammals: *Alu*-like elements and pseudogenes. *Nature* 301, 471-472.
- Shepherd, J.C.W., McGinnis, W., Carrasco, A.E., De Robertis, E.M., Gehring, W.J. (1984): Fly and frog homoeo domains show homologies with yeast mating type regulatory proteins. *Nature* 310, 70-71.
- Sherman, M.I. (1986): Differentiation of embryonal carcinoma cells: commitment, reversibility, and refractoriness. *Curr Top Dev Biol* 20, 345-356.
- Shimada, M., Nakanishi, M. (2006): DNA damage checkpoints and cancer. *J Mol Histol* 37, 253-260.
- Shushan, E.B., Cerasi, E., Melloul, D. (1999): Regulation of the insulin gene by glucose: stimulation of trans-activation potency of human PDX-1 N-terminal domain. *DNA Cell Biol* 18, 471-479.
- Siegel, N., Hoegg, S., Salzburger, W., Braasch, I., Meyer, A. (2007): Comparative genomics of *ParaHox* clusters of teleost fishes: gene cluster breakup and the retention of gene sets following whole genome duplications. *BMC Genomics* 8, 312.
- Silberg, D.G., Swain, G.P., Suh, E.R., Traber, P.G. (2000): *Cdx1* and *Cdx2* expression during intestinal development. *Gastroenterology* 119, 961-971.
- Singh, L., Jones, K.W. (1982): Sex reversal in the mouse (*Mus musculus*) is caused by a recurrent nonreciprocal crossover involving the X and an aberrant Y chromosome. *Cell* 28, 205-216.
- Singh, L., Jones, K.W. (1986): *Bkm* sequences are polymorphic in humans and are clustered in pericentric regions of various acrocentric chromosomes including the Y. *Hum Genet* 73, 304-308.
- Singh, L., Purdom, I.F., Jones, K.W. (1980): Sex chromosome associated satellite DNA: evolution and conservation. *Chromosoma* 79, 137-157.
- Singh, L., Purdom, I.F., Jones, K.W. (1981): Conserved sex-chromosome-associated nucleotide sequences in eukaryotes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 45, 805-813.
- Singh, L., Phillips, C., Jones, K.W. (1984): The conserved nucleotide sequences of *Bkm*, which define *Sxr* in the mouse, are transcribed. *Cell* 36, 111-120.
- Singh, L., Wadhwa, R., Naidu, S., Nagaraj, R., Ganesan, M. (1994): Sex- and tissue-specific *Bkm*(GATA)-binding protein in the germ cells of heterogametic sex. *J Biol Chem* 269, 25321-25327.
- Slack, J.M.W. (1995): Developmental biology of the pancreas. *Development* 121, 1569-1580.

LITERATURVERZEICHNIS

- Smit, D.J., Smith, A.G., Parsons, P.G., Muscat, G.E., Sturm, R.A. (2000): Domains of Brn-2 that mediate homodimerization and interaction with general and melanocytic transcription factors. *Eur J Biochem* 267, 6413-6422.
- Smith, A.D., Gronau, T., Pröfrock, A., Zechel, C., Bird, I.M., Lane, P.A., Barnekow, A., Anders, F. (1991): EGF-receptor gene, X-*src* oncogene and inositol lipid turnover in key processes preceding melanoma in the *Xiphophorus* model. In „Hereditary Malignant Melanoma“. Lynch, H.T., Fusaro, R.M. (eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton, F.L., pp. 97-108.
- Snell, E.A., Scemama, J.-L., Stellwag, E.J. (1999): Genomic organization of the *Hoxa4-Hoxa10* region from *Morone saxatilis*: implications for *Hox* gene evolution among vertebrates. *J Exp Zool* 285, 41-49.
- Snell, R.G., MacMillan, J.C., Cheadle, J.P., Fenton, I., Lazarou, L.P., Davies, P., MacDonald, M.E., Gusella, J.F., Harper, P.S., Shaw, D.J. (1993): Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet* 4, 393-397.
- Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Stein, S., Fritsch, R., Lemaire, L., Kessel, M. (1996): Checklist: vertebrate homeobox genes. *Mech Dev* 55, 91-108.
- Stoffel, M., Stein, R., Wright, C.V., Espinosa, R. 3rd, Le Beau, M.M., Bell, G.I. (1995): Localization of human homeodomain transcription factor insulin promoter factor 1 (IPF1) to chromosome band 13q12.1. *Genomics* 28, 125-126.
- Stoffers, D.A., Zinkin, N.T., Stanojevic, V., Clarke, W.L., Habener, J.F. (1997): Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human *IPF1* gene coding sequence. *Nat Genet* 15, 106-110.
- Stoffers, D.A., Heller, R.S., Miller, C.P., Habener, J.F. (1999): Developmental expression of the homeodomain protein IDX-1 in mice transgenic for an *IDX-1* promoter/*lacZ* transcriptional reporter. *Endocrinology* 140, 5374-5381.
- Strand, M., Prolla, T.A., Liskay, R.M., Petes, T.D. (1993): Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365, 274-276.
- Straube, S. (1987): Entnahme und Charakterisierung homoeoboxhaltiger Phagenklone von einer *Xiphophorus*-Genbank. Diplomarbeit, Universität Gießen.
- Sturzbecher, H.-W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U., Buchop, S. (1996): p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/recA protein interaction. *EMBO J* 15, 1992-2002.
- Suh, E., Chen, L., Taylor, J., Traber, P.G. (1994): A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 14, 7340-7351.

LITERATURVERZEICHNIS

- Swift, M., Morrell, D., Massey, R.B., Chase, C.L. (1991): Incidence of cancer in 161 families affected by ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med* 325, 1831-1836.
- Syrjakoski, K., Vahteristo, P., Eerola, H., Tamminen, A., Kivinummi, K., Sarantaus, L., Holli, K., Blomqvist, C., Kallioniemi, O.P., Kainu, T., Nevanlinna, H. (2000): Population-based study of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in 1035 unselected Finnish breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 92, 1529-1531.
- Taalman, R.D., Jaspers, N.G., Scheres, J.M., de Wit, J., Hustinx, T.W. (1983): Hypersensitivity to ionizing radiation, *in vitro*, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen breakage syndrome. *Mutat Res* 112, 23-32.
- Tantithakura, O. (1990): Cytogenetische Untersuchungen an Zellkulturen sowie transformierte Zellkultur von Fischen der Gattung *Xiphophorus* (Pisces, Teleostei) mit Hilfe der High-Resolution-Technik. Dissertation, Universität Gießen.
- Tantithakura, O., Anders, F., Anders, A., Foerster, W. (1993): High resolution technique: a new approach to study fish chromosomes. *Biotrop Spec Publ* 52, 45-53.
- Tassabehji, M., Read, A.P., Newton, V.E., Harris, R., Balling, R., Gruss, P., Strachan, T. (1992): Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the *Pax-3* paired box gene. *Nature* 355, 635-636.
- Tautz, D. (1989): Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17, 6463-6471.
- Tautz, D., Renz, M. (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 12, 4127-4138.
- Tautz, D., Schlötterer, C. (1994): Simple sequences. *Curr Opin Genet Dev* 4, 832-837.
- Tavolga, W.N. (1949): Embryonic development of the platyfish (*Platypoecilus*), the swordtail (*Xiphophorus*) and their hybrids. *Bull Am Mus Nat Hist* 94, 161-230.
- te Riele, H., Maandag, E.R., Berns, A. (1992): Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5128-5132.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993): A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72, 971-983.
- The International Nijmegen Breakage Syndrome Study Group (2000): Nijmegen breakage syndrome. *Arch Dis Child* 82, 400-406.
- Toth, L.E., Slawin, K.L., Pintar, J.E., Chi Nguyen-Huu, M. (1987): Region-specific expression of mouse homeobox genes in the embryonic mesoderm and central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 6790-6794.

LITERATURVERZEICHNIS

Towler, D.A., Bennett, C.D., Rodan, G.A. (1994): Activity of the rat osteocalcin basal promoter in osteoblastic cells is dependent upon homeodomain and CP1 binding motifs. *Mol Endocrinol* 8, 614-624.

Traut, W. (1987): Hypervariable *Bkm* DNA Loci in a moth, *Ephiestia kuehniella*: does transposition cause restriction fragment length polymorphism? *Genetics* 115, 493-498.

Trifonov, E.N. (2003): Tuning function of tandemly repeating sequences: a molecular device for fast adaptation. In „Evolutionary theory and processes: modern horizons, papers in honor of Eviator Nevo.“ Wasser, S.P. (ed.) Kluwer Academic Publishers. Amsterdam, The Netherlands. pp. 1-24.

Twigg, A.J., Sherratt, D. (1980): Trans-complementable copy-number mutants of plasmid ColE1. *Nature* 283, 216-218.

Utset, M.F., Awgulewitsch, A., Ruddle, F.H., McGinnis, W. (1987): Region-specific expression of two mouse homeo box genes. *Science* 235, 1379-1382.

Venkitaraman, A.R. (2002): Cancer susceptibility and the functions of *BRCA1* and *BRCA2*. *Cell* 108, 171-182.

Vielkind, U. (1976): Genetic control of cell differentiation in platyfish-swordtail melanomas. *J Exp Zool* 196, 197-205.

Wagner, E. (1990): Studien an einer dem menschlichen PDGF-Rezeptorgen verwandten xiphophorinen Sequenz. Diplomarbeit, Universität Gießen.

Wakamatsu, Y. (1981): Establishment of a cell line from the platyfish-swordtail hybrid melanoma. *Cancer Res* 41, 679-680.

Wakamatsu, Y., Oikawa, A., Obika, M., Hirobe, T., Ozato, K. (1984): Fish hereditary melanoma cell lines of different degrees of cell differentiation. *Dev Growth Differ* 26, 503-513.

Waldman, A.S., Liskay, R.M. (1988): Dependence of intrachromosomal recombination in mammalian cells on uninterrupted homology. *Mol Cell Biol* 8, 5350-5357.

Walter, R.B., Ju, Z., J., Martinez, A., Amemiya, C., Samollow, P.B. (2006): Genomic resources for *Xiphophorus* research. *Zebrafish* 3, 11-22.

Wang, W., Seki, M., Otsuki, M., Tada, S., Takao, N., Yamamoto, K., Hayashi, M., Honma, M., Enomoto, T. (2004): The absence of a functional relationship between ATM and BLM, the components of BASC, in DT40 cells. *Biochim Biophys Acta* 1688, 137-144.

Weatherbee, S.D., Nijhout, H.F., Grunert, L.W., Halder, G., Galant, R., Selegue, J., Carroll, S. (1999): *Ultrabithorax* function in butterfly wings and the evolution of insect wing patterns. *Curr Biol* 9, 109-115.

Wedeen, C.J., Kostriken, R.G., Matsumura, I., Weisblat, D.A. (1990): Evidence for a new family of evolutionary conserved homeobox genes. *Nucleic Acids Res* 18, 1908.

LITERATURVERZEICHNIS

- Weis, S., Schartl, M. (1998): The macromelanophore locus and the melanoma oncogene are separate genetic entities in the genome of *Xiphophorus*. *Genetics* 149, 1909-1920.
- Wellbrock, C., Schartl, M. (2000): Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a complex of p59fyn and the receptor tyrosine kinase *Xmrk* is involved in malignant transformation of pigment cells. *Eur J Biochem* 267, 3513-3522.
- Wellbrock, C., Fischer, P., Schartl, M. (1999): PI3-kinase is involved in mitogenic signaling by the oncogenic receptor tyrosine kinase *Xiphophorus* melanoma receptor kinase in fish melanoma. *Exp Cell Res* 15, 340-349.
- White, R. (1985): DNA sequence polymorphisms revitalize linkage approaches in human genetics. *Trends Genet* 1, 177-181.
- Wilkins, A.S. (1986): Homeobox fever, extrapolation and developmental biology. *Bioessays* 4, 147-148.
- Wittbrodt, J., Adam, D., Malitschek, B., Mäueler, W., Raulf, F., Telling, A., Robertson, S.M., Schartl, M. (1989): Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing *Tu* locus in *Xiphophorus*. *Nature* 341, 415-421.
- Wöhrle, D., Hennig, I., Vogel, W., Steinbach, P. (1993): Mitotic stability of fragile X mutations in differentiated cells indicates early post-conceptual trinucleotide repeat expansion. *Nat Genet* 4, 140-142.
- Wöhrle, D., Salat, U., Hameister, H., Vogel, W., Steinbach, P. (2001): Demethylation reactivation and destabilization of human fragile X full-mutation alleles in mouse embryocarcinoma cells. *Am J Hum Genet* 69, 504-515.
- Wolberger, C., Vershon, A.K., Liu, B., Johnson, A.D., Pabo, C.O. (1991): Crystal structure of a MAT alpha 2 homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* 67, 517-528.
- Wolf, B., Anders, F. (1975): *Xiphophorus* I. Farbmuster. Genetisches Institut der Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Woolcock, B.W., Schmidt, B.M., Kallman, K.D., Vielkind, J.R. (1994): Differences in transcription and promoters of *Xmrk-1* and *Xmrk-2* genes suggest a role for *Xmrk-2* in pigment pattern development in the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Cell Growth Differ* 5, 575-583.
- Woolcock, B., Kazianis, R., Lucito, R., Walter, R.B., Kallman, K.D., Morizot, D.C., Vielkind, J.R. (2006): Allele-specific marker generation and linkage mapping on the *Xiphophorus* sex chromosomes. *Zebrafish* 3, 23-37.
- Worth, L. Jr., Clark, S., Radman, M., Modrich, P. (1994): Mismatch repair proteins MutS and MutL inhibit RecA-catalyzed strand transfer between diverged DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 3238-3241.
- Wray, G.A. (2003): Transcriptional regulation and the evolution of development. *Int J Dev Biol* 47, 675-684.

LITERATURVERZEICHNIS

- Wright, C.V.E., Schnegelsberg, P., De Robertis, E.M. (1988): *XlHbox* 8: a novel *Xenopus* homeo protein restricted to a narrow band of endoderm. *Development* 104, 787-794.
- Wysocka-Diller, J., Aisemberg, G.O., Macagno, E.R. (1995): A novel homeobox cluster expressed in repeated structures of the midgut. *Dev Biol* 171, 439-447.
- Xu, Y., Baltimore, D. (1996): Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. *Genes Dev* 10, 2401-2410.
- Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E.E., Bronson, R.T., Meyn, M.S., Baltimore, D. (1996): Targeted disruption of *ATM* leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev* 10, 2411-2422.
- Yang, Q., Zhang, R., Wang, X.W., Linke, S.P., Sengupta, S., Hickson, I.D., Pedrazzi, G., Perrera, C., Stagljar, I., Littman, S.J., Modrich, P., Harris, C.C. (2004): The mismatch DNA repair heterodimer, hMSH2/6, regulates BLM helicase. *Oncogene* 23, 3749-3756.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Yu, Y.Y., Pan, Y.S., Zhu, Z.G. (2007): Homeobox genes and their functions on development and neoplasm in gastrointestinal tract. *Eur J Surg Oncol* 33, 129-132.
- Zander, C.D. (1961): Künstliche Befruchtung bei lebend gebärenden Zahnkarpfen. *Zool Anz* 166, 81-87.
- Zander, C.D. (1967): Ökologische und morphologische Beiträge zur Systematik und geographischen Verbreitung der Gattung *Xiphophorus* (Pisces). *Mitt Hamb Zool Mus Inst* 64, 87-125.
- Zander, C.D. (1969): Über die Entstehung und Veränderung von Farbmustern in der Gattung *Xiphophorus* (Pisces). I. Qualitative Veränderungen nach Artkreuzung. *Mitt Hamb Zool Mus Inst* 66, 241-271.
- Zechel, C. (1988): Molekulare Analyse von *v-erbA* und *v-erbB* homologer Sequenzen in *Xiphophorus*. Dissertation, Universität Gießen.
- Zechel, C., Schleenbecher, U., Anders, A., Anders, F. (1988): *v-erbB* related sequences in *Xiphophorus* that map to melanoma determining Mendelian loci and overexpress in a melanoma cell line. *Oncogene* 3, 605-617.
- Zechel, C., Peters, H., Schleenbecher, U., Anders, F. (1992a): Expression of genes related to the human *erbB*, *erbA*, *pdgf* and *pdgf-2* in tumors of different etiology in *Xiphophorus*. *Int J Cancer* 52, 66-75.
- Zechel, C., Peters, H., Schleenbecher, U., Anders, A., Anders, F. (1992b): *erb-B^a*: an „ignition spark“ for the *Xiphophorus* melanoma machinery? In „Modern Trends in Human Leukemia IX.“ Neth *et al.*, (eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. *Haematology and Blood Transfusion* 35, pp. 213-234.

LITERATURVERZEICHNIS

Zechel, C., Schleenbecker, U., Anders, A., Anders, F. (1993): Regulation of gene expression in the Gordon-Kosswig melanoma system: Approach to study genes involved in the first step of neoplasia. In „Trends in ichthyology.“ Schröder, J.H., Bauer, J., Scharl, M. (eds.), GSF Forschungszentrum, Blackwell Sci Publications, Oxford, England, pp. 93-110.

Zeltser, L., Desplan, C., Heintz, N. (1996): *Hoxb-13*: a new *Hox* gene in a distant region of the *HOXB* cluster maintains colinearity. *Development* 122, 2475-2484.

Zhang, J., Nei, M. (1996): Evolution of *antennapedia*-class homeobox genes. *Genetics* 142, 295-303.

Zhang, Y.M., Xu, B., Rote, N., Peterson, L., Amesse, L.S. (2002): Expression of homeobox gene transcripts in trophoblastic cells. *Am J Obstet Gynecol* 187, 24-32.

Zimmerer, E.J., Kallman, K.D. (1989): Genetic basis for alternative reproductive tactics in the pygmy swordtail, *Xiphophorus nigrensis*. *Evolution* 43, 1298-1307.