

## 5a Zusammenfassung

Innerhalb dieser Doktorarbeit wurden verschiedene Aspekte der Analyse komplexer Genome untersucht. Zunächst wurde die Anwendbarkeit verschiedener, auf Hybridisierung beruhender Techniken für das genetische Kartieren in den Genomen von Zebra- und Medakafisch getestet. Diese sollten ein effizientes Kartieren mit einer hohen genetischen Auflösung erlauben. Die einfachste Möglichkeit Marker zu generieren, die durch Hybridisierung kartiert werden können, ist die IRS-PCR. Diese PCR-Technik nutzt die im Genom eingestreuten repetitiven Elemente aus, um die nicht repetitive Fraktion des Genoms zu amplifizieren, die zwischen zwei dieser Elemente liegt. Dieses komplexe PCR-Produkt wurde kloniert und etwa 1000 individuelle Klone einer rund 16.000 Klone umfassenden Marker-Bibliothek wurden auf kleine 'Southern'-blots hybridisiert, die IRS-PCR-Produkte verschiedener Zebrafischstämme enthielten. Die Klone, die auf den Southernblots einen +/- -Polymorphismus zeigten, wurden anschließend auf "Kartierungsfilter" hybridisiert, die IRS-PCR-Produkte von vier verschiedenen Kreuzungen enthielten. Bei dieser Vorgehensweise traten zwei Schwierigkeiten auf: Zum einen wurden aufgrund einer gewissen Redundanz der Marker-Bank wiederholt die gleichen Klone analysiert. Dieses Problem konnte teilweise gelöst werden, indem die gesamte Marker-Bank durch 'Oligo-fingerprinting' analysiert wurde, und Klone mit ähnlichen 'fingerprints' in Clustern zusammengefaßt, und dann repräsentative Klone verschiedener Cluster untersucht wurden. Das größere Problem war jedoch der hohe Grad an Variabilität innerhalb der Zebrafisch-Stämme, so daß schließlich nur 30% der Marker, die zuvor als polymorph identifiziert wurden, auf der Karte plaziert werden konnten. Insgesamt konnten aber dennoch rund 80 verschiedene Marker auf einer der Referenz-Kreuzungen ausgewertet werden, und 50 davon zeigten genetische Kopplung zu wenigstens einem weiteren Marker.

Im Medakafisch wurde diese Strategie ebenfalls, jedoch mit einer Kombination von Primern, die für drei verschiedene repetitive Elemente komplementär sind, getestet. Aus der 3800 Klone umfassenden Marker-Bank wurden hundert potentielle Marker auf Southern blots getestet. Die Rate an polymorphen Markern lag mit 30 % mehr als doppelt so hoch wie im Zebrafisch. Darüber hinaus waren 50 % der als polymorph identifizierten Marker auch auf einer F<sub>2</sub>-Kreuzung zweier verschiedener Populationen polymorph. Dies zeigt, daß im Medakafisch die Stämme genetisch gut getrennt und innerhalb eines Stammes relativ homozygot sind. Um weitere genetische Marker zu finden, die außerdem eine gleichzeitige Verknüpfung von genetischen Kartierungsdaten und genomischen Klonen erlaubten, wurde für den Medakafisch eine modifizierte AFLP-Methode entwickelt. Nach Hybridisierung von Amplikons, die aus zwei verschiedenen Medakafischstämmen generiert wurden, auf eine Cosmid-Bank, wurden 80 Klone isoliert, die ein differentielles Hybridisierungsmuster aufwiesen. Aus 20 % der so identifizierten Cosmide ließ sich eine Probe isolieren, die sich auf einer F<sub>2</sub>-Geschwister-Kreuzung kartieren ließ.

Ein weiterer Aspekt bei der Untersuchung komplexer Genome ist die vergleichende Sequenzanalyse. Dadurch können Einblicke in Genomevolution und -organisation gewonnen werden. Innerhalb dieser Arbeit wurde ein 40 kb großer Klon aus einer Amphioxus-Cosmid-Bank sequenziert, mit verschiedenen Exon-Vorhersage-Programmen (Grail, GenScan, Mzef) untersucht und mit zwei öffentlichen (Genbank, Swissprot) und einer internen (Amphioxus-EST) Sequenzdatenbanken verglichen. Dabei konnte unter anderem ein Gen der Aldo-Keto-Reduktase-Familie identifiziert werden. Es konnte ferner gezeigt werden, daß sich genomische Sequenzanalyse und EST-Projekte komplementieren.