

**The zebrafish genome:
Strategies and applications for physical and
radiation hybrid mapping**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde des
Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Georg Wilhelm Otto
aus Geislingen/Steige

Berlin 2001

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Lehrach in der Zeit vom April 1997 bis August 2001 angefertigt.

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt habe, sowie keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

1. Gutachter: Prof. H. Lehrach

2. Gutachter: Prof. V. Erdmann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.5.2002

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Hans Lehrach für die Bereitstellung des Themas, für die großzügige Unterstützung und die kritische Begleitung der Arbeit danken.

Bei Herrn Prof. Erdmann möchte ich mich für die Bereitschaft bedanken, die Begutachtung vorzunehmen.

Mein besonderer Dank geht an die Personen, ohne deren Vorarbeiten, Ideen, Anregungen und Mitarbeit diese Arbeit so nicht hätte durchgeführt werden können: Dr. Carola Burgtorf, Matthew Clark, Patricia Nierle, Dr. Pia Aanstad, Alberto Musa, Rene Zeller und Axel Nagel. Ebenso danke ich Dorothea Wagner, Pierre Emmesberger, Mechthild Adams-Bagusche und Anja Kellermann für die technische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Für Unterstützung bei der computergestützten Datenanalyse möchte ich mich bei Dr. Steffen Hennig, Mario Drungowski, Dr. Ralf Herwig, Donald Buczek, Markus Kramer, Thomas Kreitler und Dr. Andreas Hewelt bedanken, ebenso bei Peter Marquardt für die Administration des Unix Systems.

Bei Dr. Gerd-Jörg Rauch und Dr. Robert Geisler vom Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen möchte ich mich für die Zusammenarbeit beim *restriction fingerprinting* und bei der *radiation hybrid* Kartierung bedanken.

Bei den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, Dr. Georgia Panopoulou und Dr. Albert Poustka möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, für die Anregungen und die Motivierung bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts, die mir aufgrund ihrer Sachkenntnis, Erfahrung und Hilfsbereitschaft zur Seite standen. Stellvertretend für viele seien hier genannt: Dr. Heinz Himmelbauer, Dr. Leo Schalkwyk, Claudia Gösele, Heike Zimdahl, Dr. Anna Guerasimova, Dr. Dolores Cahill und Dr. John O'Brien.

Besonderen Dank schulde ich meiner lieben Ehefrau Andrea für ihre liebevolle Unterstützung und Aufmunterung, ebenso meiner gesamten Familie und allen Freunden.

Table of contents

1	Introduction	1
1.1	Zebrafish as a model organism for studying vertebrate development	2
1.2	Mapping and sequencing of complex genomes	8
1.2.1	Genetic linkage mapping.....	9
1.2.2	Radiation hybrid mapping.....	12
1.2.3	Physical mapping	13
1.2.4	Sequencing strategies for complex genomes	16
1.3	High throughput characterisation of the zebrafish transcriptome by gene catalogues and whole mount in situ screens	18
1.4	Cloning of genes identified in mutants	19
1.5	Genome mapping by interspersed repetitive sequence (IRS)-PCR.....	20
1.6	Repetitive elements in the zebrafish genome.....	22
1.7	Physical mapping of zebrafish chromosome 20.....	25
2	Objective	29
3	Materials and Methods.....	30
3.1	Materials.....	30
3.1.1	Laboratory equipment	30
3.1.2	Chemicals and enzymes	31
3.1.3	Oligonucleotides	32
3.1.4	Kits	33
3.1.5	Other materials	33
3.1.6	Nucleic acids	34
3.1.7	E. coli strains, cell lines and zebrafish strains.....	34
3.1.8	Libraries	35
3.1.9	Buffers and Solutions	35
3.1.10	Culture Media.....	37
3.2	Methods.....	38
3.2.1	Isolation of genomic DNA from tissue or adult fish.....	38
3.2.2	Plasmid preparation.....	39
3.2.3	Lysis of yeast cells	39
3.2.4	DNA precipitation	39
3.2.5	Restriction digest.....	40
3.2.6	Dephosphorylation of DNA 5'-ends	40
3.2.7	Ligation of restriction fragments.....	40
3.2.8	Preparation of E. coli cells for electroporation	40
3.2.9	Transformation.....	41
3.2.10	Blue/white selection.....	41
3.2.11	Picking and handling of libraries	41
3.2.12	Spotting of bacterial colonies onto nylon membranes	42
3.2.13	Spotting of DNA onto nylon membranes.....	42
3.2.14	Capillary blotting of DNA onto nylon membranes (“Southern Blotting”).....	43
3.2.15	Labelling by random hexamer priming.....	43
3.2.16	Hybridisation of DNA probes labelled by random priming.....	44
3.2.17	Labelling of oligonucleotides by polynucleotide kinase.....	44
3.2.18	Labelling of “overgo” probes.....	44
3.2.19	Hybridisation of oligonucleotides	45
3.2.20	Generation of amplified restriction fragments	45
3.2.21	Addition of T-overhangs in cloning vectors	46

3.2.22	Cloning of PCR products using the pAMP10 system.....	46
3.2.23	IRS-PCR.....	47
3.2.24	Amplification of plasmid inserts.....	47
3.2.25	DNA Sequencing.....	48
3.2.26	Radiation hybrid mapping of ESTs.....	48
3.2.27	Computational tools and bioinformatics.....	48
4	Results.....	50
4.1	IRS-PCR based methods for mapping the zebrafish genome.....	50
4.1.1	Analysis of the repetitive Mermaid/DANA element.....	50
4.1.2	Identification of a new interspersed repetitive element in the zebrafish genome 58	
4.1.3	Tests of IRS-PCR Primers.....	64
4.1.4	Construction of an IRS marker library.....	66
4.1.5	Characterisation and normalisation of the IRS marker library by oligonucleotide fingerprinting.....	67
4.1.6	Characterisation of IRS-PCR products by sequence analysis.....	73
4.1.7	Radiation hybrid mapping of IRS-PCR products.....	76
4.1.8	High-density arrays of IRS products of pooled large-insert clones on nylon membranes.....	78
4.1.9	Detection of Single Nucleotide polymorphisms in orthologous IRS-PCR products of different zebrafish strains.....	82
4.2	Physical mapping of zebrafish linkage group 20.....	85
4.2.1	Mapping of PACs by hybridisation of oligonucleotides.....	87
4.2.2	Mapping of PACs and YACs by hybridisation of IRS-PCR products.....	90
4.2.3	Assembly of the physical framework map of zebrafish linkage group 20.....	90
4.3	Radiation hybrid mapping of expressed sequence tags.....	94
4.4	Genetic mapping using amplified fragment length polymorphism (AFLP).....	102
5	Discussion.....	104
5.1	IRS-based methods for mapping the zebrafish genome.....	104
5.1.1	Identification and testing of anchor sites for IRS-PCR.....	104
5.1.2	Size distribution of IRS-PCR products.....	105
5.1.3	Complexity of the IRS-PCR amplicon.....	106
5.1.4	Repeat and SNP content.....	106
5.1.5	IRS-PCR pools for physical mapping.....	107
5.1.6	Characterisation of a new interspersed repeat.....	107
5.2	Physical mapping of the zebrafish linkage group 20.....	109
5.2.1	Mapping strategy.....	109
5.2.2	Mapping results.....	110
5.2.3	Significance of the map.....	112
5.3	Radiation hybrid mapping.....	113
5.3.1	Mapping of ESTs with specific expression patterns during embryogenesis.....	113
5.3.2	ESTs homologous to human disease genes.....	113
5.3.3	Mapping and determination of conserved synteny.....	114
5.4	Conclusion and outlook.....	115
6	Summary.....	118
6.1	Abstract.....	118
6.2	Zusammenfassung.....	120
7	Appendix.....	122
7.1	STS markers used to generate oligonucleotide probes.....	122
7.2	Oligonucleotide probes for hybridisation on PAC filters.....	128
7.3	Primers for radiation hybrid mapping.....	133

7.4	Abbreviations	136
7.5	IUPAC-code of wobble nucleotides.....	138
8	Literature	139