



**Analyse der Genexpression verschiedener Kandidatengene  
und der Methylierung im *Xiphophorus* Melanom**

**Analysing Gene Expression of Candidate Genes  
and Methylation in *Xiphophorus* Melanoma**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

**Michael Hausmann**

aus

**Amberg**

Würzburg, November 2019

**Eingereicht am:** .....

Bürostempel

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzende/r:** .....

**1. Betreuer:** .....

**2. Betreuer:** .....

**3. Betreuer:** .....

**(4. Betreuer: .....)**

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Doktorurkunden ausgehändigt am:** .....

# Inhaltsverzeichnis

<b><u>EINLEITUNG.....</u></b>	<b>1</b>
DAS MALIGNNE MELANOM .....	1
XIPHOPHORUS MELANOM MODELL .....	2
XMRK ONKOGEN .....	4
EPIGENETIK IN TUMOREN .....	9
ZIEL DER ARBEIT .....	11
<b><u>MATERIAL.....</u></b>	<b>13</b>
ZELLKULTUR.....	13
VERSUCHSTIERE .....	14
OLIGONUKLEOTIDE .....	15
PLASMIDE .....	17
<b><u>METHODEN.....</u></b>	<b>18</b>
PRÄPARATION DER FISCHE .....	18
ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA .....	18
UMSCHREIBEN IN cDNA.....	18
EXPRESSIONSANALYSE .....	19
ISOLIERUNG VON GDNA AUS GEWEBEN (BLIN & STAFFORD, 1976) .....	19
ISOLIERUNG VON GDNA AUS ZELLEN .....	20
QUANTITATIVE DNA-METHYLIERUNGSANALYSE .....	20
VERDAUVERSUCHE .....	21
<b><u>ERGEBNISSE.....</u></b>	<b>24</b>
EXPRESSION DER KANDIDATENGENE .....	24
GENEXPRESSION IN HUMANEN ZELLINIEN.....	38
Globale Methylierung .....	43
Promotorspezifische Methylierung .....	44

<b><u>DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>49</u></b>
<b>EXPRESSIONSANALYSE DER KANDIDATENGENE .....</b>	<b>49</b>
<b>GLOBALE UND PROMOTORSPEZIFISCHE METHYLIERUNG .....</b>	<b>57</b>
<b>ZUKUNFTSPERSPEKTIVEN .....</b>	<b>59</b>
<b><u>ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b><u>60</u></b>
<b><u>ABSTRACT .....</u></b>	<b><u>62</u></b>
<b><u>LITERATURVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>64</u></b>
<b><u>DANKE .....</u></b>	<b><u>74</u></b>
<b><u>LEBENS LAUF .....</u></b>	<b><u>76</u></b>
<b><u>PUBLIKATIONEN .....</u></b>	<b><u>77</u></b>
<b><u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</u></b>	<b><u>78</u></b>

# Einleitung

## Das maligne Melanom

Das maligne Melanom zählt zu den aggressivsten Krebsarten des Menschen und weist dabei weltweit die größte Steigerung in der Häufigkeit der Neuerkrankungen unter allen Tumoren auf (Houghton & Polsky, 2002). Die Inzidenz dieses tödlichsten Tumors der verschiedenen Arten von Hautkrebs steigt bei der kaukasischen Bevölkerung jährlich um 3-7% (Diepgen & Mahler, 2002; Miller & Mihm, 2006). So hat sich in Zentraleuropa und den USA die Häufigkeit der Neuerkrankungen zu Beginn des 21. Jahrhunderts im Vergleich zu Anfang der 1970er Jahre verdreifacht (Garbe & Leiter, 2009). Bedingt durch die immer älter werdenden Bevölkerungen wird auch in den nächsten Jahrzehnten ein weiterer Anstieg der Inzidenz erwartet (Whiteman, Green, & Olsen, 2016). Die Wahl einer geeigneten Therapie gestaltet sich dabei nach der Metastasierung des Melanoms aufgrund von häufigen Resistenzbildungen als besonders schwierig (B. Lee, Mukhi, & Liu, 2012). Einen essentiellen Schritt zur Entwicklung neuartiger Behandlungen stellt die Erforschung der komplexen Einflüsse von Genen und Umwelt auf die Tumorgenese dar. Gerade der Übergang von benignem zu malignem Gewebe konnte hierbei noch nicht ausreichend aufgeklärt werden. Da die meisten Tumoren erst nach ihrer Exzision in späten Stadien einer wissenschaftlichen Analyse zur Verfügung stehen, ist es schwierig die entscheidenden Mutationen, welche Entstehung und Progression des Melanoms bewirken, auszumachen und in eine zeitliche Abfolge einzuordnen. So kann im Endstadium des Tumors nur schwer zwischen Driver- und Passenger-Mutationen unterschieden werden. Tiermodelle bieten die Möglichkeit einzelne Transformationsschritte der Entartung von Melanozyten auf molekularer Ebene zu untersuchen, soweit die spontane Entstehung des Melanoms durch definierte Kreuzung genetisch induziert werden kann (M. Scharf, 1995). Eines der ältesten Tiermodelle zur Erforschung

genetischer Faktoren des malignen Melanoms ist das *Xiphophorus* Modell, bei welchem sich durch standardisierte Kreuzungen Fische mit uniformen Tumoren hinsichtlich pathologischer und molekularer Eigenschaften züchten lassen (Friend, 1993).

## Xiphophorus Melanom Modell

Die zur Familie der lebendgebärenden Zahnkarpfen (Poeciliidae) gezählten Fische der Gattung *Xiphophorus* sind in den Flußsystemen Mexikos und Zentralamerikas beheimatet (Kallman, 1975). Es sind über 20 verschiedene Arten bekannt, die sich untereinander kreuzen lassen und dabei fertile Nachkommen produzieren (Meyer, Morrissey, & Schartl, 1994). In den späten 20er Jahren wurde von mehreren Wissenschaftlern unabhängig voneinander entdeckt, dass Hybride aus Platys (*X. maculatus*) und Schwertträgern (*X. hellerii*) von selbst eine verstärkte Pigmentierung bis hin zu malignen Tumoren entwickeln, welche als Melanome diagnostiziert wurden (M. Gordon, 1927; Häussler, 1928; Kosswig, 1928). Diese Wucherungen der *Xiphophorus*-Hybride entspringen großen, epidermalen Melanophoren, welche bei den Platyfishen der Elterngeneration für das typische Pigmentmuster der Rückenflosse verantwortlich sind. Im Vergleich zu den Mikromelanophoren, die mit ihrer regelmäßigen Anordnung die Graufärbung der Fische bewirken, sind die sogenannten Makromelanophoren um ein vielfaches größer (300-500µm im Durchmesser), besitzen oft mehrere Zellkerne und neigen dazu mit ihren Zellausläufern übereinander zu wachsen (Borowsky, 1984; M. Gordon, 1927). Die großen Pigmentflecken bilden sich allerdings nicht bei allen *Xiphophorus*-Arten aus und bei Stämmen mit Makromelanophorenmuster kann sich das Auftreten des Zelltyps in einer Generation auf einen einzigen Fisch beschränken oder mehr als 50% der Tiere betreffen (H. Gordon & Gordon, 1957).

Beim klassischen Kreuzungsexperiment nach Gordon, Kosswig und Anders wird zunächst ein weiblicher Platyfish (*X. maculatus*), welcher das

Makromelanophorenmuster *Sd* („spotted dorsal“) trägt, mit einem männlichen Schwertträger (*X. hellerii*) ohne Makromelanophoren gepaart. Die daraus entstehenden F<sub>1</sub>-Hybriden zeichnen sich durch eine verstärkte Pigmentierung der Rückenflosse aus. In einem weiteren Schritt wird ein Weibchen der F<sub>1</sub>-Generation mit einem männlichen *X. hellerii* rückgekreuzt, so dass in der daraus resultierenden BC<sub>1</sub>-Generation drei verschiedene Hybride entstehen. Der Hälfte der Fische fehlen die Makromelanophoren komplett, ein Viertel entspricht der F<sub>1</sub>-Generation, was als „*benignes*“ Melanom beschrieben wird (Vielkind, Schlage, & Anders, 1977), und ein weiteres Viertel entwickelt ein malignes Melanom, welches auch das umliegende Gewebe infiltriert.

Anhand einiger Kreuzungsexperimente wurde ein genetisches Modell für die Entwicklung des Melanoms bei *Xiphophorus*-Hybriden erarbeitet (Anders, 1967, 1991; Malitschek, Fornzler, & Scharl, 1995; Schwab, Ahuja, & Anders, 1976). In dem Modell werden die zwei Genloci *Tu* („Tumor“) und *R* („Regulator“) beschrieben, welche auf verschiedenen Chromosomen liegen und so getrennt vererbt werden können. *Tu* ist ein dominantes, melanozyten-spezifisches Onkogen, das von *R* als Tumorsuppressor unterdrückt werden kann. Dementsprechend bilden sich beim parentalen *X. maculatus*, bei welchem sich beide Loci im Genom befinden, durch die supprimierte Aktivität von *Tu* nur lokal begrenzte Überproduktionen von Makromelanophoren aus, die als Pigmentflecken imponieren. Nach der Kreuzung mit *X. hellerii*, dem *Tu* und *R* fehlen, kommt es in der heterozygoten F<sub>1</sub>-Generation durch den Verlust von je einer Kopie der Loci zu einer eingeschränkten, benignen Hyperproliferation. Durch eine erneute Kreuzung mit *X. hellerii* fehlt bei 25% der Tiere der nächsten Generation *R* gänzlich und so entwickelt sich durch die uneingeschränkte Aktivität des *Tu*-Onkogens ein schnell- und invasiv-wachsendes Melanom aus den Makromelanophoren. Rückkreuzungshybride, denen je eine Kopie der Loci vererbt wurde, entsprechen phänotypisch den Fischen der F<sub>1</sub>-Generation (Meierjohann & Scharl, 2006; Patton, Mitchell, & Nairn, 2010).

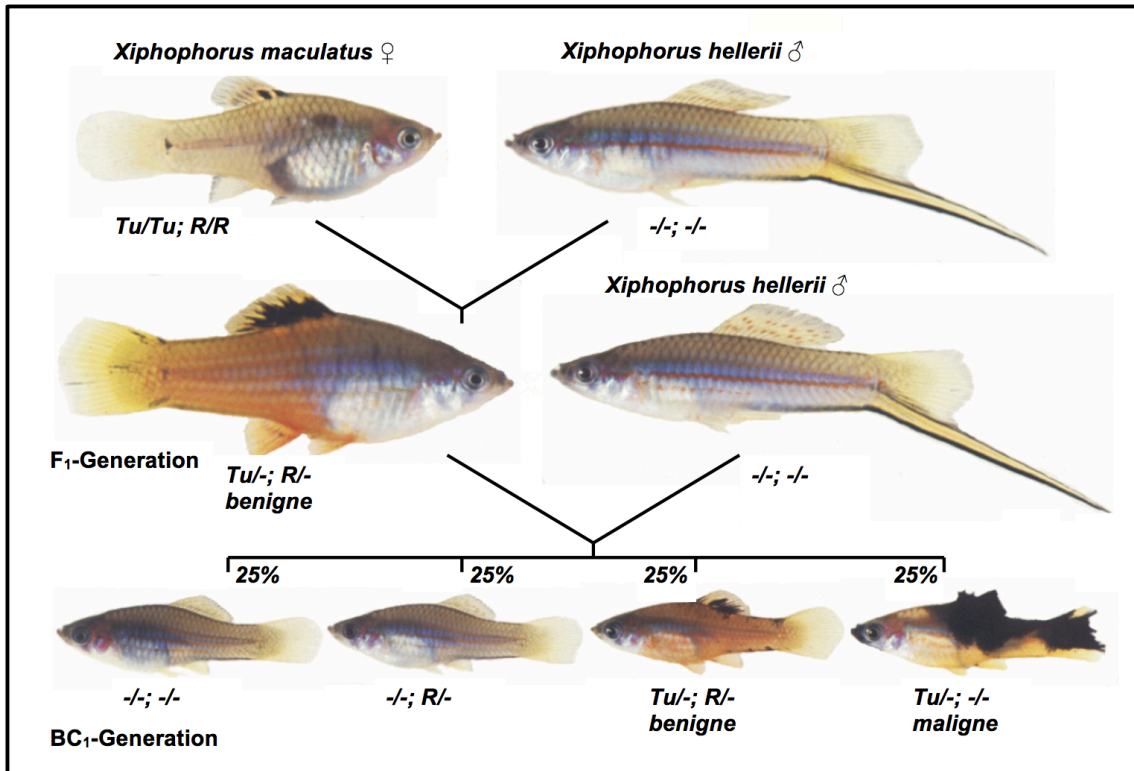


Abbildung 1: Gordon-Kosswig-Anders-Kreuzung. Ein weiblicher Platyfish (*X. maculatus*) mit je zwei Allelen vom gonosomalen *Tu* und autosomalen *R* wird mit einem männlichen Schwerträger (*X. hellerii*) ohne diese Genloci gekreuzt. Ein Nachkomme der F<sub>1</sub>-Generation, welcher heterozygot für *Tu* und *R* ist, wird erneut mit einem Schwerträger gekreuzt. Dies führt zur Segregation der Gene und damit zu drei verschiedenen Phänotypen. Ein Viertel der Fische entwickelt aufgrund des Vorliegens von *Tu* ohne *R* ein malignes Melanom. Ein anderes Viertel entwickelt eine *benigne* Hyperpigmentierung wie die F<sub>1</sub>-Generation. Die restliche Hälfte zeigt keine Änderung des Pigmentmusters (modifiziert von Meierjohann und Schartl, 2006).

## XMRK Onkogen

Mittels positioneller Klonierung konnte gezeigt werden, dass der *Tu*-Locus die Kodierung einer Rezeptortyrosinkinase enthält, welche bisher in keiner anderen Gattung beschrieben wurde und als neues Mitglied zur Familie der EGF-Rezeptoren zählt (Wittbrodt et al., 1989). Das Onkogen wird als *xmrk* (*Xiphophorus melanoma receptor kinase*) bezeichnet und ist durch eine Genduplikation des Protoonkogens *egfrb* entstanden, welches eines der zwei Co-Orthologe des Fisches zum Säuger-EGFR darstellt (Adam, Dimitrijevic, &



Schartl, 1993; Volff et al., 2003). Da bei zwei spontan auftretenden Mutanten die Prädisposition zur Entwicklung eines Melanoms verloren ging, konnte bewiesen werden, dass in der Tat *xmrk* das tumorauslösende Gen ist. Bei einer Mutante war ein großer Teil des Gens deletiert, bei der anderen führte die Einbringung eines Transposons zum Funktionsverlust (M. Schartl, Hornung, Gutbrod, Volff, & Wittbrodt, 1999; Wittbrodt et al., 1989).

Wie vergleichende Aminosäuresequenzanalysen zeigen konnten, sind sich *xmrk* und *egfrb* immer noch sehr ähnlich und unterscheiden sich nur durch ein paar Auswechslungen von Nukleotiden, die sich seit der Duplikation angesammelt haben. Diese Wechsel führen zu einem Austausch von 19 Aminosäuren beim Xmrk Protein im Vergleich zu dem von Egfrb (Dimitrijevic et al., 1998). Zwei dieser Mutationen in Xmrk lassen sich auf der extrazellulären Domäne des Transmembranrezeptors finden und sind für die stetige, ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors verantwortlich, wie in in-vitro Experimenten gezeigt werden konnte. Der Serin-Cystein-Ersatz in Position 555 (C555S) und der Austausch von Glycin durch Arginin in Position 336 (G336R) führen unabhängig voneinander zur Störung von intramolekularen Disulfidbrücken, welche somit freie Cysteinreste im extrazellulären Teil des Xmrk-Rezeptormonomers offenlegen. Sobald sich zwei dieser Monomere mit ungebundenen Cysteinresten einander nähern, bilden sich Disulfidbrücken zwischen den Molekülen aus (Gomez, Wellbrock, Gutbrod, Dimitrijevic, & Schartl, 2001). Das daraus resultierende Dimer gleicht einem Liganden gebundenen Rezeptor und aktiviert so die intrazelluläre Kinase, was zu einer konstitutiven Autophosphorylierung von Xmrk führt (Meierjohann, Mueller, Schartl, & Buehner, 2006). Diese permanente Aktivierung von Xmrk allein ist ausreichend, um über intrazellulärer Signalwege und deren zellulären Antworten ein vollständiges Bild einer neoplastischen Zelle zu prägen. Dies konnte durch die Einbringung von *xmrk* in transgenen Medakas (*Oryzias latipes*) bewiesen werden. Obwohl diese Fische normalerweise keine Tumorneigung zeigen, bewirkte die Expression von *xmrk* in ihnen eine rasche Entwicklung von Tumoren, welche auch gehäuft auftraten (Manfred Schartl et al., 2010; Winkler, Wittbrodt, Lammers, Ullrich, & Schartl, 1994).

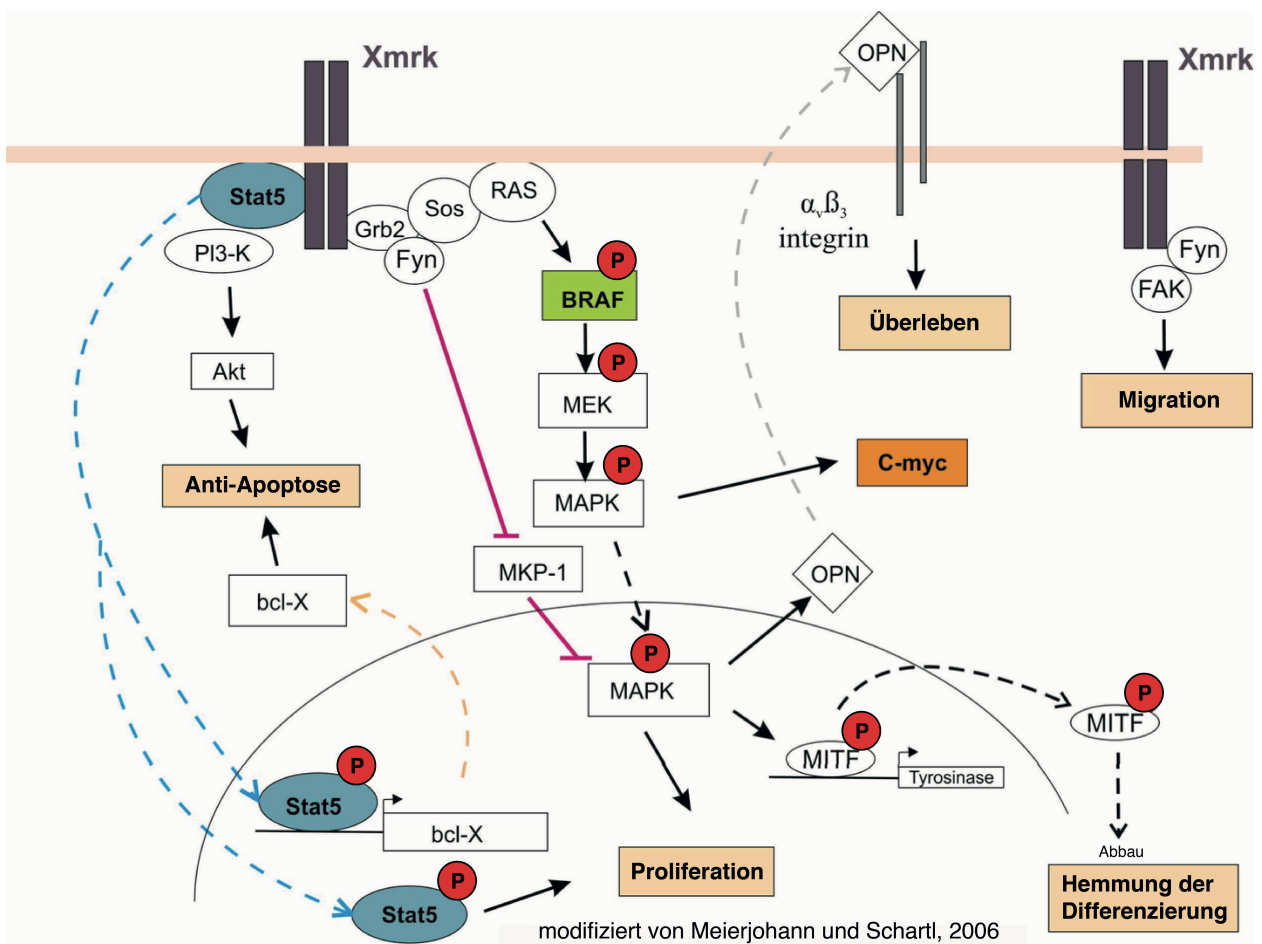


Abbildung 2: Schematische Darstellung der mit *Xmrk* verknüpften Signalwege.

### Xmrk Signalwege

Der Übergang einer normalen Zelle zur Krebszelle wird durch Aktivierung verschiedener Signalwege begleitet. *Xmrk* gelingt es alle entscheidenden Transformationen in der Zelle in Gang zu setzen.

Einerseits muss eine unkontrollierte Proliferation gewährleistet werden, andererseits wird die Apoptose als natürlicher Schutz vor Zellentartung umgangen. Der Transkriptionsfaktor Stat5 (signal transducer and activator of transcription 5) wird durch *Xmrk* aktiviert und fördert Zellproliferation sowie die Vermehrung des antiapoptotischen Proteins Bcl-x (Baudler, Scharf, & Altschmied, 1999; Hassel, Winnemoller, Scharf, & Wellbrock, 2008; Morcinek, Weisser, Geissinger, Scharf, & Wellbrock, 2002). Des Weiteren ist es nötig, die Differenzierung der Zellen zu unterbinden. Eine Bindung des Adapterprotein Grb2 an *Xmrk* kann den Ras/Raf/Erk1/2 Signalweg in Gang setzen, wobei das aktivierte Erk1/2 die Differenzierung von Pigmentzellen über die Destabilisierung des dafür spezifischen Transkriptionsfaktors Mitf hemmt

(Delfgaauw et al., 2003; Wellbrock, Weisser, Geissinger, Troppmair, & Schartl, 2002). Auch die Transkription weiterer Zielgene wie z.B. *ostepontin (opn)* und *matrix metalloproteases (mmps)* wird über das durch Xmrk aktivierte Erk1/2 vorangetrieben. Produktion und Sekretion des Proteins Opn blockiert über die Bindung von Integrinen auf der Oberfläche der Zellen deren Apoptose (Geissinger, Weisser, Fischer, Schartl, & Wellbrock, 2002). Matrix-Metalloproteasen sind sekretierte Proteine, deren Aktivierung von den Melanozyten für einen erfolgreichen Weg durch den Zellzyklus benötigt wird und die somit eine proliferative Wirkung haben (Meierjohann et al., 2010; Meierjohann, Wende, Kraiss, Wellbrock, & Schartl, 2006). Das zytoplasmatische Enzym Fyn, ein Mitglied der Familie der Tyrosinkinase, wird direkt von Xmrk aktiviert (Wellbrock & Schartl, 1999). Fyn ist zum einen daran beteiligt den Spiegel von aktiviertem Erk1/2 hochzuhalten, indem es Mkp-1 inhibiert (Wellbrock et al., 2002). Weiterhin ist die Migration in andere Gewebe und die Infiltration dieser ein Kennzeichen maligner Zellen. So moduliert Fyn die Aktivität von Fak (focal adhesion kinase) und löst dadurch Zellkontakte, was zur Migrationsfähigkeit der Tumorzelle beiträgt (Meierjohann, Wende, et al., 2006). Zuletzt führt ein durch Fyn, Xmrk und Pi3K (phosphoinositide-3 kinase) gebildeter Komplex zur Aktivierung des Pi3K/Akt-Signalwegs und somit zu weiterer Proliferation der Melanomzellen (Wellbrock, Fischer, & Schartl, 1999; Wellbrock et al., 2002).

Zuletzt ist die Fähigkeit zur Angiogenese, also Wachstum von Blutgefäßen, essentieller Bestandteil für die Klassifizierung einer Krebszelle (Cree, 2011). Xmrk gelingt es über reaktive Sauerstoffspezies NF- $\kappa$ B auch ohne vorherrschende Hypoxie zu aktivieren. Dadurch wird die Sekretion proangiogener Faktoren, wie z.B. Angiogenin, angeregt und somit die Gefäßversorgung des Tumors verbessert (Schaafhausen et al., 2013).

Damit lässt sich anhand der genannten Mechanismen zeigen, wie es Xmrk alleine möglich ist eine Zelle in eine Neoplasie mit allen typischen Faktoren zu verwandeln.

## Xmrk Expression

Nachdem *xmrk* als von *Tu* codiertes Onkogen ausgemacht worden war, zeigten verschiedene Studien, dass neben den Mutationen, welche eine ständige Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinase bewirken, auch eine transkriptionelle Verstärkung der Genexpression von *xmrk* für die Entartung der Pigmentzellen nötig ist. So entdeckte man mit Hilfe von Northern Blot und semi-quantitativer RT-PCR, dass das Onkogen *xmrk* tatsächlich nur in den malignen Melanomen von Rückkreuzungshybriden überexprimiert wird. In benignen Läsionen wurden hingegen nur geringe Expressionslevel des Onkogens detektiert (Adam, Maueler, & Schartl, 1991; Maueler, Schartl, & Schartl, 1993; M. Schartl et al., 1999). Auch in manchen normalen Organen und Geweben von krebserkrankten Hybriden und deren parentalen *X. maculatus* wurden geringe *xmrk* mRNA Spiegel entdeckt, jedoch nicht in allen (M. Schartl et al., 1999; Woolcock, Schmidt, Kallman, & Vielkind, 1994). Im Gegensatz dazu wurde das Protoonkogen *egfrb* in den meisten Geweben auf einem geringen Niveau exprimiert (M. Schartl et al., 1999; Woolcock et al., 1994). Anhand dieser Daten lässt sich schlussfolgern, dass sich die transkriptionelle Aktivierung von *xmrk* auf die Melanozyten der Rückkreuzungshybride ohne *R* beschränkt. Des Weiteren zeigt sich dadurch, dass sich die Entwicklung eines Melanoms auf eine Überexpression von *xmrk* zurückführen lässt und somit das Fehlen des Regulators *R* die erste Stufe in der Entwicklung eines Melanoms darstellt, wobei *R* als Tumorsuppressor die Expression von *xmrk* direkt oder indirekt über die Transkription regelt.

Dass *xmrk* ausschließlich in den malignen Melanomen von Rückkreuzungshybriden überexprimiert wird, lässt auf die Existenz pigmentzell-spezifischer, regulatorischer Elemente im *xmrk* Promotor schließen. Als weiteren Beweis für die melanozytäre Spezifität des Promotors, kann man die Ergebnisse von Experimenten mit transgenen Medakas heranziehen. So zeigte sich, dass *xmrk* kontrolliert durch einen ständig aktivierten Promotor in Embryonen dieser Fische auch andere Zelltypen maligne transformierte (Winkler et al., 1994; Winnemoeller, Wellbrock, & Schartl, 2005). Infolgedessen scheint die Entstehung von Melanomen in Rückkreuzungshybriden aufgrund

der pigmentzell-spezifisch erhöhten Aktivität des *xmrk* Promotors und der damit verstärkten Expression von *xmrk* auf Pigmentzellen beschränkt zu sein.

## Epigenetik in Tumoren

### Grundlagen der Epigenetik

Einen weiteren Mechanismus in der Regulierung von Genexpressionen stellen Veränderungen der Epigenetik dar. Dabei handelt es sich um vererbare Modifizierungen des DNA-Rückgrats und der DNA-Verpackung ohne Beeinflussung der Basenabfolge (Baylin, 2005). Die drei wesentlichen Vorgänge beinhalten DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und nicht-codierende RNAs wie miRNAs und lncRNAs (J. J. Lee, Murphy, & Lian, 2014).

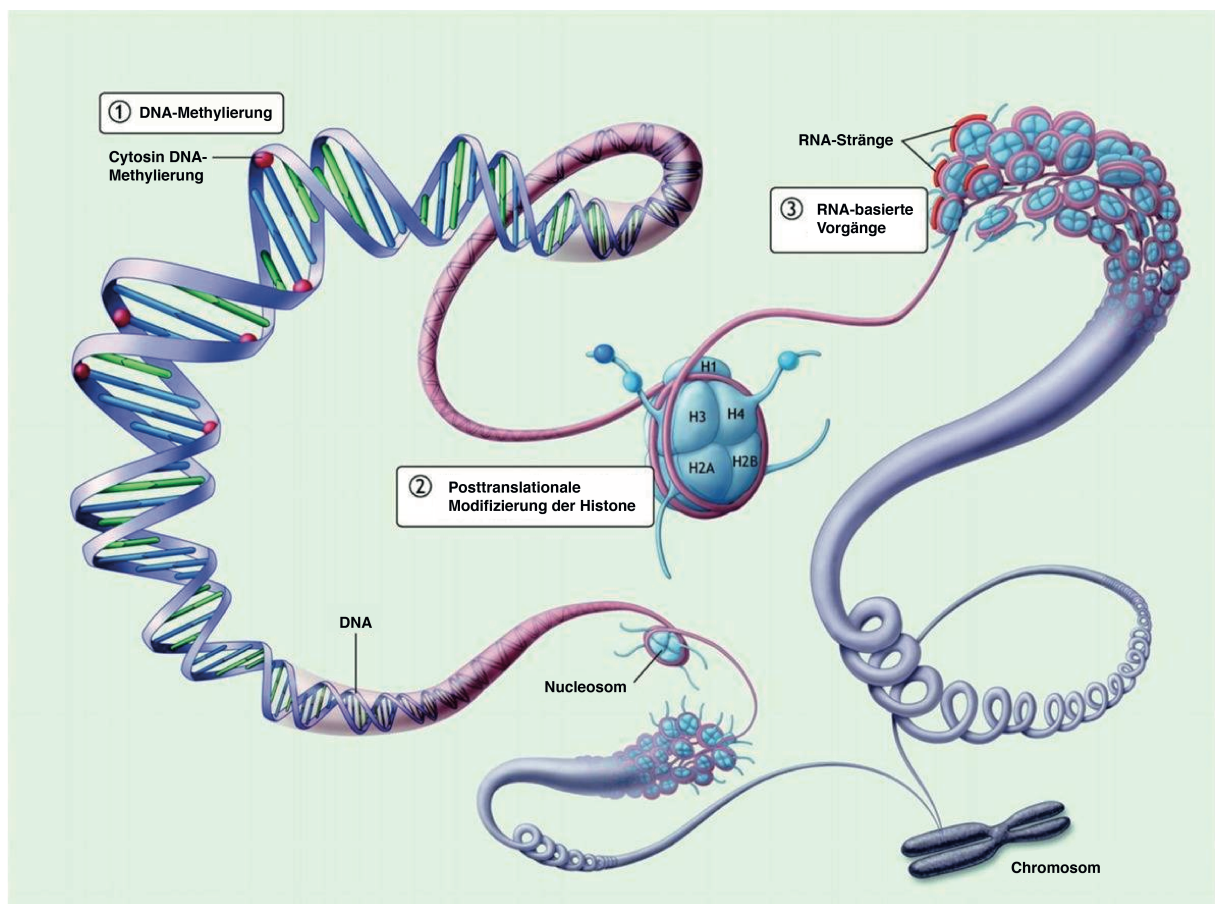


Abbildung 3: Überblick der drei grundlegenden Mechanismen in der Epigenetik. 1) DNA-Methylierung. 2) Histonmodifikation. 3) RNA-basierte Mechanismen einschließlich miRNA und lncRNA. (modifiziert von J. J. Lee, Murphy, & Lian, 2014)

Der bisher am besten untersuchte Vorgang ist die DNA-Methylierung. Bei Vertebraten kann die DNA an Position 5 des Cytosinrings methyliert werden, wenn ein Guanin auf das Cytosin folgt, auch CpG (Cytidin, Phosphat, Guanosin) genannt. Das daraus entstehende 5-Methylcytosin (5-mC) wird oft als die „fünfte Base“ bezeichnet (R. Lister & Ecker, 2009). Die Hauptaufgabe der DNA-Methylierung scheint darin zu bestehen Gene über ihre Promotoren, die gehäuft CpGs beinhalten, abzuschalten. So kann in enddifferenzierten Zellen gewährleistet werden, dass potenziell schädliche Erbfaktoren nicht reaktiviert werden (Guibert & Weber, 2013). Ein bekanntes Beispiel für vollständig methylierte CpG-Inseln, Regionen mit statistisch gehäufte CpG-Dinukleotid-Dichte, stellt das inaktivierte X-Chromosom im weiblichen Geschlecht dar. Katalysiert wird die DNA-Methylierung von DNA-Methyltransferasen, welche S-Adenosyl-Methionin als Methylgruppendonor nutzen (Catoni, 1953).

#### Epigenetik in Krebserkrankungen

In der Entstehung und Progression von Tumoren scheinen Veränderungen der Epigenetik eine genauso wichtige Rolle zu spielen wie es die Unterdrückung von Tumorsuppressorgenen und Aktivierung von Onkogenen tun (Jones & Baylin, 2002). Globale Hypomethylierung ist ein typisches Kennzeichen der DNA von Tumorzellen und kann in nahezu allen Krebsgeweben nachgewiesen werden (Feinberg & Tycko, 2004). Bereits in den 80er Jahren gelang es zum ersten Mal zu zeigen, dass der genomische Gehalt von 5-Methylcytosin in den damals untersuchten Tumortypen, sowohl den benignen als auch malignen, signifikant verringert war (Riggs & Jones, 1983). Sogar präkanzeröse Adenome wiesen eine universelle Veränderung der DNA-Methylierung auf (Gama-Sosa et al., 1983; Goelz, Vogelstein, Hamilton, & Feinberg, 1985). Dabei scheint es zwei wesentliche Mechanismen zu geben, die zur Tumorentstehung beitragen. Zum einen wird durch die Aktivierung von Retrotransposons und Chromosomenbrüche, begünstigt durch die Abnahme des Heterochromatins, genomische Instabilität gefördert. Der Verlust von stabilisierender Methylierung perizentromerischer Regionen trägt ebenfalls dazu bei (Herman & Baylin,

2003). Zum anderen führt die Hypomethylierung zur transkriptionellen Aktivierung von Onkogenen wie zum Beispiel der Cancer/Testis Antigene oder auch R-RAS (Nishigaki et al., 2005; Van Tongelen, Lorient, & De Smet, 2017). Neben der veränderten Methylierung von Onkogenen ist oft auch die der Tumorsuppressoren auffällig. Dass Onkogene häufig hypomethyliert und Suppressoren oft hypermethyliert sind, deutet auf eine entscheidende Rolle der Epigenetik in der Tumorentwicklung hin (Jiang, Liu, Chen, Cao, & Tao, 2013). In den Melanomzellen des *Xiphophorus* konnte ebenfalls eine Hypomethylierung an mehreren Stellen der Promotorregion des *Xmrk* Onkogens nachgewiesen werden. Der *Xmrk* Promotor der Melanomzelllinie PSM zeigte sich dabei sogar komplett unmethyliert (Altschmied, Ditzel, & Scharl, 1997). Untersuchungen zur globalen Methylierung in Melanomen des *Xiphophorus* wurden bisher noch nicht publiziert.

## Ziel der Arbeit

Im ersten Teil der Arbeit wurde die differenzielle Expression bestimmter Gene in Geweben verschiedener Dignität untersucht. Dafür wurden Gene via RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) ermittelt, die unterschiedliche RNA-Level in benignen und malignen Proben des *Xiphophorus* aufwiesen. Neben *xmrk* wurde die Expression zehn anderer Gene mittels qPCR kontrolliert. Diese Kandidatengene stellten sich aus den Bereichen Kandidaten des *R Locus*, Gene der Pigmentierung, Protoonkogene, Gene der Vaskularisierung sowie wenig erforschte Gene zusammen. In einem weiteren Schritt wurde außerdem die Expression eines Teils dieser Gene in humanen Zelllinien gemessen und mit den Ergebnissen der Fischproben verglichen.

Das zweite Ziel der Arbeit war die Analyse der Epigenetik im *Xiphophorus Melanom Modell*. In menschlichen Krebsgeweben lässt sich gehäuft eine globale Hypomethylierung nachweisen, was auch auf Malignitäten anderer Lebewesen zutreffen könnte. Um diese Hypothese im *Xiphophorus* zu testen,

wurde der Gehalt an 5-Methylcytosin sowohl in malignen als auch in benigneren Geweben analysiert und mit Kontrollproben verglichen.

Des Weiteren ist aus Studien bekannt, dass die Progression einer Krebserkrankung oft mit dem Verlust der promotorspezifischen Methylierung von Onkogenen einhergeht (Nishigaki et al., 2005; Van Tongelen et al., 2017).

Auch im *Xiphophorus* konnte bereits eine Hypomethylierung des *xmrk*-Promotors nachgewiesen werden (Altschmied et al., 1997). Um diese Ergebnisse zu validieren, wurden die Promotoren von *xmrk* und *egfrb* mithilfe von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen und qPCR auf ihre Methylierung untersucht.



# Material

## Zellkultur

Fischzelllinien:

PSM (Platy-Swordtail-Melanoma)

Die *Xiphophorus*-Melanom-Zelllinie PSM (Wakamatsu, 1981) wurde in F12-Medium (Gibco), welches zuvor mit 15% FCS (Fetales Kälberserum) und Penicillin/Streptomycin versetzt wurde, gehalten.

SdSr24, Xm25

Die von embryonalen Fibroblasten des *X.maculatus* abstammenden Zelllinien SdSr24 und Xm25 wurden in DMEM-Medium (Gibco) kultiviert. Dem Medium wurde 15% FCS und Penicillin/Streptomycin zugegeben.

Alle Fischzelllinien wurden bei 28°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Humane Zelllinien:

NHEM (Normal Human Epidermal Melanocytes)

Die Zelllinie NHEM (aus der Vorhaut gewonnene, normale, epidermale Melanozyten) wurde in F10-Medium (Gibco) mit Zugabe von 20% FCS, Penicillin/Streptomycin, 0.1% ITS-Premix (Insulin 5µg/ml, Transferrin 5µg/ml, Selenige Säure 5ng/ml), 200nM Choleratoxin und 100µM IBMX in Kultur gehalten.

A375, UACC-62, SKMEL28 – Melanom

Die Zelllinien A375, UACC-62 und SKMEL28 wurden in DMEM-Medium (Gibco) mit einer Zugabe von 10% FCS und Penicillin/Streptomycin kultiviert.

## Hermes3a – Immortalisierte Melanozyten

Die Zelllinie Hermes3a wurde in RPMI-Medium (Gibco) gehalten, welchem zuvor 10% FCS, Penicillin/Streptomycin, 200nM TPA, 200pM Choleratoxin, 10ng/ml hSCF und 10nM Edn1 hinzugegeben wurde.

Alle humanen Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten.

## Versuchstiere

Alle benutzten Fische wurden unter Standardbedingungen (Kallman, 1975) im Aquarium des Biozentrums der Universität Würzburg gekreuzt und gehalten.

Es handelt sich dabei um folgende Stämme:

- WLC 407: Rückkreuzungs-Hybride von *X. maculatus* (WLC 1274) und *X. hellerii* (WLC 1337). Die stetige Kreuzung von Makromelanophoren-Locus „Spotted dorsal“ ( $mdl^{Sd}$ - $xmrk^B$ ) tragenden Fischen mit *X. hellerii* als wiederkehrenden Partner wurde über 20 Generationen hinweg durchgeführt. So entstand eine isogene Linie des *X. hellerii* (WLC 1337), welche eine Kopie der  $mdl^{Sd}$ - $xmrk^B$  Region aus dem X-Chromosom des *X. maculatus* enthält. Bei der Hälfte der weiteren Rückkreuzungsgeneration entwickeln sich von selbst Melanome, wobei sich die Schwere dieser im Bereich von gutartigen, oberflächlichen, melanozytären Hyperpigmentierungen bis hin zu malignen, invasiv und exophytisch wachsenden Tumoren unterschiedlich ausprägt. Weniger als 10% der adulten Fische zeigen einen benigneren Phänotyp.
- WLC 534: Rückkreuzungs-Hybride, die genotypisch und phänotypisch den WLC 407 gleichen mit Ausnahme der Heterozygotie im Albino-Locus ( $a/+$ ). Hier macht der benignere Phänotyp weniger als 20% aus.

- WLC 1116: Rückkreuzungshybride, genannt Lof-1, mit *mdl*<sup>Sd</sup>-*xmrk*<sup>B</sup> Wildtyp X-Chromosom und genetischem Hintergrund von *X. hellerii*. Lof-1 ist ein spontaner Mutant, der von A. Anders, Gießen, in den frühen 80er Jahren isoliert wurde. Zur Erhaltung werden die Weibchen mit Männchen aus der isogenen Linie des *X.hellerii* (WLC 1337) gekreuzt. Der Stamm ist auch als ArDr-Stamm bekannt (M. Scharl et al., 1999).

## Oligonukleotide

### Oligonukleotide für qPCR

Gen	Name des Primers	Sequenz 5'-3'
<b>Human</b>		
<b>PDGFRB</b>	H_pdgfrb_f	CAACCTCACTGGGCTAGACA
	H_pdgfrb_r	GCATGGAATGGTGATCTCAG
<b>MITF</b>	mitf_human_f2	CGTCTGCAATCGCATCTTT
	mitf_human_r2	TAGCTCGTGGGAAAACCACT
<b>C-MYC</b>	Cmyc_human_f	TCCTCGGATTCTCTGCTCTC
	Cmyc_human_r	CCTGCCTCTTTTCCACAGAA
<b>KIT</b>	Kit_human_f	GATGACGAGTTGGCCCTAGA
	Kit_human_r	TCTTTGTGATCCGACCATGA
<b>PDCD4</b>	Pdcd4_human_f	GAGCTGTTGGAGATGGAATTTT
	Pdcd4_human_r	CCAGAGCCCCACACACTATC
<b>Xiphophorus</b>		
<b>pdcd4a</b>	Xmac_pdcd4a_f	CACGTCCTTCCCATGAACTT
	Xmac_pdcd4a_r	ACCAACACCCCACACGTTAT
<b>kita</b>	Xmac_kit-a_f	GTCCATAGTGGCCGTTACCT
	Xmac_kit-a_r	CGTTGTTTCCCTCACGAATA
<b>kitb</b>	Xmac_kit-b_f	GTTCAAGCACGCTCTCCATA
	Xmac_kit-b_r	TCTTTGACGTCTTGGATTGG

<b><i>cmyc</i></b>	Xmac_c-myc_f	AAGCAGACTGCAGGGACAG
	Xmac_c-myc_r	CGCGTGCCTTTTCTCTAC
<b><i>ef1a</i></b>	Xmac_ef1a_f	AGTGAAATCCGTGGAGATGC
	Xmac_ef1a_r	ATCTGACCTGGGTGGTTCAG
<b><i>xmrk</i></b>	qPCR_3UTR_xmrk_f01	ACGCATCTGGAAAATGAACA
	qPCR_3UTR_xmrk_r01	AGCGCCCAGGATTA AACAT
<b><i>pdgfrb</i></b>	pdgfrb_Xipho_f	CATGATAAAGGAAGTGGCAGTG
	pdgfrb_xir	GATGACAGTGATGTTTGGGTTG
<b><i>xirp2b</i></b>	Xirp2b_Xipho_f	ATACCCAGGAAGCTTCAACATC
	xirp2b_Xir	CAGGTTGCTGTCATTGTAGGTC
<b><i>mxra5a</i></b>	mxra5a_Xipho_f	CTGCAGTATGAGTTGGTTGCAT
	mxr_xir	AAGGAAACTGATGACTGGGCTA
<b><i>mitfa</i></b>	mitfa_Xipho_f02	ATCCCAAATGCTGGAGATG
	mitfa_Xipho_r02	CAGGTA CTGCCTCACCTGCT
<b><i>mitfb</i></b>	mitfb_Xipho_f01	GTCTCCCACTACCCACAAA
	mitfb_Xipho_r01	GAACCAAGCTTTCC CAGGTA
<b><i>cdkn2ab</i></b>	cdkn2ab_Xipho_f01	ACGGGGTGAATAGTTTTGGA
	cdkn2ab_Xipho_r01	GCTTTTGTCCGTAACGTTTG

### Oligonukleotide für Methylierungsanalyse

Gen	Name des Primers	Sequenz 5'-3'
<b>Xiphophorus</b>		
<b><i>xmrk</i></b>	Xmrk_XY_qf056	CTGTCCTGCCATCCTCTTCT
	ChIP_xmrk_proximal_r01	ATGAAGACGGTCCGGTTAGA
	ChIP_xmrk_proximal_f01	CGAGGACTTCTGACACCTT
<b><i>egfrb</i></b>	xipho_egfrb_f	TGAGCCCTGAATGTGTTCTG
	xipho_egfrb_r	GAAGACGGTCCGGTTAGAAA
	Xipho_egfrb_kontr_f	AGGTGTGTGTTGGAGGTGTG
	Xipho_egfrb_kontr_r	GGGAAACTGGAGCAGAATGA

# Plasmide

pLUC+-306bpxmrkB

Kontrollvektor für *xmrk*<sup>B</sup> Promotor

pLUC+-3kbegfrb

Kontrollvektor für *egfrb* Promotor

Die beiden Vektoren enthalten jeweils die Sequenz der Promotorregion von *xmrk* und *egfrb*.

# Methoden

## Präparation der Fische

Nachdem die Fische auf Eis getötet worden waren, erfolgte die Entnahme der Kontrollgewebe sowie die sorgfältige Exzision der Tumorproben. Dabei wurden die Tumorgewebe der Rücken- und Schwanzflossen, bezeichnet als benigne Läsionen und maligne Melanome, mittels Pinzette und Schere abgetrennt. Exophytisches Tumorwachstum und benigne Hyperpigmentierungen wurden je am Schwanzstil mithilfe eines Skalpells abgelöst. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Gewebe einzeln weiterverarbeitet und die RNA-Konzentration bestimmt.

## Isolierung von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus Zelllinien und *Xiphophorus*-Gewebeproben wurde mithilfe von TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers isoliert und zur Lagerung bei -80°C eingefroren. Die Kontrollgewebe Auge und Kieme wurden dabei aus den Organen von bis zu vier Fischen gepoolt.

## Umschreiben in cDNA

Nach einer DNase-Behandlung wurden je 2µg RNA unter Verwendung des RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits (Thermo Fisher Scientific) mit Random Hexamer Primern anhand der Anleitung des Herstellers zu cDNA transkribiert.

# Expressionsanalyse

Für jede Probe in der quantitativen Echtzeit-PCR wurde cDNA aus 50ng Gesamt-RNA benutzt. Amplifikation und Messung wurden unter Verwendung von SYBR Green mit dem Mastercycler® ep realplex (Eppendorf) durchgeführt. Zur Quantifizierung wurde die Expression jedes Gens mithilfe eines Haushaltgens nach der delta CT Methode normalisiert (Simpson, Feeney, Boyle, & Stitt, 2000). Bei den *Xiphophorus*-Geweben und Zelllinien diente dafür *ef1a* (*elongation factor 1 alpha*) als Haushaltsgen, für die humanen Zelllinien wurde das ribosomale Protein S14 (RPS14) genutzt.

Signifikanzen wurden nach dem Welch-Test (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ) und Korrelationen nach Spearmans Rangkorrelationskoeffizient ( $r_s$ ) berechnet.

PCR-Primer wurden mithilfe der Primer3 Software erstellt.

(<http://primer3.ut.ee/>) (Rozen & Skaletsky, 1999)

## Isolierung von gDNA aus Geweben (Blin & Stafford, 1976)

Zunächst wurden die Fische auf Eis getötet, die Gewebeproben anschließend entnommen und in je 1ml Extraktionspuffer (0.1M EDTA (pH 8.0), 0.2M NaCl, 0,2% SDS, 200µg/ml Proteinase K (frisch zugesetzt)) gegeben. Mithilfe eines Glashomogenisators wurden die Proben zerkleinert und die Kontrollgewebe bei 80°C für drei Stunden in einem Wasserbad inkubiert. Die Tumorproben selbst wurden direkt weiterverarbeitet.

Nach Zugabe von einem halben Volumen Phenol wurden die Proben für 10 Minuten auf einem Schwenker geschüttelt. Nach Hinzufügen von einem halben Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zu jeder Probe wurden diese erneut für 10 Minuten geschwenkt und anschließend für 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert (Eppendorf 5415D Centrifuge). Dieser Vorgang wurde mit einem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol wiederholt und daraufhin der Überstand in

ein gekühltes, autoklaviertes Corex-Röhrchen gegeben. Unter Verwendung von zweieinhalb Volumen kalten Ethanols (EtOH) 100% wurde die DNA für 20 Minuten gefällt und danach auf Glasstäbchen gewickelt. Diese wurden dann in kalten Ethanol 70% getaucht und kurz getrocknet. Zuletzt wurde die DNA in ca. 200-500µl TE (10mM Tis-Cl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)) bei 4°C gelöst.

## Isolierung von gDNA aus Zellen

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 2ml Lysisbuffer (150mM NaCl, 20mM Tris (pH 7.5), 5mM EDTA, 0.5% SDS, 10mg/ml Proteinase K (frisch zugesetzt), 100µg/ml RNase A) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zu je 500µl in vier Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, wurde jeweils ein äquivalentes Volumen Phenol/Chloroform hinzugegeben und das Gefäß vorsichtig mehrmals invertiert. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand in ein neues Gefäß pipettiert, mit 500µl Chloroform versetzt und erneut mit gleicher Geschwindigkeit und Länge zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die DNA mit 1/10 Volumen 3M NaAc und 2.5 Volumen kaltem EtOH 100% für 20 Minuten bei -20°C gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 500µl 75% EtOH gewaschen und nochmal unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Als letzten Schritt wurde der Überstand verworfen, das Pellet für fünf Minuten getrocknet und anschließend in 100µl TE aufgenommen.

## Quantitative DNA-Methylierungsanalyse

Es wurden je 100ng gDNA verschiedener Tumor- und Kontrollgewebe mithilfe des MethylFlash™ Methylated DNA 5-mC Quantification Kit (Epigentek) kolorimetrisch quantifiziert. Das Experiment wurde nach der Anleitung des



Herstellers durchgeführt und anschließend mit dem Mikroplattenleser TriStar LB 941 (Berthold Technologies) bei 450nm gemessen.

## Verdauversuche

### *Vorverdau*

Je 2µg gDNA der verschiedenen Tumor- und Kontrollgewebe wurden zunächst mit HindIII (Thermo Fisher Scientific) im empfohlenen Buffer nach Anleitung des Herstellers über Nacht verdaut. Nach der Hitzeinaktivierung des Enzyms, wurde je ein halbes Volumen Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugegeben und die Mischung daraufhin auf dem Vortex (Bender & Hobein) geschüttelt sowie bei 13000 rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Dem Überstand wurde nach dem Überführen 1/10 Volumen 3M NaAc und 2.5 Volumen kalter Ethanol 100% hinzugefügt, die Probe anschließend gemischt und bei -70°C für 30 Minuten inkubiert. Zum Pelletieren wurde daraufhin 15 Minuten lang mit 10 000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der entstandene Überstand abgekippt. Nach dem Waschen des Pellet mit 75% EtOH, wurde dieses luftgetrocknet und anschließend in 20µl Nuklease-freiem Wasser gelöst.

### *Methylierung*

Je ein Ansatz mit 3µg der *egfrb* Vektoren (pLUC+-3kbegfrb) und 3µg der *xmrk* Vektoren (pLUC+-306bpxmrkB) wurde durch die CpG Methyltransferase M.SssI (Thermo Fisher Scientific) nach Anleitung des Herstellers für eine halbe Stunde im angegeben Puffer methyliert. Dazu wurde ein Kontrollansatz ohne Enzym zur Methylierung angesetzt.

### *Verdau*

Es wurden sowohl von den HindIII-verdauten Proben, als auch von den methylierten und unmethylierten Vektoren je zweimal 1µg mit den methylierungssensitiven Enzymen HhaI (für *egfrb*) bzw. SsiI (für *xmrk*; beide Thermo Fisher Scientific) im empfohlenen Buffer nach Anleitung des Herstellers

über Nacht verdaut, wobei einem der Ansätze zur Kontrolle statt des Enzyms nur Wasser hinzugegeben wurde.

### *Auswertung*

Je 100ng der verdauten gDNA-Proben und 1pg des Plasmids wurden anhand von quantitativer Echtzeit-PCR mit promotorspezifischen Primern (*xmrk*, *egfrb*) ausgewertet. Die Hälfte der Primerpaare wurde dabei so gestaltet, dass sie die Schnittstelle der methylierungssensitiven Enzyme überspannte. Dabei handelt es sich für *xmrk* um die Primer „Xmrk\_XY\_qf056“ und „ChIP\_xmrk\_proximal\_r01“, für *egfrb* um die Primer „xipho\_egfrb\_f“ und „xipho\_egfrb\_r“. Zur Kontrolle wurden Primer verwendet, die außerhalb der Schnittstelle liegen. Für *xmrk* waren diese Kontroll-Primer „ChIP\_xmrk\_proximal\_r01“ und „ChIP\_xmrk\_proximal\_f01“, für *egfrb* waren es „Xipho\_egfrb\_kontr\_f“ und „Xipho\_egfrb\_kontr\_r“.

### *Ansätze*

#### **Überspannende Primer (ÜP)**

#### **Kontroll-Primer (KP)**

Verdaut (ÜPV)	Unverdaut (ÜPU)	Verdaut (KPV)	Unverdaut (KPU)
---------------	-----------------	---------------	-----------------

### *Berechnung*

Zur Berechnung der prozentuellen Methylierung an der Schnittstelle, wurden zunächst die Mittelwerte der CT-Werte aller Ansätze pro Gen bestimmt. Dabei handelt es sich um zwei Ansätze mit einem Primerpaar, welches die Schnittstelle überspannt, und zwei Ansätze mit einem Primerpaar außerhalb der Schnittstelle. Dabei wurde für je einen Ansatz mit den jeweiligen methylierungssensitiven Enzymen verdautes Material benutzt, im anderen Ansatz wurden unverdaute Proben verwendet. Danach wurde  $\Delta CT$  für jedes Primerpaar als Subtraktion der Mittelwerte von verdautem und nicht verdaulichem Material errechnet. Für den  $\Delta\Delta CT$ -Wert wurde wiederum die Differenz zwischen den im vorherigen Schritt berechneten  $\Delta$ -Werte gebildet.

$$\Delta CT (\dot{U}P) = CT (\dot{U}PV) - CT (\dot{U}PU)$$

$$\Delta CT (KP) = CT (KPV) - CT (KPU)$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\dot{U}P) - \Delta CT (KP)$$

Folgende Formel wurde zur Berechnung der prozentuellen Methylierung verwendet:

$$\text{Methylierung (\%)} = \frac{100}{2\Delta\Delta CT}$$

# Ergebnisse

## Expression der Kandidatengene

Genname	Kontrolle	Benigne Läsion	Malignes Melanom
<i>xmrk</i>		3208	8124
<i>cdkn2x</i>	37	83	62
<i>pdc4a</i>	1195	2369	773
<i>mitfa</i>	21	32	192
<i>mitfb</i>	150	255	1291
<i>kita</i>	1476	2005	13562
<i>kitb</i>	914	710	4667
<i>myca</i>	70	95	270
<i>pdgfrb</i>	234	345	1290
<i>mxra5a</i>	826	264	707
<i>xirp2b</i>	0	2	310

Tabelle 1: Normalisierte RNA-Seq read counts. Die Proben der benignen Läsion (n = 1) und des malignen Melanoms (n = 1) wurden aus den Rückenflossen von Rückkreuzungshybriden gewonnen. Als Kontrollgewebe wurde Material aus der Rückenflosse eines WLC 1116 Hybriden (n = 1) verwendet.

Die Daten der RNA-Seq stammen aus einer unveröffentlichten Arbeit des Labors von Manfred Scharfl. Zunächst wurde das Transkriptom verschiedener Tumor- und Kontrollproben analysiert und bioinformatisch aufgearbeitet (s. Tabelle 1). Als Tumorgewebe wurden Proben einer benignen Läsion und eines malignen Melanoms der Rückenflosse von Rückkreuzungshybriden verwendet. Die Kontrolle wurde aus der Rückenflosse eines Hybriden des WLC 1116 Stamms gewonnen. In den Daten zeigten sich einige Gene, welche in den unterschiedlichen Geweben differentiell exprimiert wurden. Zur Überprüfung der

Expressionsmuster dieser wurden ausgewählte Gene mittels quantitativer RT-qPCR validiert. Es handelte sich dabei um folgende Kandidatengene:

- *Xiphophorus* melanoma receptor kinase  
(*xmrk*, Ortholog des humanen *EGFR*-Gens, kodiert vom *Tu*-Locus)
- Cyclin-dependent kinase inhibitor 2ab (*cdkn2ab*)
- Programmed cell death 4a (*pdc4a*)
- Microphthalmia-associated transcription factor (*mitfa/b*)
- V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (*kita/b*)
- V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (*c-myc*)
- Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide (*pdgfrb*)
- Matrix-remodelling associated 5 (*mxra5a*)
- Xin actin-binding repeat containing 2 (*xirp2b*)

Die Expression dieser Gene wurde mittels qPCR jeweils in malignem und benignem Gewebe gemessen. Es handelte dabei sich zum einen um Präparate der Rückenflossen, nämlich Proben aus benignen melanotischen Läsionen und malignen Melanomen. Zum anderen wurden Präparate aus benignen Hyperpigmentierungen und malignem exophytischen Tumorwachstum des Rumpfes verglichen. Anschließend wurden die Messungen mit der Expression in gesundem Kontrollgewebe verrechnet. Für die malignen Proben wurden insgesamt 16 Fische und für die benigneren Proben 11 Fische der Kreuzungen WLC 407 und WLC 534 präpariert. Als Kontrollgewebe wurden Rückenflossen der ArDr-Kreuzung (WLC 1116) gepoolt (Abb. 4).

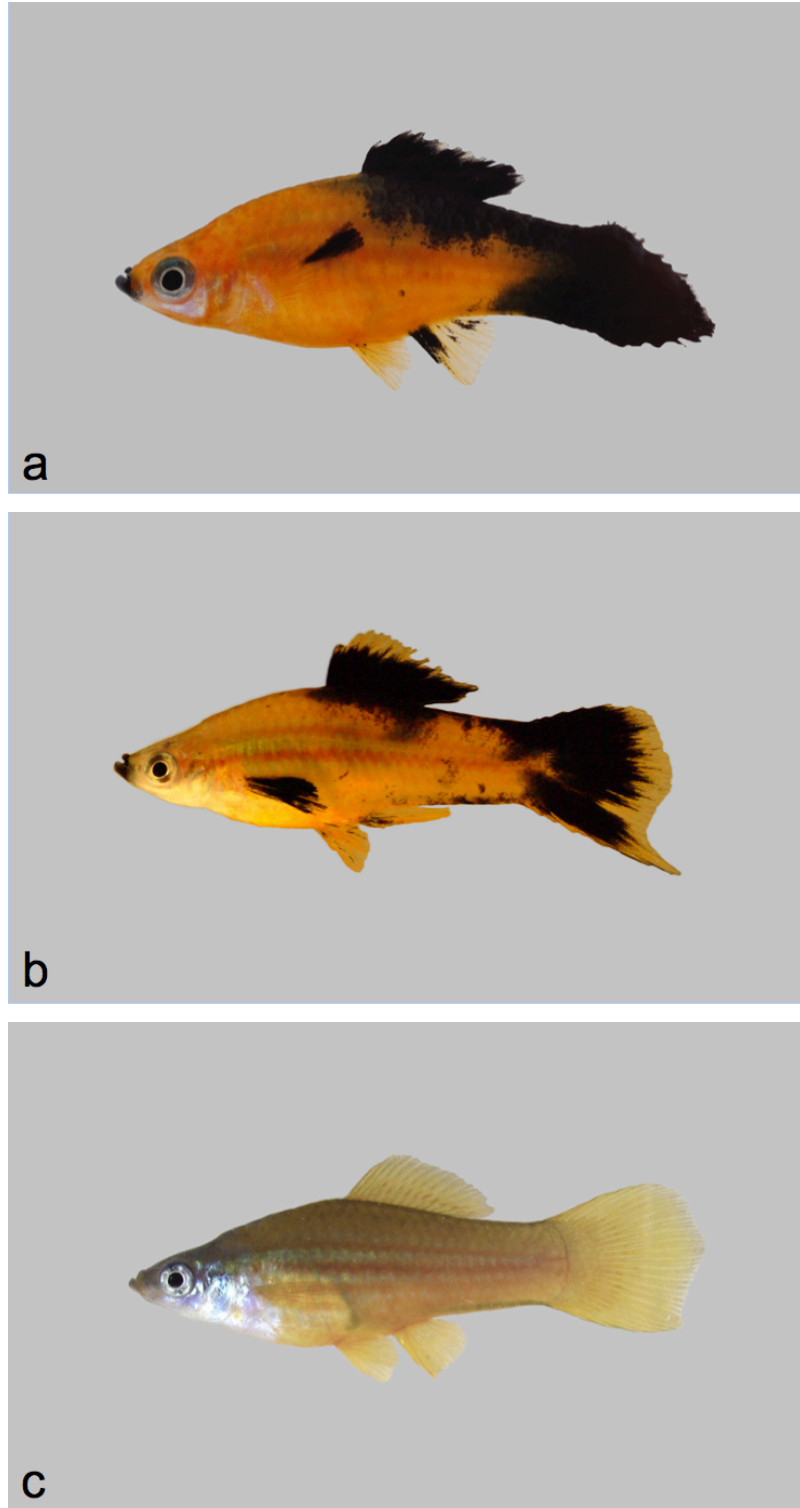


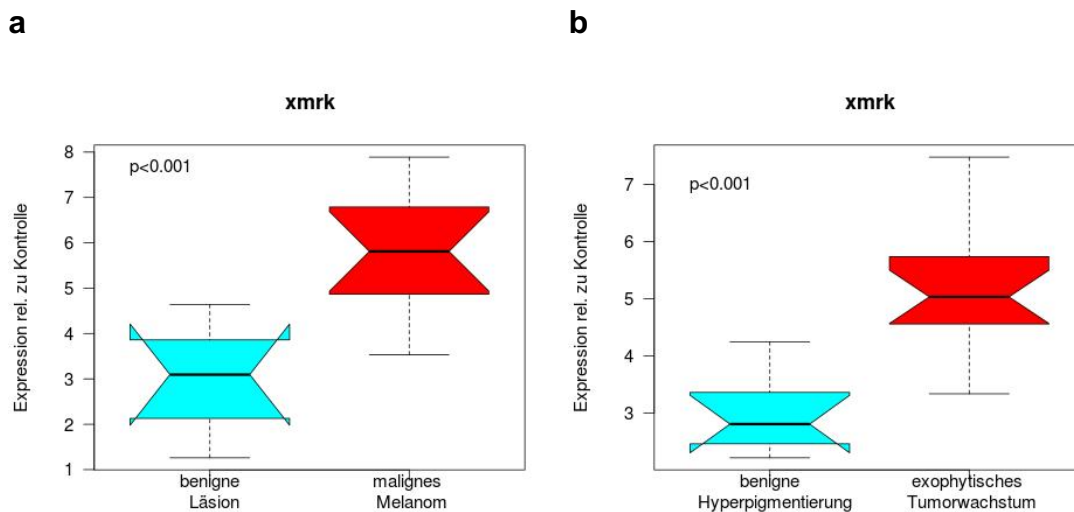
Abbildung 4: Die verwendeten Rückkreuzungshybriden. A) WLC 407 mit malignen melanozytären Melanom an Rücken- und Schwanzflosse sowie dem Rumpf. B) WLC 534 mit benigneren melanozytären Läsionen an Rücken- und Schwanzflossen. C) Beim WLC 1116, auch lof-1 genannt, führte die Insertion eines Transposons zum eingeschränkten Funktionsverlust des *xmrk*.

## Gene des Tu-Locus

### *xmrk*

Das Gen der *Xiphophorus melanoma receptor kinase* ist ein Ortholog zum humanen *EGFR*-Gen und wird vom Tu-Locus codiert. Im Modell wirkt es als Onkogen und spielt dabei eine entscheidende Rolle in der Entstehung des Melanoms.

Die Messungen der Genexpression ergaben, dass *xmrk* in den malignen Geweben deutlich stärker exprimiert wird als in den benigneren. Sowohl die Proben des malignen Melanoms der Flosse, als auch die des exophytischen melanozytären Tumorwachstums zeigten im Vergleich zu den Proben der benignen Läsion der Flosse und der benignen Hyperpigmentierung eine jeweils signifikant höhere Expression ( $p < 0.001$ ) (Abb. 5a/b).



**Abbildung 5: Analyse der Expressionsmuster von *xmrk*. Messung und Vergleich der Transkriptlevel von *xmrk* in benignen (blau) und malignen (rot) Geweben der Rückkreuzungshybride WLC 407 und WLC 534. 5a) Benigne Läsionen (n = 6) und malignes Melanom (n = 12) als Proben der Flossen. 5b) Benigne Hyperpigmentierung (n = 8) und exophytisches Tumorwachstum (n = 16) als Proben des Rumpfes. Als Kontrolle wurde die Expression von *xmrk* in den Rückenflossen der Rückkreuzungshybriden WLC 1116 bestimmt.**

## Kandidatengene des R-Locus

Obwohl schon früher gezeigt werden konnte, dass sich das Tumorsuppressorgen des R-Locus beim *Xiphophorus* Melanom Modell in der linkage group V befindet, wurde bisher noch nicht festgestellt, welches Gen dieser Gruppe das entscheidende ist (Ahuja, Schwab, & Anders, 1980; Fornzler, Wittbrodt, & Scharl, 1991; Morizot & Siciliano, 1983).

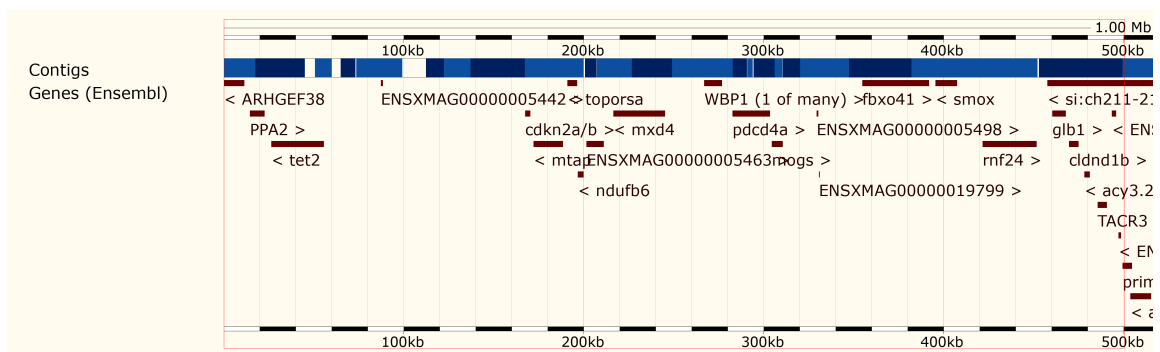


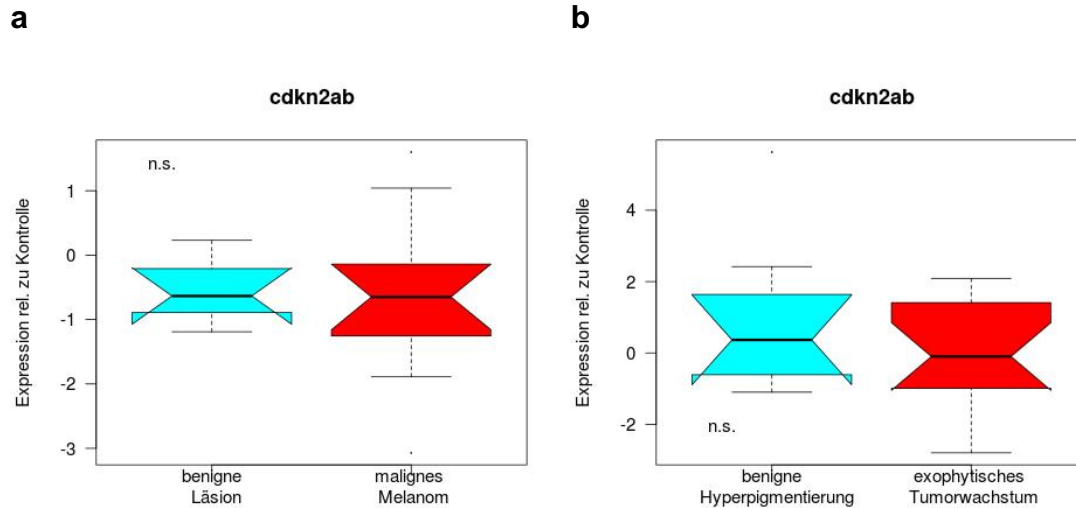
Abbildung 6: *cdkn2ab* und *pdcd4a* in einem Ausschnitt des *Xiphophorus* Genoms. Die Abbildung zeigt 520kb des Scaffold JH556841.1 aus Xipmac4.4.2 (Platyfish release 89) des Ensembl genome browser.

Mit *cdkn2ab* und *pdcd4a* wurden zwei Kandidatengene des R-Locus untersucht.

### *cdkn2ab*

Bei der Analyse des *cdkn2ab* Gens zeigte sich eine recht gleichmäßige Expression in den verschiedenen Materialien. So konnte weder in den Gewebeproben der Flossen (Abb. 7a) noch in denen des exophytischen Wachstums ein signifikanter Unterschied in der Expression festgestellt werden (Abb. 7b).

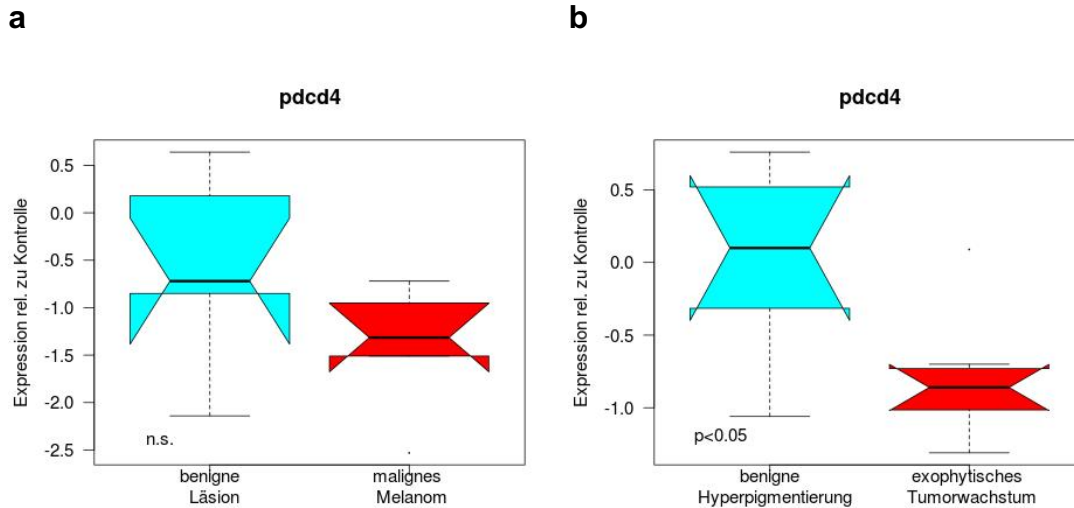




**Abbildung 7: Analyse der Expressionsmuster von *cdkn2ab*. Messung und Vergleich der Transkriptlevel von *cdkn2ab* in benignen (blau) und malignen (rot) Geweben der Rückkreuzungshybride WLC 407 und WLC 534. 7a) Benigne Läsionen (n = 6) und malignes Melanom (n = 12) als Proben der Flossen. 7b) Benigne Hyperpigmentierung (n = 8) und exophytisches Tumorwachstum (n = 16) als Proben des Rumpfes. Als Kontrolle wurde die Expression von *cdkn2ab* in den Rückenflossen der Rückkreuzungshybriden WLC 1116 bestimmt.**

#### *pdc4a*

*pdc4a* stellt das Ortholog zum humanen *PDCD4* (programmed cell death 4) dar. Weil *pdc4a* sowohl in linkage group V liegt, als auch in der RNA-Seq im malignen Gewebe verglichen mit den benignen Proben herunterreguliert war, wurden diese Expressionsdaten mittels qPCR überprüft. Dabei zeigte sich eine niedrigere Expression im jeweiligen malignen Gewebe (Abb. 8a/b). Der Unterschied zwischen benigner Hyperpigmentierung und exophytem melanozytärem Tumorwachstum war dabei sogar signifikant ( $p < 0.05$ ) (Abb. 8b).

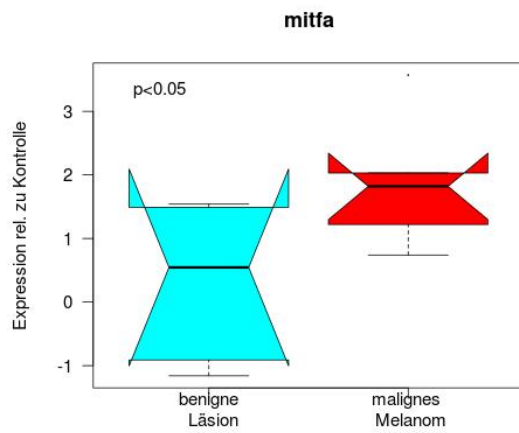
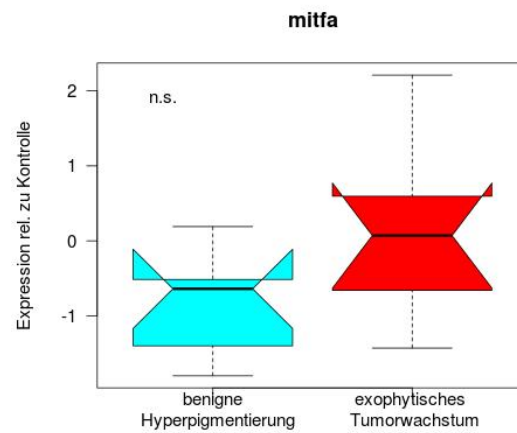
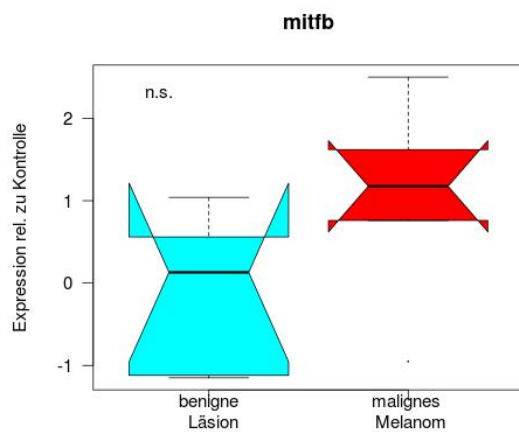
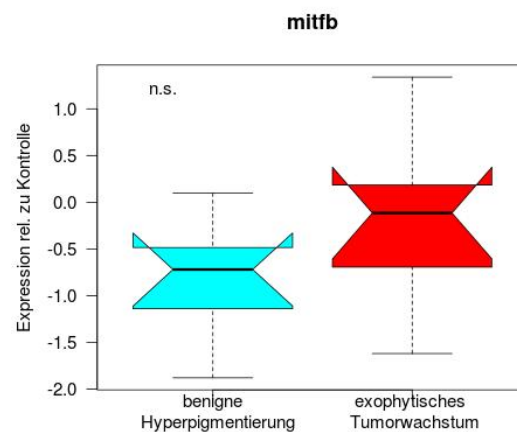


**Abbildung 8: Analyse der Expressionsmuster von *pdcd4a*. Messung und Vergleich der Transkriptlevel von *pdcd4a* in benignen (blau) und malignen (rot) Geweben der Rückkreuzungshybride WLC 407 und WLC 534. 8a) Benigne Läsionen (n = 6) und malignes Melanom (n = 6) als Proben der Flossen. 8b) Benigne Hyperpigmentierung (n = 7) und exophytisches Tumorwachstum (n = 8) als Proben des Rumpfes. Als Kontrolle wurde die Expression von *pdcd4a* in den Rückenflossen der Rückkreuzungshybriden WLC 1116 bestimmt.**

## Gene der Pigmentierung

### *mitfa* & *mitfb*

Das Produkt des *mitf* Gens spielt als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle bei der Pigmentierung und Proliferation von Melanozyten. Im Gegensatz zu den höheren Wirbeltieren gibt es beim Fisch statt nur einem sogar zwei *MITF*-Gene, nämlich *mitfa* und *mitfb*. In der Signaltransduktion von *xmrk* werden diese über den MAPkinase-Weg reguliert und stehen so auch im Zusammenhang mit *xmrk* selbst. Weiterhin haben die *mitf* Gene Einfluss auf die Expression der Tyrosinase, welche bei der Synthese des Melanins mitwirkt. Obwohl die malignen Proben in allen Vergleichen der untersuchten Gene und Gewebe eine stärkere Expression zeigen, konnte nur bei der Expression von *mitfa* im malignen Melanom der Flossen ein signifikanter Unterschied zur Expression im Gewebe der benignen Läsion festgestellt werden ( $p < 0.05$ ) (Abb. 9a).

**a****b****c****d**

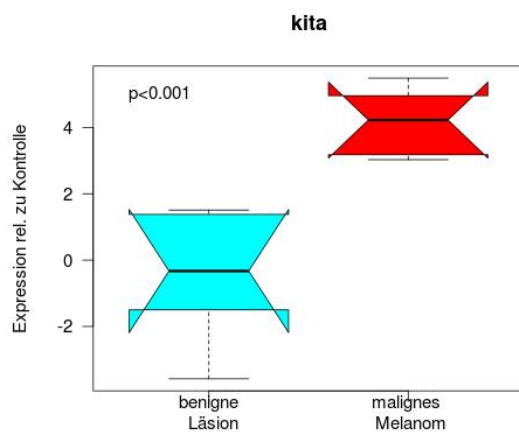
**Abbildung 9: Analyse der Expressionsmuster von 9a/b) *mitfa* und 9c/d) *mitfb*. Messung und Vergleich der Transkriptlevel von *mitfa* und *mitfb* in benignen (blau) und malignen (rot) Geweben der Rückkreuzungshybride WLC 407 und WLC 534. Benigne Läsionen (n = 6) und malignes Melanom (n = 6) als Proben der Flossen. Benigne Hyperpigmentierung (n = 7) und exophytisches Tumorwachstum (n = 8) als Proben des Rumpfes. Als Kontrolle wurde die Expression von *mitfa* und *mitfb* in den Rückenflossen der Rückkreuzungshybriden WLC 1116 bestimmt.**

### *kita* & *kitb*

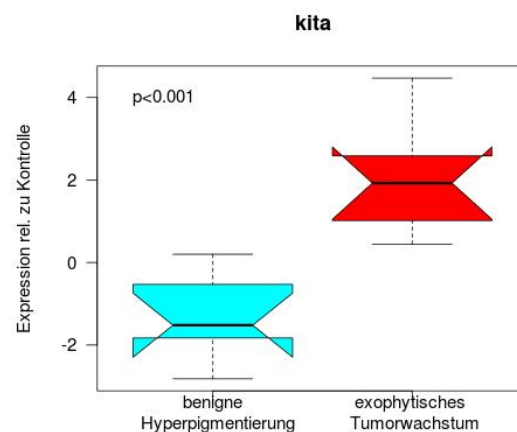
Die Gene *kita* und *kitb* stellen zwei Orthologe des humanen *KIT* bzw. c-kit Gens dar und codieren für Rezeptor-Tyrosinkinasen. Als solche spielen sie eine wichtige Rolle in Differenzierung und Proliferation von Stammzellen sowie in der Pigmentierung der Haut. Weiterhin ist bekannt, dass Mutationen des *KITs* zu einer Daueraktivierung der Tyrosinkinase führen können und somit die Entstehungen verschiedener Krebsarten, unter anderem auch die des Melanoms, begünstigen.

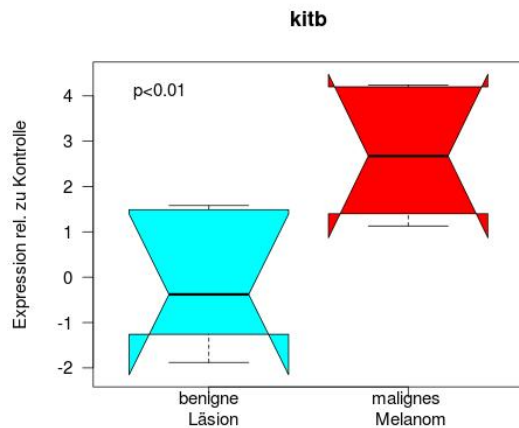
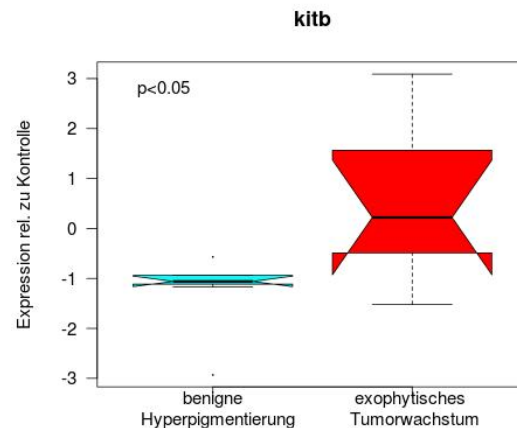
In den Gewebeproben des *Xiphophorus* konnte bei beiden Genen eine stärkere Expression in den jeweils malignen Geweben festgestellt werden. Bei *kita* waren die Unterschiede der Expression in malignen Proben im Vergleich zu benigneren war dabei signifikant ( $p < 0.001$ ) (Abb. 10 a/b). Auch bei *kitb* zeigten sich im Vergleich von benigner Läsion und malignem Melanom, sowie benigner Hyperpigmentierung und exophytischen Tumorwachstum signifikante Unterschiede ( $p < 0.01$  und  $p < 0.05$ ) (Abb. 10c und 10d).

**a**



**b**



**c****d**

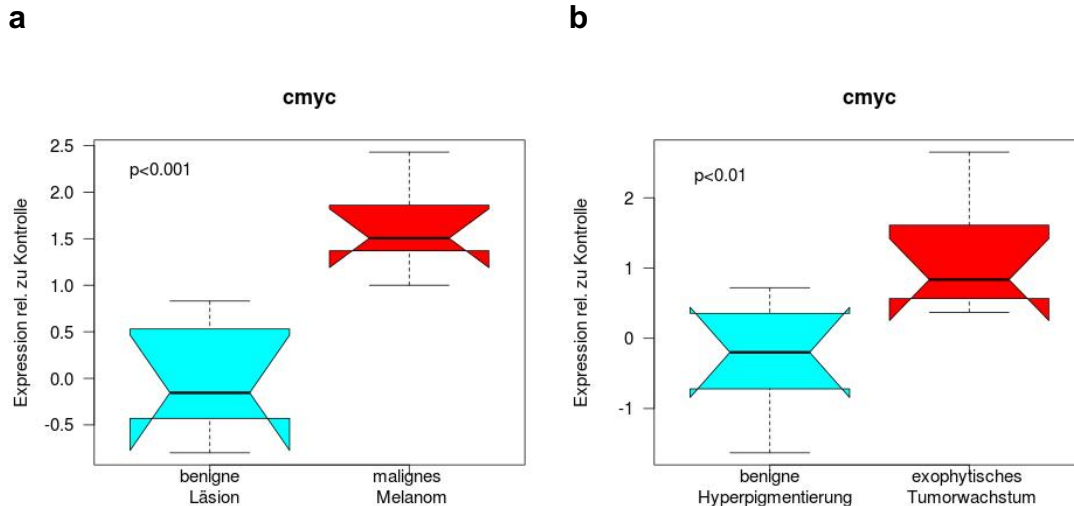
**Abbildung 10: Analyse der Expressionsmuster von 10a/b) *kita* und 10c/d) *kitb*. Messung und Vergleich der Transkriptlevel von *kita* und *kitb* in benignen (blau) und malignen (rot) Geweben der Rückkreuzungshybride WLC 407 und WLC 534. Benigne Läsionen (n = 6) und malignes Melanom (n = 6) als Proben der Flossen. Benigne Hyperpigmentierung (n = 7) und exophytisches Tumorwachstum (n = 8) als Proben des Rumpfes. Als Kontrolle wurde die Expression von *kita* und *kitb* in den Rückenflossen der Rückkreuzungshybriden WLC 1116 bestimmt.**

Tumorsuppressorgene/Protoonkogene

### *c-myc*

Das Ortholog zum humanen *MYC* ist ein bekanntes Protoonkogen, welches als Transkriptionsfaktor die Expression einiger Gene der Proliferation reguliert. Eine mutierte und damit ständig aktivierte Version von *MYC* kann deswegen häufig in Krebszellen nachgewiesen werden. Wie auch *mitfa* und *mitfb* wird *c-myc* selbst unter anderem über den MAPkinase-Weg und damit auch über *xmrk* reguliert.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigen, dass *c-myc* einerseits im malignen Melanom der Flosse signifikant höher exprimiert ( $p < 0.001$ ) wurde als in den Proben benigner Läsionen (Abb. 11a). Des Weiteren war die Expression im exophytischen melanozytären Wachstum verglichen mit der benignen Hyperpigmentierung ebenfalls signifikant erhöht ( $p < 0.01$ ) (Abb. 11b).



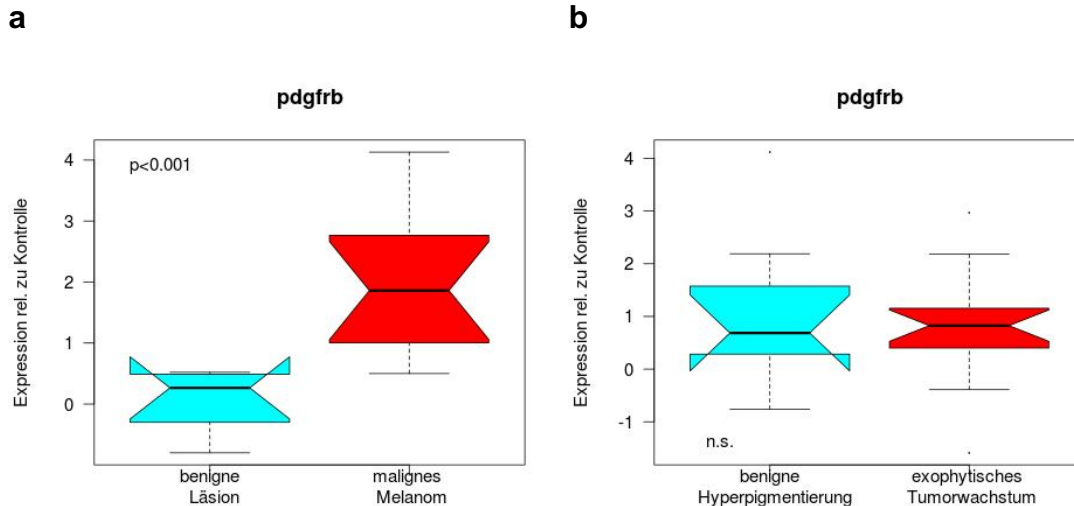
**Abbildung 11: Analyse der Expressionsmuster von *c-myc*. Messung und Vergleich der Transkriptlevel von *-cmyc* in benignen (blau) und malignen (rot) Geweben der Rückkreuzungshybride WLC 407 und WLC 534. 11a) Benigne Läsionen (n = 6) und malignes Melanom (n = 6) als Proben der Flossen. 11b) Benigne Hyperpigmentierung (n = 7) und exophytisches Tumorwachstum (n = 8) als Proben des Rumpfes. Als Kontrolle wurde die Expression von *c-myc* in den Rückenflossen der Rückkreuzungshybriden WLC 1116 bestimmt.**

## Weitere Kandidatengene

### *pdgfrb*

Das *pdgfrb* Gen codiert das gleichnamige Rezeptorprotein, welches zusammen mit dem Wachstumsfaktor PDGF-BB eine wichtige Rolle in der Vaskularisierung von Gewebe spielt und damit auch bei der Blutversorgung im Tumorwachstum mitwirkt.

Bei den Messungen der Genexpression von *pdgfrb* konnte zwischen exophytem Tumorwachstum und benigner Hyperpigmentierung kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden (Abb.12b). In den Geweben der Flossen wurde *pdgfrb* jedoch signifikant stärker in den Proben des malignen Melanoms exprimiert im Vergleich zu den benignen Läsionen (p<0.001) (Abb. 12a).

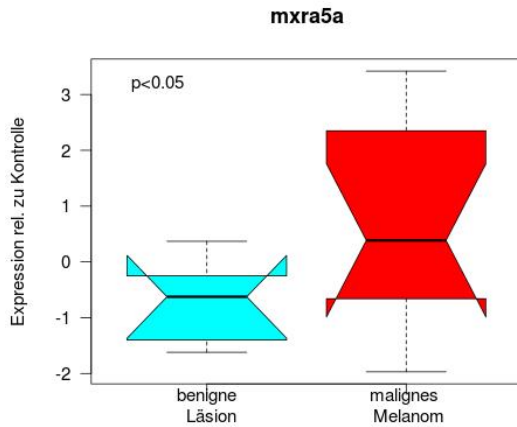
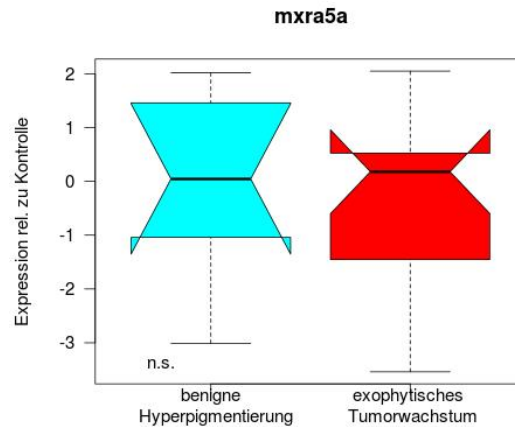


**Abbildung 12: Analyse der Expressionsmuster von *pdgfrb*. Messung und Vergleich der Transkriptlevel von *pdgfrb* in benignen (blau) und malignen (rot) Geweben der Rückkreuzungshybride WLC 407 und WLC 534. 12a) Benigne Läsionen (n = 6) und malignes Melanom (n = 12) als Proben der Flossen. 12b) Benigne Hyperpigmentierung (n = 8) und exophytisches Tumorwachstum (n = 16) als Proben des Rumpfes. Als Kontrolle wurde die Expression von *pdgfrb* in den Rückenflossen der Rückkreuzungshybriden WLC 1116 bestimmt.**

### *mxra5a*

Als Teil der Genfamilie der matrix remodeling associated Gene ist das von *mxra5a* codierte Protein an der Haftung von Zellen und dem Umbau der Zellmatrix beteiligt. Mutierte Versionen des humanen Orthologs *MXRA5* wurden bereits in verschiedenen Tumorgeweben der Haut, des Gehirns, der Lunge und des Ovars nachgewiesen. Die genaue Funktionsweise des Proteins konnte allerdings noch nicht ausreichend geklärt werden.

Während sich die Expression von *mxra5a* in den benignen Hyperpigmentierungen nicht wesentlich von der im exophytischen Tumorwachstum unterschied (Abb. 13b), zeigte sich, dass das Gen in den malignen Melanomen der Flosse signifikant stärker exprimiert wurde als in den Proben der benignen Läsionen ( $p < 0.05$ ) (Abb. 13a).

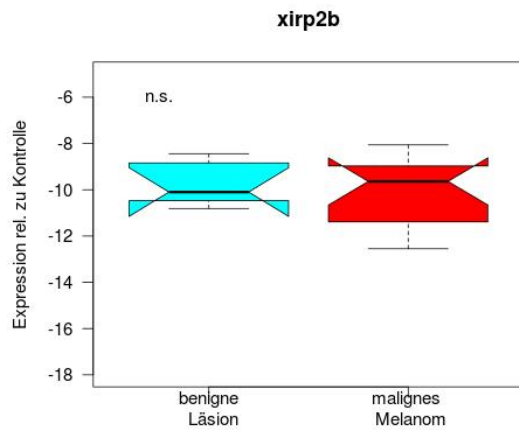
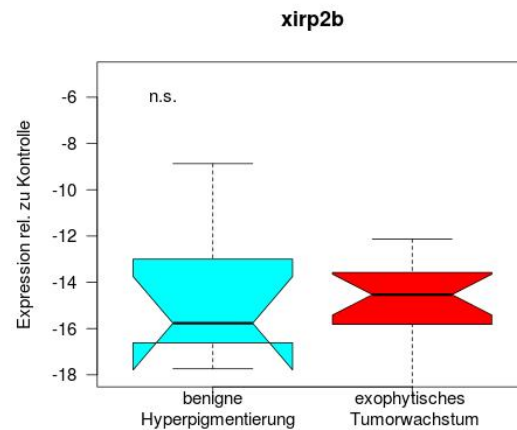
**a****b**

**Abbildung 13: Analyse der Expressionsmuster von *mxra5a*. Messung und Vergleich der Transkriptlevel von *mxra5a* in benignen (blau) und malignen (rot) Geweben der Rückkreuzungshybride WLC 407 und WLC 534. 13a) Benigne Läsionen (n = 6) und malignes Melanom (n = 12) als Proben der Flossen. 13b) Benigne Hyperpigmentierung (n = 8) und exophytisches Tumorwachstum (n = 16) als Proben des Rumpfes. Als Kontrolle wurde die Expression von *mxra5a* in den Rückenflossen der Rückkreuzungshybriden WLC 1116 bestimmt.**

### *xirp2b*

Das bisher wenig erforschte Gen *xirp2b* zeigte bei den Messungen der RNA-Seq besonders große Unterschiede der Expression in den verschiedenen Geweben. Diese Ergebnisse konnten mittels qPCR so nicht repliziert werden. Die Daten ergaben, dass die Tumorgewebe generell wesentlich weniger Expression des *xirp2b* im Vergleich zu den als Kontrollgewebe genutzten Proben der Kiemendeckel zeigen, wobei sich dieser Effekt bei den Proben des exophytischen Tumorwachstums und der benignen Hyperpigmentierung noch stärker darstellt (Abb. 14a/b).



**a****b**

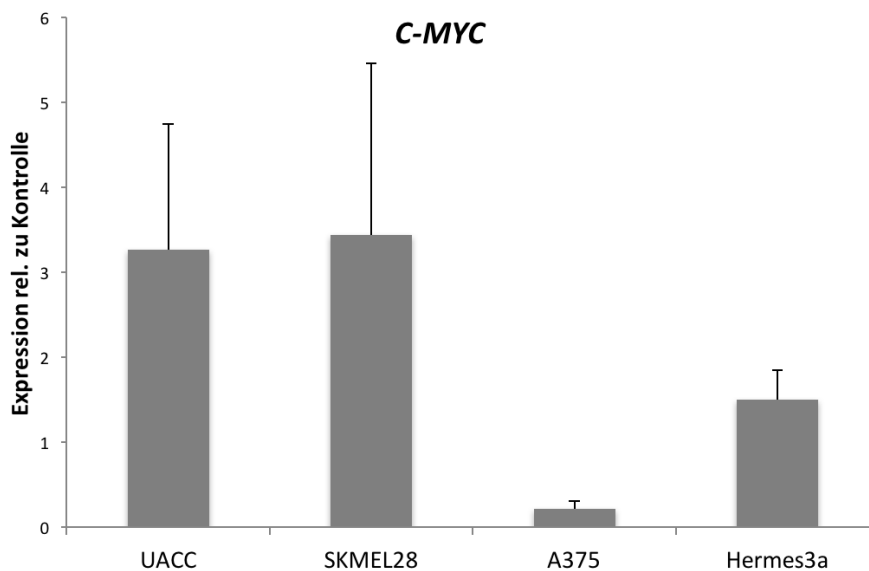
**Abbildung 14: Analyse der Expressionsmuster von *xirp2b*. Messung und Vergleich der Transkriptlevel von *xirp2b* in benignen (blau) und malignen (rot) Geweben der Rückkreuzungshybride WLC 407 und WLC 534. 14a) Benigne Läsionen (n = 6) und malignes Melanom (n = 14) als Proben der Flossen. 14b) Benigne Hyperpigmentierung (n = 8) und exophytisches Tumorwachstum (n = 16) als Proben des Rumpfes. Als Kontrolle wurde die Expression von *xirp2b* in den Kiemendeckeln der Rückkreuzungshybriden WLC 407 und WLC 534 bestimmt.**

# Genexpression in humanen Zelllinien

Um die oben gezeigten Daten des Fischmodells mit menschlichem Gewebe vergleichen zu können, wurden verschiedene humane Zelllinien kultiviert anhand derer die Expression eines Teils der untersuchten Gene gemessen wurde. Zellen der Linien UACC, SKMEL28 und A375 dienten als Melanomgewebe, Hermes3a stellte eine Zelllinie immortalisierter Melanozyten dar und das Material der Zelllinie NHEM (normale humane epidermale Melanozyten) wurde als Kontrolle genutzt. Insgesamt wurden fünf humane Orthologe zu den Genen des *Xiphophorus* untersucht, nämlich *C-MYC*, *MITF*, *PDCD4*, *KIT* und *PDGFRB*.

## *C-MYC*

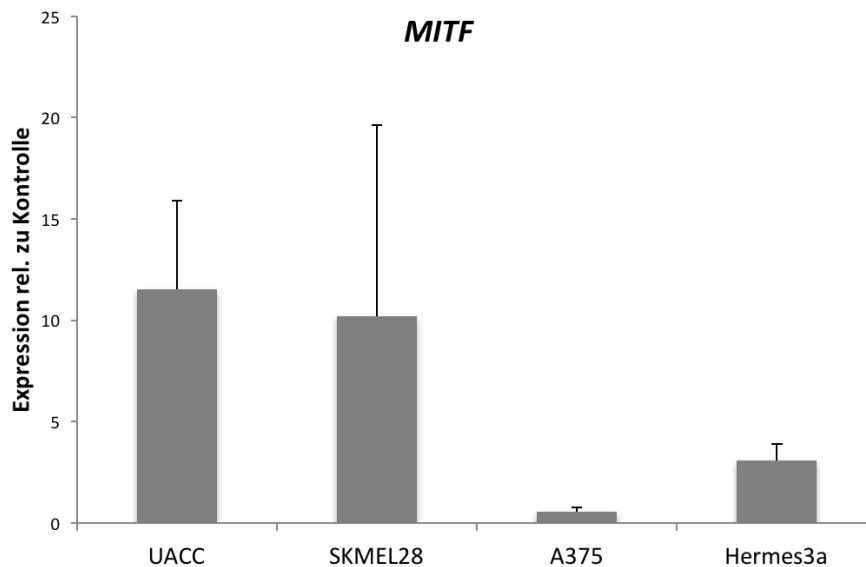
Die beiden Zelllinien UACC und SKMEL28 zeigten eine gesteigerte Expression des *C-MYC*. Auch Hermes 3a exprimierte vermehrt *C-MYC*, allerdings weniger stark. Lediglich A375 wies kaum eine Abweichung der Expression relativ zur Kontrolle auf (Abb. 15).



**Abbildung 15: Analyse der Expressionsmuster von *C-MYC*. Messung und Vergleich der Transkriptlevel von *C-MYC* in Proben der Zelllinien UACC, SKMEL28, A375 und Hermes3a. Als Kontrolle wurde die Expression von *C-MYC* in Proben der Zelllinie NHEM gemessen. Die Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten, gezeigt sind die Standardabweichungen.**

## *MITF*

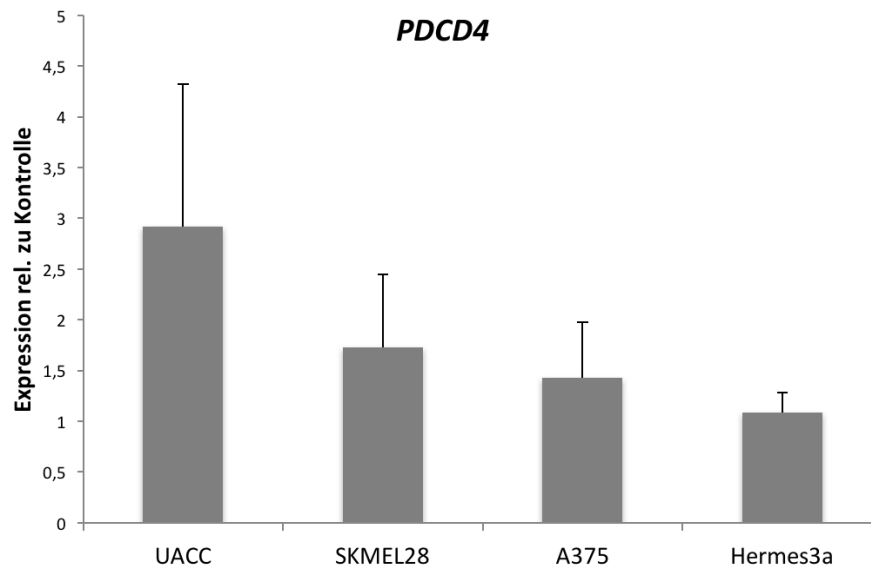
In den Zelllinien UACC-62, SKMEL28 und Hermes 3a wurde *MITF* von allen gemessenen Genen am stärksten exprimiert. Dabei zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster wie schon bei *C-MYC*, nur dass die relative Expression mehr als doppelt so groß war. Auch hier wies die Zelllinie A375 in der Genexpression relativ zur Kontrolle einen geringeren Unterschied auf (Abb. 16).



**Abbildung 16:** Analyse der Expressionsmuster von *MITF*. Messung und Vergleich der Transkriptlevel von *MITF* in Proben der Zelllinien UACC, SKMEL28, A375 und Hermes3a. Als Kontrolle wurde die Expression von *MITF* in Proben der Zelllinie NHEM gemessen. Die Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten, gezeigt sind die Standardabweichungen.

## *PDCD4*

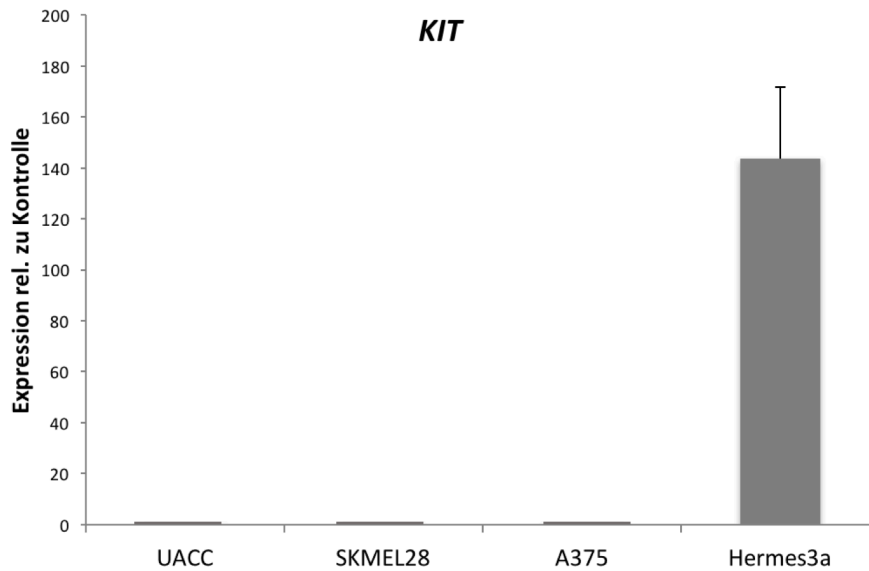
Das Gen *PDCD4* wurde in der Zelllinie UACC-62 verglichen mit den Kontroll- und allen weiteren untersuchten Zelllinien am stärksten exprimiert und hat dabei einen ähnlichen Wert wie zuvor *C-MYC*. In den anderen Zelllinien war die Genexpression im Vergleich dazu deutlich verringert (Abb. 17).



**Abbildung 17: Analyse der Expressionsmuster von *PDCD4*. Messung und Vergleich der Transkriptlevel von *PDCD4* in Proben der Zelllinien UACC, SKMEL28, A375 und Hermes3a. Als Kontrolle wurde die Expression von *PDCD4* in Proben der Zelllinie NHEM gemessen. Die Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten, gezeigt sind die Standardabweichungen.**

## *KIT*

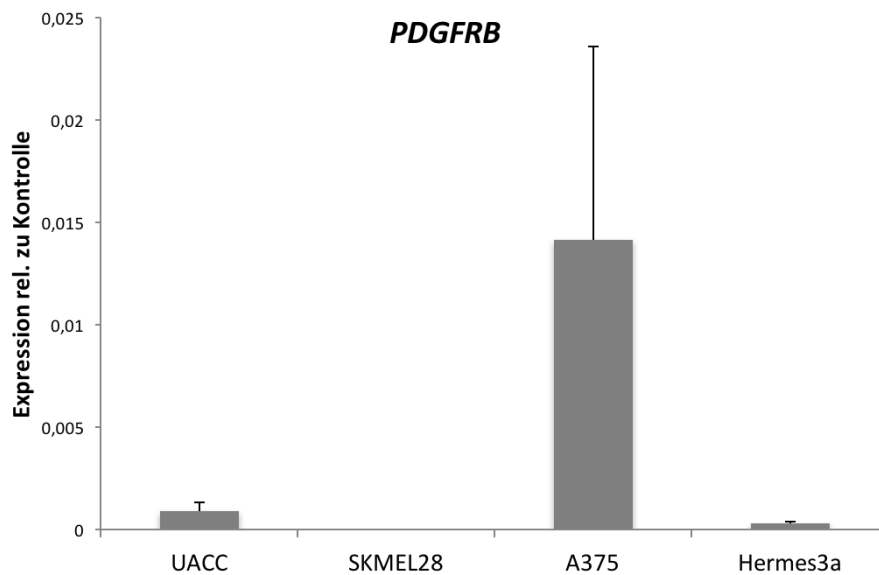
Während die Zelllinien UACC-62, SKMEL28 und A375 nahezu keine Expression von *KIT* aufwiesen, zeigte sich bei Hermes3a eine extreme Erhöhung der Expression im Verhältnis zur Kontrolle (Abb. 18).



**Abbildung 18: Analyse der Expressionsmuster von *KIT*. Messung und Vergleich der Transkriptlevel von *KIT* in Proben der Zelllinien UACC, SKMEL28, A375 und Hermes3a. Als Kontrolle wurde die Expression von *KIT* in Proben der Zelllinie NHEM gemessen. Die Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten, gezeigt sind die Standardabweichungen.**

## *PDGFRB*

Bei den Messungen von *PDGFRB* zeigte sich in allen Zelllinien nur eine sehr schwache Expression verglichen mit der Kontrolle. Hierbei fiel jedoch auf, dass das Gen in der Zelllinie A375 auffällig stärker exprimiert wurde als in den anderen Zelllinien (Abb. 19).

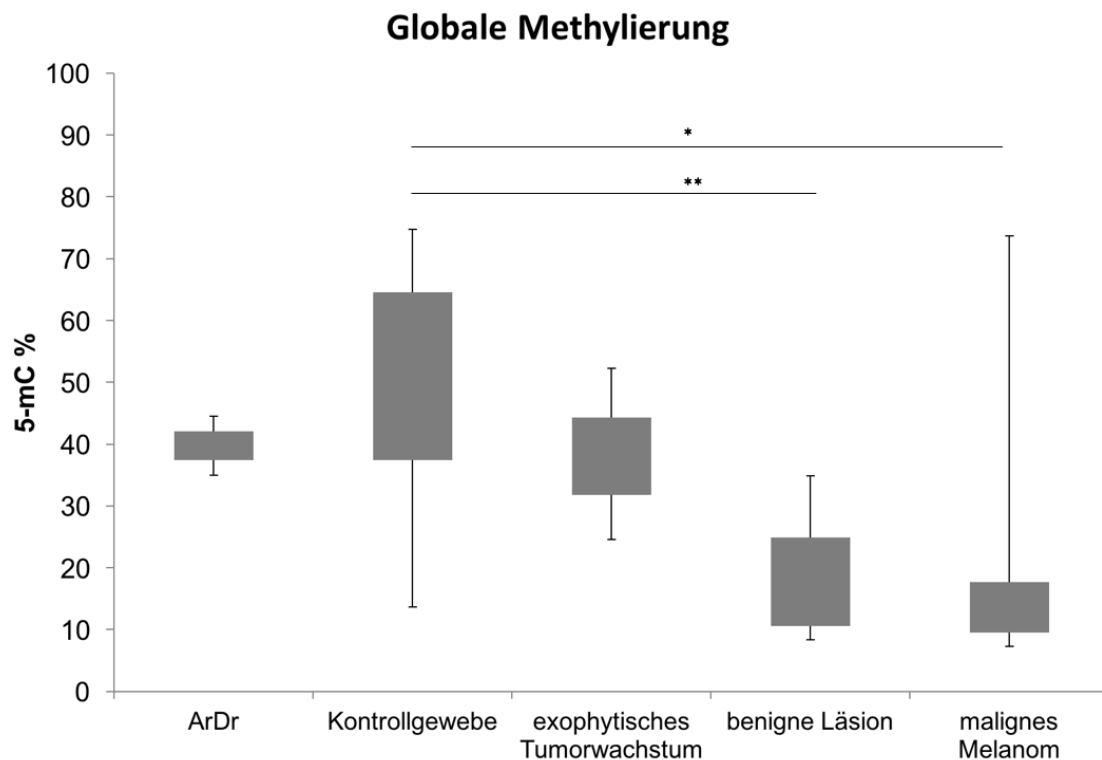


**Abbildung 19: Analyse der Expressionsmuster von *PDGFRB*. Messung und Vergleich der Transkriptlevel von *PDGFRB* in Proben der Zelllinien UACC, SKMEL28, A375 und Hermes3a. Als Kontrolle wurde die Expression von *PDGFRB* in Proben der Zelllinie NHEM gemessen. Die Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten, gezeigt sind die Standardabweichungen.**

# Globale Methylierung

Um die Epigenetik der Tumoren zu analysieren, wurde zunächst die globale Methylierung von verschiedenen Gewebeproben gemessen. Dafür musste in einem ersten Schritt die genomische DNA aus den zu untersuchenden Geweben isoliert werden, was nach der Methode von Blin & Stafford (1976, siehe Methoden) durchgeführt wurde. Bei den ausgewählten Geweben handelte es sich zum einen um Proben gepoolter Rückenflossen mehrerer Fische der ArDr-Kreuzung (WLC 1116), welche auch schon als Kontrolle bei den Messungen der Genexpression dienten. Zum anderen wurde als vergleichbares Gewebe je eine Probe des Gehirns, der Leber, der Kiemen und der Augen von malignen und benigneren Fischen der Kreuzungen WLC 407 und WLC 534 präpariert. Aus diesen Fischen wurden des Weiteren Proben des malignen exophytischen Tumorwachstums, sowie benigner Läsionen und maligner Melanome der Flossen gewonnen. Die Proben wurden einzeln verarbeitet.

Die isolierte gDNA wurde daraufhin mithilfe des MethylFlash™ Methylated DNA 5-mC Quantification Kit (Epigentek) kolorimetrisch gemessen und auf ihren globalen 5-mC-Gehalt ausgewertet werden (siehe Methoden). Es zeigte sich im Tumorgewebe der Flossen eine deutlich geringere Methylierung der gDNA als in den Vergleichsproben des restlichen Fischgewebes sowie der Rückenflossen des ArDr-Stamms. Der Unterschied zwischen Kontrollen und malignen Melanom der Flossen war dabei signifikant ( $p < 0.05$ ). Die Proben der benignen Läsionen der Flossen waren ebenfalls signifikant geringer methyliert als die Kontrollen ( $p < 0.01$ ) (Abb. 20). Eine Normalverteilung der Proben wurde mithilfe des Anderson-Darling-Tests bestätigt.



**Abbildung 20: Globale Methylierung.** Der globale 5-mC-Gehalt verschiedener Gewebe wurde kolorimetrisch quantifiziert. Gepoolte Rückenflossen der ArDr Kreuzung (n = 2), Gehirn (n = 2), Leber (n = 2), Kiemen (n = 2) und Augen (n = 2) als Kontrollgewebe, exophytisches Tumorwachstum (n = 6), benigne Läsion (n = 6) und malignes Melanom (n = 7) der Flossen werden verglichen.

## Promotorspezifische Methylierung

Zur weiteren Untersuchung der Tumorepigenetik wurde nach der globalen Methylierung als nächstes auch die spezifische Methylierung des *xmrk*- und *egfrb*-Promotors analysiert. Dafür wurden zunächst Primerpaare im Bereich der Promotoren gesucht, wobei zu jedem Vorwärtsprimer ein weiterer Vorwärtsprimer an anderer Stelle ergänzt wurde. Die beiden Vorwärtsprimer wurden dabei so gewählt, dass in der Sequenz zwischen ihnen eine Schnittstelle für das methylierungssensitive Restriktionsenzym HhaI bzw. SsiI (Thermo Fisher Scientific) bestand (Abb. 21).



a

<i>xmrkA</i>	197	GAAGAAAAC TCTGACATTCC <b>CTGTCCTGCCATCCTCTTCT</b> GGCCCGACC	245
<i>xmrkB</i>	197	GAAGAAAAC TCTGACATTCC <b>CTGTCCTGCCATCCTCTTCT</b> GGCCCGACC	245
<i>xmrkA</i> PSM	197	GAAGAAAAC TCTGACATTCC <b>CTGTCCTGCCATCCTCTTCT</b> GGCCCGACC	245
<i>xmrkA</i>	246	CTCTTCTGAGGAC <b>CCGC</b> CCCTCTACCTTATATAATGAGAGCGCT <b>GCGAG</b>	294
<i>xmrkB</i>	246	CTCTTCTGAGGAC <b>CCGC</b> CCCTCTACCTTATATAATGAGAGCGCT <b>GCGAG</b>	294
<i>xmrkA</i> PSM	246	CTCTTCTGAGGAC <b>CCGC</b> CCCTCTACCTTATATAATGAGAGCGCT <b>GCGAG</b>	294
<i>xmrkA</i>	295	<b>GACTTCTGACACCTT</b> CGGCGCATGGAGCAGCAGTCC <b>GACCTGCCGGACT</b>	343
<i>xmrkB</i>	295	<b>GACTTCTGACACCTT</b> CGGCGCATGGAGCAGCAGTCC <b>GACCTGCCGGACT</b>	343
<i>xmrkA</i> PSM	295	<b>GACTTCTGACACCTT</b> CGGCGCATGGAGCAGCAGTCC <b>GACCTGCCGGACT</b>	343
<i>xmrkA</i>	344	CTAGTT <b>TCTAACCGGACCGTCTTCAT</b> GGAGTTTCTGCGCGGAGGAGCGG	392
<i>xmrkB</i>	344	CTAGTT <b>TCTAACCGGACCGTCTTCAT</b> GGAGTTTCTGCGCGGAGGAGCGG	392
<i>xmrkA</i> PSM	344	CTAGTT <b>TCTAACCGGACCGTCTTCAT</b> GGAGTTTCTGCGCGGAGGAGCGG	392

**Schnittstelle für SsiI**      **Primer Xmrk\_XY\_qf056**      **Primer ChIP\_xmrk\_proximal**

b

<i>egfrb</i> (X)	840	GAGGAGGAGG <b>AGGTGTGTGTTGGAGGTGTG</b> TGTGCTGGGC <b>TGAGCCCTG</b>	888
<i>egfrb</i> (Y)	840	GAGGAGGAGG <b>AGGTGTGTGTTGGAGGTGTG</b> TGTGCTGGGC <b>TGAGCCCTG</b>	888
<i>egfrb</i> (X)	889	<b>AATGTGTTCTG</b> ACCCGT <b>CATTCTGCTCCAGTTTCCC</b> TCCCGGATCGGTT	937
<i>egfrb</i> (Y)	889	<b>AATGTGTTCTG</b> ACCCGT <b>CATTCTGCTCCAGTTTCCC</b> TCCCGGATCGGTT	937
<i>egfrb</i> (X)	938	CGGTTCG <b>GCGC</b> ATGGAGCAGCAGTCCGA <b>CTGCCGACTCTAG</b> <b>TTTCTA</b>	986
<i>egfrb</i> (Y)	938	CGGTTCG <b>GCGC</b> ATGGAGCAGCAGTCCGA <b>CTGCCGACTCTAG</b> <b>TTTCTA</b>	986
<i>egfrb</i> (X)	987	<b>ACCGGACCGTCTTC</b>	999
<i>egfrb</i> (Y)	987	<b>ACCGGACCGTCTTC</b>	999

**Schnittstelle für HhaI**      **Primer xipho\_egfrb**      **Primer xipho\_egfrb\_kontr**

Abbildung 21: Promotorregionen von *xmrk* und *egfrb*.  
 21a) Ausschnitt aus dem Alignment des *xmrkA* und *xmrkB* Promotors des *X.maculatus* sowie des *xmrkA* Promotors der Zelllinie PSM. Markiert wurden die Schnittstelle für das methylierungssensitive Enzym SsiI (gelb), Vorwärtsprimer über die Schnittstelle (grün), Vorwärts- und Rückwärtsprimer außerhalb der Schnittstelle (blau) und Sequenzunterschiede (pink). Der Rückwärtsprimer wurde für beide Primerpaarungen benutzt.  
 21b) Ausschnitt aus dem Alignment des *egfrb* Promotors von X- und Y- Chromosom des *X.maculatus*. Markiert wurden die Schnittstelle für das methylierungssensitive Enzym HhaI (gelb), Vorwärts- und Rückwärtsprimer über die Schnittstelle (grün), Vorwärts- und Rückwärtsprimer außerhalb der Schnittstelle (blau) und Sequenzunterschiede (pink). Die Graphiken wurde mithilfe von PromoterWise (Clustal Omega) erstellt. (<http://www.ebi.ac.uk/>)

Im nächsten Schritt wurden die zu untersuchenden Proben der verdaut. Dabei wurde als Material neben der gDNA aus dem vorherigen Versuch zur globalen Methylierung noch weitere gDNA aus drei *Xiphophorus* Zelllinien isoliert. Es handelte sich hierbei zum einen um die Melanomzelllinie PSM und zum anderen um die beiden von embryonalen Fibroblasten abstammenden Zelllinien SdSr24 und Xm25. Zunächst wurden alle Proben mit HindIII (Thermo Fisher Scientific) vorverdaut, um danach durch das methylierungssensitive Restriktionsenzym HhaI (für *egfrb*) bzw. SsiI (für *xmrk*; beide Thermo Fisher Scientific) für die Messung fertig verdaut zu werden. Um die Methylierung der Promotor besser quantifizieren zu können, wurden bakterielle Vektoren mit eingebautem *egfrb* bzw. *xmrk* Promotor verwendet. Einer der beiden Ansätze dieser natürlicherweise unmethylierten Vektoren wurde dabei zunächst durch eine CpG Methyltransferase (Thermo Scientific) methyliert. Sowohl unmethylierte als auch methylierte Vektoren wurden daraufhin ebenso mit den oben genannten Restriktionsenzymen wie die anderen Proben aus Fischgewebe und Zelllinien verdaut.

Um nun berechnen zu können, wie sehr die Restriktionsstelle im Promotor methyliert war, wurden bei der Messung durch die qPCR je zwei verschiedene Primerpaare benutzt. Dabei hatte ein Paar die Restriktionsstelle in der zu replizierenden Sequenz und wurde dementsprechend nur repliziert, wenn eine Methylierung an der Restriktionsstelle den Verdau durch das Restriktionsenzym blockierte. Die Sequenz des anderen Primerpaares beinhaltet keine Restriktionsstelle. Zur Kontrolle der Messungen wurden die enzymatisch methylierten und natürlicherweise unmethylierten Vektoren ebenso gemessen. Die Berechnung der Werte wird im Methodenteil der Arbeit beschrieben.

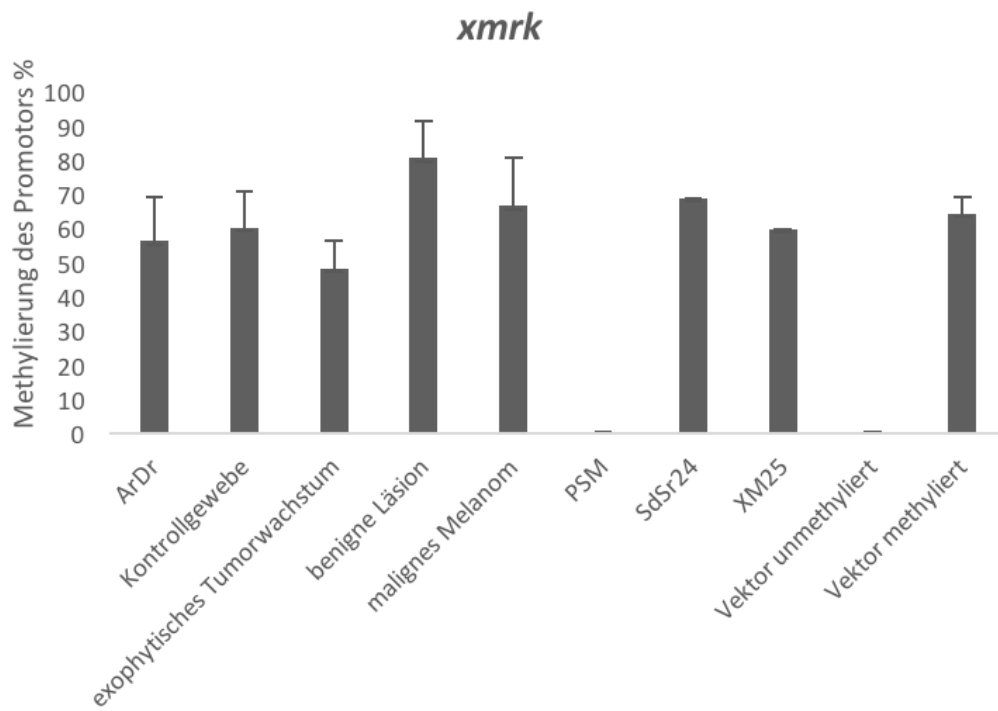
Bei den gDNAs der Fischgewebe zeigte sich, dass der Promotor des *xmrks* (Abb. 22a) generell vollständiger methyliert war als der des *egfrbs* (Abb. 22b). Innerhalb der beiden Gene waren jedoch keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

Bei der Auswertung der Zelllinien zeigte sich, dass in der Melanomzelllinie PSM der *xmrk* Promotor an der Restriktionsstelle unmethyliert war, wobei die beiden anderen Zelllinien SdSr 24 und Xm25 wie auch schon vorher die Fischgewebe

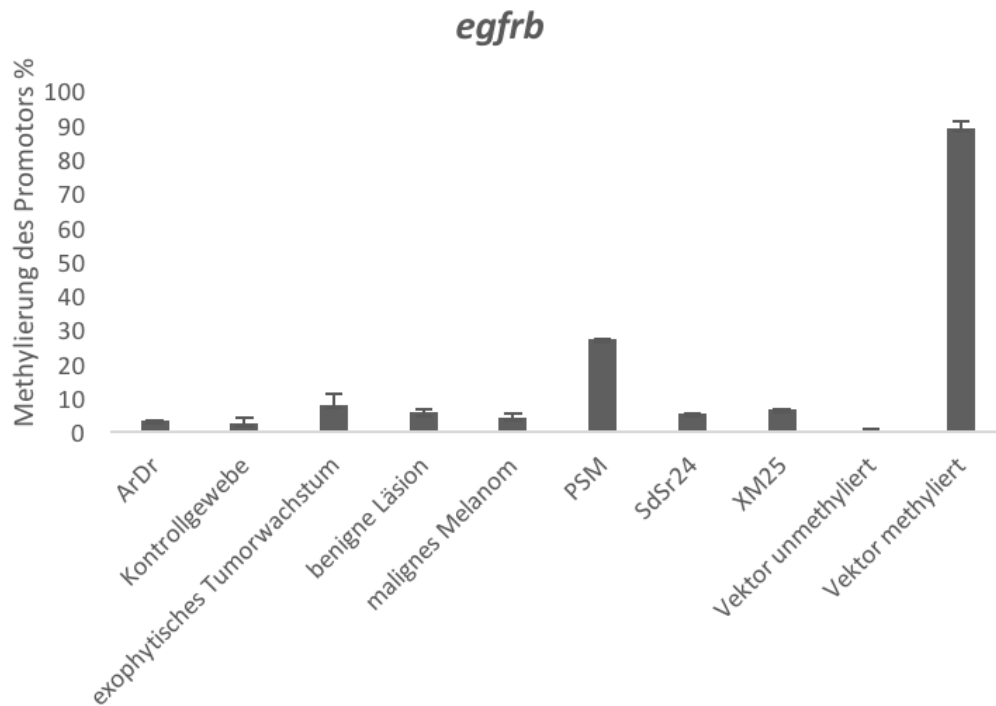
eine starke Methylierung aufwiesen. Im Gegensatz dazu war der Promotor des *egfrb* bei der PSM Zelllinie stärker methyliert als der gleiche Promotor bei den anderen Zelllinien. Diese zeigten auch hier eine ähnlich geringe Methylierung wie schon zuvor die Fischgewebe.

Die Daten der Vektoren deuten darauf hin, dass enzymatisch wohl keine komplette Methylierung an der Schnittstelle des Restriktionsenzym möglich ist. Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass bei der Durchführung des Versuchs kleine Ungenauigkeiten durch das Pipettieren geringer Mengen nicht ausgeschlossen werden können.

**a**



b



**Abbildung 22: Promotorspezifische Methylierung von *xmrk* und *egfrb*. Prozentuelle Methylierung an den Schnittstellen der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklenzyme 22a) *SsiI* und 22b) *HhaI* in den gepoolten Rückenflossen der ArDr Kreuzung (n = 2), Gehirn (n = 1), Leber (n = 1), Kiemen (n = 1) und Augen (n = 1) als Kontrollgewebe, exophytisches Tumorwachstum (n = 3), benigne Läsion (n = 3) und malignes Melanom (n = 3) der Flossen, sowie in den Zelllinien PSM, SdSr24, Xm25 (je n = 1) und den Vektoren unmethyliert/methyliert (je n = 3).**

# Diskussion

## Expressionsanalyse der Kandidatengene

### *xmrk*

Die Expression des krebserzeugenden *xmrk* im *Xiphophorus* wurde in der Vergangenheit in einigen Studien mittels Northern Blot und semiquantitativer RT-PCR untersucht (Maueler et al., 1993; M. Schartl et al., 1999; Woolcock et al., 1994). Die dabei beschriebenen Expressionsmuster konnten in dieser Arbeit mittels qPCR bestätigt werden. So zeigten sich in den malignen Proben sehr hohe Expressionslevel von *xmrk*, während es in den benigneren Geweben das Gen verhältnismäßig geringer exprimiert wurde. Dies entspricht außerdem den Daten einer weiteren Arbeit zu *xmrk*, welche ebenfalls mittels qPCR erhoben wurden (Regneri & Schartl, 2012).

### *cdkn2ab*

Sowohl bei sporadisch auftretenden, als auch bei familiär bedingten malignen Melanomen ist CDKN2A einer der am häufigsten veränderten Genloci (Aoude, Wadt, Pritchard, & Hayward, 2015; Bastian, 2014; Cust et al., 2011). Diese Modifizierungen führen zu einer Inaktivierung oder klonalen Deletion des Tumorsuppressorgens (Bennett, 2008), wobei auch das benachbarte CDKN2B dabei durch diese Deletionen des Öfteren betroffen ist (Stark & Hayward, 2007). Die Lokalisierung des Orthologs der beiden CDKN2-Gene *cdkn2ab* in der Linkage Group V des *Xiphophorus* ließ es deswegen als wahrscheinlich erscheinen, dass *cdkn2ab* als Regulator von *xmrk* agiert und somit auch im Fisch eine entscheidende Rolle in Tumorentwicklung spielt (Kazianis et al., 1998). Im Gegensatz zu der häufigen Deaktivierung der CDKN2-Gene im menschlichen Melanom, erwies sich *cdkn2ab* als hoch exprimiert in den Melanomgeweben (Kazianis et al., 1999). Die Überexpression des *cdkn2ab* in Korrelation mit *xmrk* könnte dabei entweder durch die Hochregulierung des

Onkogens zurückzuführen sein oder durch eine Ko-Regulation beider Gene auf transkriptioneller Ebene bedingt werden (Butler, Lee, & Gross, 2007; Kazianis et al., 2000). In meinen Messungen der mRNA von *cdkn2ab* konnte ich keine starke Überexpression in malignen oder benigneren Proben finden und es fand sich auch nur eine schwach positive Korrelation zu *xmrk*. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den oben angeführten Daten früherer Arbeiten und lassen *cdkn2ab* als Regulator von *xmrk* unwahrscheinlich erscheinen. Dennoch lassen sich durch die auffällig starke Varianz der mRNA-Level des *cdkn2ab* kaum endgültige Schlüsse ziehen und somit sind weitere Analysen des Gens erforderlich.

#### *pdc4a*

In nächster Nähe zum *cdkn2ab* befindet sich in der Linkage Group V mit *pdc4a* ein weiterer Kandidat des *R*-Locus. Schon seit einiger Zeit gilt *PDCD4*, das humane Ortholog zu *pdc4a*, als Tumorsuppressorgen und vielversprechender Angriffspunkt für Krebstherapien (Lankat-Buttgereit & Goke, 2009). Dabei konnte inzwischen sowohl in verschiedenen Hautläsionen (Matsushashi, Narisawa, Ozaki, & Mizuta, 2007), als auch im malignen Melanom eine im Vergleich zu normaler Haut verringerte Expression von *PDCD4* gezeigt werden (Jiao, Fan, & Zhang, 2015; D. Wang et al., 2013). Meine Messungen von *pdc4a* im *Xiphophorus* wiesen ebenso verglichen mit den benigneren Geweben eine zum Teil signifikant erniedrigte Genexpression in den malignen Proben auf. Dies lässt darauf schließen, dass sowohl in humanen Melanomen als auch in denen des *Xiphophorus* die Tumorprogression mit einer Abnahme der *PDCD4*- bzw. *pdc4a*-Expression korreliert. Dies würde dazu passen, dass *pdc4a* in den Zellen des benigneren Gewebes als Regulator von *xmrk* fungiert und macht es somit zu einem vielversprechenden Kandidatengen des *R*-Locus. Interessanterweise stellte sich in meinen Messungen von *PDCD4* in humanen Melanomzelllinien ein konträres Expressionsmuster dar. So ließen sich bei UACC-62, SKMEL28 und A375 bis zu dreimal höhere mRNA Level messen als in der melanozytären Zelllinie NHEM. Auch in Zellen der Linie Hermes3a wurde *PDCD4* ähnlich stark exprimiert. Passend dazu zeigten in einer Arbeit zur

Expression von *PDCD4* in Melanomzellen nur ein Viertel der Proben erniedrigte *PDCD4* Protein Level, während sich bei den restlichen Zelllinien verglichen mit normalen Melanozyten gleichhohe oder erhöhte Protein Level fanden (Vikhreva & Korobko, 2014). Dies deutet daraufhin, dass der Verlust an *PDCD4* Expression zumindest in der Progression des humanen Melanoms keine essentielle Rolle innehat. Da das maligne Melanom jedoch eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren darstellt (Vidwans et al., 2011), könnte sich ein variables Gen wie *PDCD4* in Form eines molekularen Markers als sehr nützlich für die molekulare Typisierung erweisen (Vikhreva & Korobko, 2014). Weitere Forschung ist nötig, um die Funktion des *PDCD4* als Tumorsuppressorgen besser zu verstehen und *pdcd4a* als vielversprechenden Kandidaten des *R*-Locus abzuklären.

#### *mitfa & mitfb*

Der Transkriptionsfaktor *MITF* gilt als Hauptregler in der Entwicklung von Melanozyten und ist als solcher entscheidend in Zellzyklus und Differenzierung der Zellen beteiligt (Levy, Khaled, & Fisher, 2006). Seine Bedeutung für das melanozytäre Überleben zeigt sich im veränderten Phänotyp von Menschen mit Waardenburg Syndrom Typ 2 oder Tietz Syndrom. Bei diesen führen verschiedene Mutationen des *MITF* zu einer abgeänderten Pigmentierung von Haut und Haaren (Smith, Kelley, Kenyon, & Hoover, 2000; Tassabehji, Newton, & Read, 1994). Aufgrund mehrerer Promotoren und posttranskriptionaler Modifikation können beim Menschen mindestens neun verschiedene Isoformen des *MITF*s entstehen, die zum Teil nur in spezifischen Geweben nachweisbar sind (Hershey & Fisher, 2005). So konnte eine Expression von *MITF-M* bisher nur in Melanozyten gezeigt werden und gilt dort als entscheidende Isoform für die Entwicklung (Amae et al., 1998; Fuse et al., 1999; Takemoto, Yoon, & Fisher, 2002). Im Gegensatz dazu entdeckte man sowohl im Zebrafisch, als auch im *Xiphophorus* und den beiden Kugelfischen *F. rubripes* und *T. nigroviridis* die Existenz von mindestens zwei individuellen *mitf* Genen (Altschmied et al., 2002; J. A. Lister, Close, & Raible, 2001). Dabei wird *mitfa* vorwiegend in Melanophoren und *mitfb* vor allem in retinalem Pigmentepithel

exprimiert, obwohl beide Gene zum Teil auch co-exprimiert werden (Braasch, Brunet, Volff, & Scharl, 2009; J. A. Lister et al., 2001). Doch obwohl in den Teleosten separate Gene für das Protein MITF-M codieren, ist es seinem humanen Pendant nicht nur in der Struktur sehr ähnlich, sondern wird ebenfalls nur in pigmentiertem Gewebe und Melanomen exprimiert (Delfgaauw et al., 2003). Als entscheidende Signalübertragung zur Aktivierung von MITF in Melanozyten stellte sich der MAP-Kinase-Weg heraus (Hemesath, Price, Takemoto, Badalian, & Fisher, 1998), wobei die dabei durch die MAP-Kinase phosphorylierten Serinreste im MITF des *Xiphophorus* konserviert sind (Altschmied et al., 2002). Dieser Signalweg wird im *Xiphophorus* wiederum durch die Rezeptortyrosinkinase *xmrk* permanent aktiviert (Wellbrock & Scharl, 1999), was eine direkte Verbindung zwischen den beiden Genen herstellen lässt. Passend dazu zeigen sich in meinen Daten zur Expression von *mitfa* und *mitfb* korrelierend mit den Ergebnissen von *xmrk* jeweils höhere mRNA-Level in den maligneren Geweben. Diese Entdeckungen einer gemeinsamen Erhöhung von *xmrk* und *mitf* konnten zuvor auch schon in transgenen Medakas gemacht werden (Manfred Scharl et al., 2010). Es zeigte sich in den malignen Geweben des exophytischen Tumorwachstums außerdem eine positive Korrelation zwischen der Expression von *mitfa* und *c-myc* ( $r_s=0,87$ ;  $N=8$ ), sowie *mitfb* und *c-myc* ( $r_s=0,90$ ;  $N=8$ ). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass *c-myc* ebenfalls durch den MAP-Kinase-Weg reguliert wird (Zhu, Blenis, & Yuan, 2008). Diese Korrelation findet sich ebenso in den Messungen der Genexpression in den Melanomzelllinien. Bei UACC-62 und SKMEL28 waren die Werte für MITF im Durchschnitt sogar zehnmal so hoch wie in den Zellen der Kontrolle. Dieses Phänomen lässt sich wohl darauf zurückführen, dass die in beiden Zelllinien nachgewiesenen Mutationen von BRAF ebenfalls zu einer starken Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs führen können (McCain, 2013). Des Weiteren sind derartige Mutationen mit einer erhöhten Kopienzahl von MITF assoziiert (Garraway et al., 2005). Interessanterweise zeigte sich bei der Zelllinie A375 hingegen nur eine geringe Expression von MITF, obwohl bei dieser auch eine Mutation des BRAF dokumentiert wurde. Diese Heterogenität in der Expression von MITF lässt sich wohl durch die Entdeckung, dass BRAF via MEK und ERK



auch über posttranslationale Regulierung MITF beeinflusst, erklären (Wellbrock & Arozarena, 2015). Weitere Forschung ist nötig, um diese Komplexität in der Regulierung von MITF und die beteiligten Signalwege besser verstehen zu können (Hartman & Czyz, 2015; Hsiao & Fisher, 2014).

#### *kita & kitb*

Einen weiteren wichtigen Erbfaktor in der Entwicklung von Melanozyten stellt das *KIT* Gen dar (Nishikawa et al., 1991). Vererbare Mutationen, die einen Funktionsverlust des Gens nach sich ziehen, führen beim Menschen zu einem partiellen Albinismus, auch Piebaldismus genannt (Giebel & Spritz, 1991). Aktivierende Mutationen des Gens können jedoch eine maligne Transformation von Melanozyten auslösen (Larue, Dougherty, Porter, & Mintz, 1992). So konnten auch in bestimmten Subgruppen von Melanomen sowie in Metastasen pathologische Aktivierungen des *KIT* Gens nachgewiesen werden (Ashida, Takata, Murata, Kido, & Saida, 2009; Curtin, Busam, Pinkel, & Bastian, 2006). Dabei trägt die von *KIT* codierte Rezeptortyrosinkinase neben der Aktivierung der PI3-Kinase auch über den MAP-Kinase-Weg zur unkontrollierten Zellvermehrung bei (Shtivelman et al., 2014). Die MAP-Kinase stellt hierbei eine direkte Verbindung zwischen KIT und MITF her (Hemesath et al., 1998). Dazu passend, zeigen meine Messungen im *Xiphophorus* sowohl eine verhältnismäßig verstärkte Expression der Orthologe *kita* und *kitb* in den malignen Geweben, als auch eine positive Korrelation zwischen *kita* und *mitfa* ( $r_s=0,85$ ;  $N=14$ ). Damit übereinstimmend berichtet eine andere Arbeit über eine mittels RNA-Seq gemessene Erhöhung von *kitb* in Melanomgewebe des *Xiphophorus* (Lu et al., 2017). Dies ist auch insofern interessant, da im Zebrafisch gezeigt werden konnte, dass nur *kita* an der Entwicklung der Melanozyten beteiligt ist, während die genaue Funktion von *kitb* noch nicht klar wurde (Hultman, Bahary, Zon, & Johnson, 2007; Mellgren & Johnson, 2005; Mills, Nuckels, & Parichy, 2007). So war es in diesem Tiermodell auch möglich über eine durch *kita* gesteuerte Expression von onkogenem HRAS besonders früh und invasiv auftretende Melanome herbeizuführen (Santoriello et al., 2010). Die Fragen, warum *kitb* trotzdem im Melanom ebenfalls überexprimiert

ist und ob neben *xmrk* auch *kita* und *kitb* an der erhöhten Signalübertragung der MAP-Kinase beteiligt sein könnten, gilt es in weiteren Untersuchungen zu klären.

Neben den Arbeiten zur Aktivierung von *KIT* im malignen Melanom wurde jedoch auch festgestellt, dass es während der Progression des Tumors zu einem Rückgang in der Expression des Protoonkogens kommt (Lassam & Bickford, 1992; Natali et al., 1992). Außerdem scheint ein Verlust von *KIT* für Proliferation und Metastasierung sogar günstig zu sein (Alexeev & Yoon, 2006). Auch Melanomzelllinien wiesen eine generelle Herabregulierung von *KIT* auf (Easty & Bennett, 2000). Passend dazu zeigen auch meine Daten bei den Zelllinien UACC-62, SKMEL28 und A375 nur eine sehr geringe Expression von *KIT*. Die extreme Erhöhung von *KIT* in Hermes 3a lässt sich durch die Immortalisierung der Zellen erklären. Um diese zu erreichen ist neben einer stabilen Expression von hTERT (human telomerase reverse transcriptase) auch eine Überexpression von *CDK4* nötig, um die Aktivität von *p16* zu blockieren und die damit einhergehende Seneszenz von Zellen zu verhindern (Bennett, 2003). In einer Subgruppe von Melanomen konnte wiederum eine kombinierte Überexpression von *CDK4* und *KIT* festgestellt werden, was somit eine Erklärung für die hohen RNA-Level von *KIT* in der Zelllinie Hermes3a liefert (Smalley et al., 2008).

#### *c-myc*

In einer früheren Arbeit zu Expressionsmustern von Onkogenen und Protoonkogenen konnten gar keine oder nur sehr geringe Level von *c-myc* in kreuzungs- und karzinogenbedingten Melanomen des *Xiphophorus* gefunden werden (Maueler et al., 1993). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen, die mit Northern Blots erhoben wurden, zeigte sich in meinen Messungen mittels sensitiverer qPCR eine signifikant höhere Expression von *c-myc* in den malignen Proben im Vergleich zum benigneren Material. Der Unterschied zwischen dem Tumor und dem gesunden Kontrollgewebe war bei den Fischproben jedoch längst nicht so ausgeprägt wie bei den humanen Zelllinien. Dort zeigte sich bei drei von vier Melanomzelllinien eine 1,5 bis 3-fache

Erhöhung des *c-myc*. Dies entspricht früheren Studien, die außerdem noch eine signifikant verstärkte Expression in Metastasen im Vergleich zu primären Melanomen zeigen konnten (Grover, Ross, Richman, Robinson, & Wilson, 1996). Des Weiteren konnten zusätzlich *c-myc* Kopien in Proben von malignen Melanomen nachgewiesen werden (Kraehn et al., 2001). Andere Arbeiten kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass *c-myc* in Naevi eine im Vergleich zu Melanomen erhöhte Expression aufwies (Peris et al., 1991) oder konnten keinen entscheidenden Unterschied in der Expressionsart von *c-myc* in Melanomen und Naevi entdecken (Bergman, Lurie, Kerner, Kilim, & Friedman-Birnbaum, 1997). Diese eklatanten Unterschiede lassen sich vielleicht durch unterschiedliche Umwelteinflüsse erklären. So zeigte beispielsweise eine weitere Studie, dass nur in Hautproben, die intermittierend Sonnenlicht ausgesetzt waren, vermehrte *c-myc* Kopien zu finden waren. Chronisch exponierte Haut wies dagegen keine zusätzliche Anzahl an Kopien auf (Glatz-Krieger et al., 2006).

#### *pdgfrb*

*PDGFR $\beta$*  stellt neben KIT einen weiteren Vertreter aus der Familie der Rezeptortyrosinkinase Typ III dar (Blume-Jensen & Hunter, 2001). In Tumorzellen spielt die Aktivierung von *PDGFR $\beta$*  durch den Wachstumsfaktor PDGF eine entscheidende Rolle in der Vaskularisierung des Gewebes (Song, Ewald, Stallcup, Werb, & Bergers, 2005; Sundberg, Ljungstrom, Lindmark, Gerdin, & Rubin, 1993). So führte bei Mäusen, die mit B16 Melanomzellen injiziert wurden, eine aktivierende Mutation des *PDGFR $\beta$*  zu einer Beschleunigung der Vaskularisierung des Tumorgewebes und damit zum schnelleren Wachstum (Suzuki, Heldin, & Heuchel, 2007). Interessanterweise konnten auch in Melanomen des *Xiphophorus* eine vermehrte Expression von *x-pdgfr* nachgewiesen werden. Dabei korrelierten Genexpression und Malignität des Tumors positiv (Zechel, Peters, Schleenbecker, & Anders, 1992). Damit übereinstimmend zeigte sich auch in meinen Daten verglichen mit dem benigneren Gewebe eine höhere Expression von *pdgfrb* in den malignen Proben der Flosse. Doch obwohl in allen Tumorproben *pdgfrb* nachzuweisen

war, lässt der geringe Unterschied zwischen der Genexpression im malignen exophytischen Wachstum und in der benigneren Hyperpigmentierung auf eine geringere Bedeutung für die Tumorentwicklung schließen. Des Weiteren zeigte sich auch in den Melanomzelllinie nur eine sehr schwache Expression des *PDGFRβ*. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass *c-myc* die Genexpression von *PDGFRβ* im Sinne einer negativen Rückkopplung unterdrückt (Oster et al., 2000). So zeigt sich bei der Zelllinie A375, die unter den getesteten Zelllinie *c-myc* am geringsten exprimiert, das höchste Level an *PDGFRB* mRNA.

#### *mxra5a*

*MXRA5*, auch als Adlican bekannt, ist ein bisher wenig untersuchtes Gen aus der Familie der MXRA Gene, welche an Zelladhäsion und Matrixumbau beteiligt sind (Takamatsu, Zhang, Schrader, elSohly, & Walker, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass *MXRA5* sowohl in Tumoren des Ovars, als auch in kolorektalen Karzinomen überexprimiert wird (Buckanovich et al., 2007; G. H. Wang et al., 2013). Die Messungen von *mxra5a*, dem Ortholog des *Xiphophorus* zu *MXRA5*, in dieser Arbeit zeigen ebenfalls eine erhöhte Expression in den malignen Proben der Flossen. Jedoch war auch hier, wie schon bei der Expression von *pdgfrb*, der Unterschied in den exophytischen Geweben nicht erheblich. Diese Ähnlichkeit der Expressionsmuster von *mxra5a* und *pdgfrb* ist insbesondere interessant, da die Hochregulierung von *MXRA5* im Ovarialkarzinom in Zellen des Gefäßgewebes nachgewiesen wurde (Buckanovich et al., 2007). Dies lässt auf eine Verbindung zu dem Gen der Vaskularisierung, *PDGFRβ*, schließen, was in zukünftigen Experimenten untersucht werden sollte.

#### *xirp2b*

Der eklatante Unterschied, welcher sich bei den Messungen von *xirp2b* in malignen und benignem Gewebe durch die RNA-Seq zeigte, konnte durch qPCR nicht validiert werden. Interessanterweise war das Gen sowohl in den malignen und benigneren Proben der Flossen wesentlich höher exprimiert als im exophytischen Wachstum. Außerdem zeigte sich eine hohe Expression im

Kiemendeckel der Fische (Daten nicht abgebildet). Die höchste Expression zeigte die Probe der gepoolten Rückenflossen, welche zur Berechnung der relativen Expression gemessen wurden. Dies lässt vermuten, dass *xirp2b* eine wichtige Rolle in Geweben mit knöchernen Anteilen, wie zum Beispiel den Rückenflossen und Kiemendeckeln, spielt.

## Globale und promotor-spezifische Methylierung

### Globale Methylierung

Der Verlust von 5-mC Methylierung an CpG-Dinukleotiden war die erste epigenetische Abweichung, die in Tumorzellen nachgewiesen werden konnte (Feinberg & Vogelstein, 1983; Gama-Sosa et al., 1983). Eine globale Hypomethylierung konnte ebenfalls in benignen Geweben gemessen werden (Goelz et al., 1985). In Experimenten an Mäusen zeigte sich sogar, dass sich Tumorwachstum durch Hypomethylierung induzieren lässt (Gaudet et al., 2003). Außerdem führte in der murinen Melanomzelllinie B16 globale Hypomethylierung zu einer verstärkten Metastasierung der Zellen (Funaki et al., 2015). Die Forschung zur globalen Epigenetik in Fischmodellen ist noch überschaubar. In Schollen, die eine erhöhte Inzidenz von hepatozellulären Adenomen aufweisen, wurde in den Tumoren verglichen zu normalen Geweben eine global hypomethylierte DNA festgestellt (Gaudet et al., 2003). In transgenen Zebrafischen zeigte sich, dass eine Überexpression des UHRF1 (Ubiquitin-like with PHD and RING finger domains 1) neben einer Hypomethylierung der DNA auch zu Hepatozellulären Karzinomen führt (Mudbhary et al., 2014). In dieser Arbeit wurde nun erstmalig gezeigt, dass sich entsprechend der bisherigen Forschung auch im *Xiphophorus* ein signifikant verringerter Gehalt an 5-mC in den benignen Läsionen und malignen Melanomen der Flossen verglichen mit anderem Gewebe finden lässt. Wie dieser Verlust an Methylierung zur Tumorentstehung beiträgt ist noch unklar. Da im *Xiphophorus* jedoch keine gesteigerte genomische Instabilität nachgewiesen werden konnte (Zunker, Epplen, & Scharl, 2006), wurde als

nächstes die Promotorregion des für den *Xiphophorus* spezifischen Onkogens *xmrk* auf Hypomethylierung untersucht.

#### Promotorspezifische Methylierung von *xmrk* und *egfrb*

In vielen Arbeiten konnte schon gezeigt werden, dass Hypomethylierung zu einer verstärkten Aktivierung von Onkogenen führen kann (Nishigaki et al., 2005; Van Tongelen et al., 2017). Vor zwanzig Jahren wurde erstmals beschrieben, dass die Promotorregion des *xmrk* sowohl in den Melanomzellen des *Xiphophorus* und als auch in Zellen der Zelllinie PSM hypomethyliert bzw. gar nicht methyliert ist (Altschmied et al., 1997). Während bei den damaligen Experimenten mittels Bisulfit-Sequenzierung die DNA-Methylierung an mehreren Stellen des *xmrk* Promotors analysiert wurde, nutzte ich in dieser Arbeit wie im Ergebnisteil beschrieben methylierungssensitive Restriktionsendonukleasen und qPCR, um die Methylierung an einer Stelle zu überprüfen. Zusätzlich dazu wurde noch der Promotor des *egfrb* mit derselben Technik untersucht. In beiden Arbeiten zeigte sich, dass der *xmrk* Promotor in PSM Zellen an keiner der untersuchten Stellen methyliert ist. Diese Übereinstimmung bestätigt die Wirksamkeit des neu etablierten Ansatzes zur Verwendung von methylierungssensitiven Enzymen. Bei den Messungen des Tumor- und Kontrollgewebes zeigt sich ebenso ein ähnliches Expressionsmuster an der untersuchten Schnittstelle. In den Daten dieser Arbeit lässt sich dabei kein signifikanter Unterschied in der Methylierung von Melanom- und gesunden Kontrollgeweben feststellen. Lediglich die Proben des exophytischen Tumorstadiums zeigten eine geringere Methylierung als die des restlichen Gewebes. Bei der Analyse weiterer CpG-Methylierungen im Promotor zeigte sich bei Altschmied et al. dennoch eine signifikant verringerte Methylierung im Tumorgewebe. Mithilfe der in dieser Arbeit neu etablierten Methode zur Analyse der Methylierung könnte man in zukünftigen Experimente diese Ergebnisse validieren und weiter untersuchen.

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Zelllinie PSM und der Tumorstadien, stellt die Uniformität der Zellen einer Zelllinie dar. So kann bei der Präparation der Fischproben eine Vermischung

von Melanomzellen mit Zellen aus gesundem Gewebe, welche ein anderes Methylierungsmuster aufweisen, nicht vermieden werden.

Interessanterweise zeigte sich bei den PSM Zellen eine verstärkte Methylierung des *egfrb* Promotors im Verhältnis zu den anderen Proben. Dies stimmt auch mit den Daten einer unveröffentlichten Arbeit im Labor von Manfred Scharl überein (interne Kommunikation) und beweist, dass in den Zellen keine generelle Demethylierung von Promotoren vorliegt.

## Zukunftsperspektiven

Die Ergebnisse zur Expression verschiedener Gene im *Xiphophorus* Melanom zeigen, dass neben *xmrk* einige weitere Erbfaktoren im Rahmen des Tumorwachstums stärker exprimiert werden. Die Validierung der durch RNA-Seq ermittelten Kandidatengene mittels qPCR bietet einen Startpunkt für die weitere Erforschung von *xmrk* und den verknüpften Signalwegen. In zukünftigen Arbeiten können mithilfe von Hochdurchsatzsequenzierung und Software zur Analyse von Signalpfaden dabei noch wesentlich größere Mengen an Genen gemessen und eingeordnet werden, um Licht in die Einzelschritte der Melanomentstehung zu bringen. Des Weiteren wird es damit möglich sein den *R*-Locus in linkage group V noch feiner zu charakterisieren und das durch den *R*-Locus kodierte Gen zu finden.

Hinsichtlich der Epigenetik des *Xiphophorus* Melanoms konnte in dieser Studie erstmals eine Verminderung der globalen Methylierung im Tumorgewebe gezeigt werden. Anhand experimenteller Ansätze zur aktiven Demethylierung von gesunden Zellen durch Inhibitoren wie z.B. 5'-Aza-2'-Deoxyxytidine besteht die Möglichkeit, verminderte globale Methylierung und Zellentartung dynamischer in der Entstehung zu untersuchen. Weiterhin gilt es die promotorspezifische Methylierung von *xmrk* an mehreren Stellen in Geweben verschiedener Dignität zu untersuchen, um den Zusammenhang zwischen Hypomethylierung und gesteigerter Expression genauer zu beschreiben.

# Zusammenfassung

Das Melanom ist eine der aggressivsten Formen von malignen Tumoren beim Menschen. Bei Fischen der Gattung *Xiphophorus* kommt es zur spontanen Tumorbildung, welche auch durch zwischenartliche Kreuzung herbeiführbar ist. Hybride mit angeborenem Melanom stellen ein nützliches Tiermodell zur Untersuchung der genetischen Grundlage der Tumorentwicklung dar. Ihre Tumorigenese hängt mit der pigmentzellspezifischen Überexpression der durch eine Mutation aktivierten Rezeptortyrosinkinase *Xmrk* zusammen. In reinrassigen Fischen wird die onkogene Funktion des *xmrk* durch den Genlocus *R*, welcher molekular noch nicht identifiziert wurde, unterdrückt. Zusammen mit der Überexpression von *xmrk* konnten mittels einer RNA-Seq Analyse weitere Gene gefunden werden, welche differenziell in den Proben von malignen und benignen Geweben des *Xiphophorus* exprimiert werden. Des Weiteren ist bekannt, dass die Methylierung des *xmrk* Promotors Einfluss auf die Expression des Genes hat.

Um die Daten der durch RNA-Seq gefundenen Kandidatengene zu validieren, wurde deren Expression in malignen und benignen Geweben der Flossen und des Rumpfes mittels qPCR quantifiziert. Zusätzlich dazu wurde die Expression einiger humaner Orthologe dieser Gene in Proben aus humanen Melanomzelllinien gemessen. Mir war es möglich zu zeigen, dass mit Ausnahme von *cdkn2ab*, *mitfb* und *xirp2b* alle Kandidatengene signifikant unterschiedlich in mindestens einem Vergleich von benignem und malignem Gewebe exprimiert waren. Das mit *xmrk* verglichen gegensätzliche Expressionsmuster von *pdcd4a* macht es zu einem vielversprechenden Kandidaten als vom *R*-Locus codierten Tumorsuppressorgen. In den humanen Melanomzelllinien konnte ausschließlich von *PDGFRB* keine erhöhte Expression in irgendeiner Probe nachgewiesen werden. Während die Expression von *PDCD4*, *C-MYC* und *MITF* in mindestens drei der vier Zelllinien



mittelstark erhöht war, ließ sich bei *KIT* eine enorm gesteigerte Überexpression in Zellen der Linie Hermes3a nachweisen. Da drei der fünf analysierten Gene und ihre Orthologen ähnliche Expressionsmuster in Proben des *Xiphophorus* und der humanen Melanomzelllinien zeigen, deuten diese Ergebnisse auf die Nützlichkeit des Tiermodells zur Identifizierung entscheidender Gene und Signalwege im malignen Melanom hin.

Ein zweites Ziel der Arbeit war das Erlangen tieferer Einblicke in die Methylierung des *Xiphophorus* Melanoms auf einer globalen und promotor-spezifischen Ebene. Um die Hypothese einer Reduzierung der globalen Methylierung zu testen, führte ich eine kolorimetrische Quantifizierung der 5-mC DNA in Kontroll- und Tumorgewebe aus. Diese Vorgehensweise zeigte zum ersten Mal eine signifikante Verminderung der methylierten globalen DNA in den benignen Läsionen und malignen Melanomen der Flossen verglichen mit dem Kontrollgewebe. Um herauszufinden, ob diese Demethylierung direkt mit der Überexpression des *xmrk* verbunden ist, analysierte ich als nächstes die Methylierung eines CpG Dinukleotids des *xmrk* Promotors mithilfe von methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen. Obwohl nur in den Proben des exophytischen Tumorwachstums als Krebsgewebe eine verringerte Methylierung des CpG Dinukleotids verglichen mit den Kontrollen nachgewiesen werden konnte, zeigte sich die Stelle in Zellen der *Xiphophorus* Melanomzelllinie PSM komplett unmethyliert. Diese Ergebnisse deuten stark daraufhin, dass eine differenzierte Methylierung das onkogene Potential dieser Zellen bewirkt. Um die Effekte veränderter globaler und promotor-spezifischer Methylierung auf die Tumorigenese besser zu verstehen, sind weitere Untersuchungen nötig.

# Abstract

Melanoma is among the most aggressive forms of malignant tumors in humans. In fish of the genus *Xiphophorus* melanoma tumor formation happens spontaneously in nature and can also be induced by interspecific crossing. Hybrid fish with hereditary melanoma are an established animal model for the study of the genetic origin of tumor development. Their tumorigenesis is linked to the overexpression of the mutationally activated receptor tyrosine kinase *Xmrk* in pigment cells. In purebred fish the molecularly still unrevealed locus *R* is suppressing the oncogenic function of *xmrk*. Along with the overexpression of *xmrk* a RNA-Seq analysis revealed even more differentially expressed genes in the tissues of malignant melanoma in *Xiphophorus* compared to benign tissues. Furthermore, there has already been gained evidence that the methylation status of the *xmrk* promotor has effects on its overexpression.

To validate the RNA-Seq data of the candidate genes, gene expression in malignant and benign tissues of the fins and trunk was quantified using qPCR. Additionally, the expression of some human orthologues of these genes was also analyzed in samples of human melanoma cell lines. I was able to demonstrate that with the exception of *cdkn2ab*, *mitfb* and *xirp2b* all candidate genes are significantly differentially expressed in at least one set of tissues varying in dignity. The opposite expression pattern of *pdcd4a* compared to *xmrk* makes it a promising candidate as the at the *R* locus encoded tumor suppressor gene. In the human melanoma cell lines only the expression of *PDGFRB* wasn't increased in any of the samples. While the expression of *PDCD4*, *C-MYC* and *MITF* was moderately higher in at least three of the four cell lines, *KIT* was shown to be hugely overexpressed in Hermes3a. As three of the five analyzed genes and its orthologues show a similar expression pattern in samples of the *Xiphophorus* and the human melanoma cell lines, these findings point out the

usefulness of the animal model to find new genes and pathways within the malignant melanoma.

A second aim of the thesis was to gain a deeper insight into to methylation regulation in the *Xiphophorus* melanoma on a global and a promoter-specific level. To test the hypothesis that global methylation is reduced in the melanoma cells, I performed a colorimetric quantification of 5-mC DNA in control and tumor tissues. This approach showed for the first time a significantly decreased amount of global DNA in the benign and malignant samples deriving from the fins compared to control tissues. To find out if this demethylation is directly linked to the overexpression of *xmrk*, I analyzed the methylation of CpG site in the *xmrk* promotor using methylation sensitive restriction endonucleases. Interestingly in the samples of the *Xiphophorus* melanoma cell line PSM the CpG site wasn't methylated at all. Although only the samples of the exophytic tumor growth as a tumoric tissue were less methylated than the control, the cells of the *Xiphophorus* melanoma cell line PSM were completely unmethylated. These results imply that differential methylation triggers the oncogenic potential of these cells. To improve the understanding of the effects global and promoter-specific methylation has on tumorigenesis, further studies are necessary.

# Literaturverzeichnis

- Adam, D., Dimitrijevic, N., & Schartl, M. (1993). Tumor suppression in *Xiphophorus* by an accidentally acquired promoter. *Science*, *259*(5096), 816-819.
- Adam, D., Maueler, W., & Schartl, M. (1991). Transcriptional activation of the melanoma inducing *Xmrk* oncogene in *Xiphophorus*. *Oncogene*, *6*(1), 73-80.
- Ahuja, M. R., Schwab, M., & Anders, F. (1980). Linkage between a regulatory locus for melanoma cell differentiation and an esterase locus in *Xiphophorus*. *J Hered*, *71*(6), 403-407.
- Alexeev, V., & Yoon, K. (2006). Distinctive role of the cKit receptor tyrosine kinase signaling in mammalian melanocytes. *J Invest Dermatol*, *126*(5), 1102-1110. doi:10.1038/sj.jid.5700125
- Altschmied, J., Delfgaauw, J., Wilde, B., Duschl, J., Bouneau, L., Volff, J. N., & Schartl, M. (2002). Subfunctionalization of duplicate *mitf* genes associated with differential degeneration of alternative exons in fish. *Genetics*, *161*(1), 259-267.
- Altschmied, J., Ditzel, L., & Schartl, M. (1997). Hypomethylation of the *Xmrk* oncogene promoter in melanoma cells of *Xiphophorus*. *Biol Chem*, *378*(12), 1457-1466.
- Amae, S., Fuse, N., Yasumoto, K., Sato, S., Yajima, I., Yamamoto, H., . . . Shibahara, S. (1998). Identification of a novel isoform of microphthalmia-associated transcription factor that is enriched in retinal pigment epithelium. *Biochem Biophys Res Commun*, *247*(3), 710-715.
- Anders, F. (1967). Tumour formation in platyfish-swordtail hybrids as a problem of gene regulation. *Experientia*, *23*(1), 1-10.
- Anders, F. (1991). Contributions of the Gordon-Kosswig melanoma system to the present concept of neoplasia. *Pigment Cell Res*, *4*(1), 7-29.
- Aoude, L. G., Wadt, K. A., Pritchard, A. L., & Hayward, N. K. (2015). Genetics of familial melanoma: 20 years after *CDKN2A*. *Pigment Cell Melanoma Res*, *28*(2), 148-160. doi:10.1111/pcmr.12333
- Ashida, A., Takata, M., Murata, H., Kido, K., & Saida, T. (2009). Pathological activation of KIT in metastatic tumors of acral and mucosal melanomas. *Int J Cancer*, *124*(4), 862-868. doi:10.1002/ijc.24048
- Bastian, B. C. (2014). The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol*, *9*, 239-271. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104658
- Baudler, M., Schartl, M., & Altschmied, J. (1999). Specific activation of a STAT family member in *Xiphophorus* melanoma cells. *Exp Cell Res*, *249*(2), 212-220. doi:10.1006/excr.1999.4470
- Baylin, S. B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, *2 Suppl 1*, S4-11. doi:10.1038/ncponc0354
- Bennett, D. C. (2003). Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene*, *22*(20), 3063-3069. doi:10.1038/sj.onc.1206446

- Bennett, D. C. (2008). How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res*, 21(1), 27-38. doi:10.1111/j.1755-148X.2007.00433.x
- Bergman, R., Lurie, M., Kerner, H., Kilim, S., & Friedman-Birnbaum, R. (1997). Mode of c-myc protein expression in Spitz nevi, common melanocytic nevi and malignant melanomas. *J Cutan Pathol*, 24(4), 219-222.
- Blin, N., & Stafford, D. W. (1976). A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 3(9), 2303-2308.
- Blume-Jensen, P., & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411(6835), 355-365. doi:10.1038/35077225
- Borowsky, R. (1984). The evolutionary genetics of Xiphophorus *Evolutionary genetics of fishes* (pp. 235-310): Springer.
- Braasch, I., Brunet, F., Volff, J. N., & Schartl, M. (2009). Pigmentation pathway evolution after whole-genome duplication in fish. *Genome Biol Evol*, 1, 479-493. doi:10.1093/gbe/evp050
- Buckanovich, R. J., Sasaroli, D., O'Brien-Jenkins, A., Botbyl, J., Hammond, R., Katsaros, D., . . . Coukos, G. (2007). Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 25(7), 852-861. doi:10.1200/JCO.2006.08.8583
- Butler, E. A., Lee, T. L., & Gross, J. J. (2007). Emotion regulation and culture: are the social consequences of emotion suppression culture-specific? *Emotion*, 7(1), 30-48. doi:10.1037/1528-3542.7.1.30
- Catoni, G. L. (1953). S-Adenosylmethionine; a new intermediate formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. *J Biol Chem*, 204(1), 403-416.
- Cree, I. A. (2011). Cancer biology. *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, 1-11.
- Curtin, J. A., Busam, K., Pinkel, D., & Bastian, B. C. (2006). Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol*, 24(26), 4340-4346. doi:10.1200/JCO.2006.06.2984
- Cust, A. E., Harland, M., Makalic, E., Schmidt, D., Dowty, J. G., Aitken, J. F., . . . Jenkins, M. A. (2011). Melanoma risk for CDKN2A mutation carriers who are relatives of population-based case carriers in Australia and the UK. *J Med Genet*, 48(4), 266-272. doi:10.1136/jmg.2010.086538
- Delfgaauw, J., Duschl, J., Wellbrock, C., Froschauer, C., Schartl, M., & Altschmied, J. (2003). MITF-M plays an essential role in transcriptional activation and signal transduction in Xiphophorus melanoma. *Gene*, 320, 117-126.
- Diepgen, T. L., & Mahler, V. (2002). The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol*, 146 Suppl 61, 1-6.
- Dimitrijevic, N., Winkler, C., Wellbrock, C., Gomez, A., Duschl, J., Altschmied, J., & Schartl, M. (1998). Activation of the Xmrk proto-oncogene of Xiphophorus by overexpression and mutational alterations. *Oncogene*, 16(13), 1681-1690. doi:10.1038/sj.onc.1201693
- Easty, D. J., & Bennett, D. C. (2000). Protein tyrosine kinases in malignant melanoma. *Melanoma Res*, 10(5), 401-411.
- Feinberg, A. P., & Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, 4(2), 143-153. doi:10.1038/nrc1279

- Feinberg, A. P., & Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, *301*(5895), 89-92.
- Fornzler, D., Wittbrodt, J., & Scharl, M. (1991). Analysis of an esterase linked to a locus involved in the regulation of the melanoma oncogene and isolation of polymorphic marker sequences in Xiphophorus. *Biochem Genet*, *29*(11-12), 509-524.
- Friend, S. H. (1993). Genetic models for studying cancer susceptibility. *Science*, *259*(5096), 774-775.
- Funaki, S., Nakamura, T., Nakatani, T., Umehara, H., Nakashima, H., Okumura, M., . . . Nakano, T. (2015). Global DNA hypomethylation coupled to cellular transformation and metastatic ability. *FEBS Lett*, *589*(24 Pt B), 4053-4060. doi:10.1016/j.febslet.2015.11.020
- Fuse, N., Yasumoto, K., Takeda, K., Amae, S., Yoshizawa, M., Udono, T., . . . Shibahara, S. (1999). Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus. *J Biochem*, *126*(6), 1043-1051.
- Gama-Sosa, M. A., Slagel, V. A., Trewyn, R. W., Oxenhandler, R., Kuo, K. C., Gehrke, C. W., & Ehrlich, M. (1983). The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic acids research*, *11*(19), 6883-6894.
- Garbe, C., & Leiter, U. (2009). Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol*, *27*(1), 3-9. doi:10.1016/j.clindermatol.2008.09.001
- Garraway, L. A., Widlund, H. R., Rubin, M. A., Getz, G., Berger, A. J., Ramaswamy, S., . . . Sellers, W. R. (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*, *436*(7047), 117-122. doi:10.1038/nature03664
- Gaudet, F., Hodgson, J. G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, J. W., . . . Jaenisch, R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, *300*(5618), 489-492. doi:10.1126/science.1083558
- Geissinger, E., Weisser, C., Fischer, P., Scharl, M., & Wellbrock, C. (2002). Autocrine stimulation by osteopontin contributes to antiapoptotic signalling of melanocytes in dermal collagen. *Cancer Res*, *62*(16), 4820-4828.
- Giebel, L. B., & Spritz, R. A. (1991). Mutation of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) protooncogene in human piebaldism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(19), 8696-8699.
- Glatz-Krieger, K., Pache, M., Tapia, C., Fuchs, A., Savic, S., Glatz, D., . . . Meyer, P. (2006). Anatomic site-specific patterns of gene copy number gains in skin, mucosal, and uveal melanomas detected by fluorescence in situ hybridization. *Virchows Arch*, *449*(3), 328-333. doi:10.1007/s00428-006-0167-8
- Goelz, S. E., Vogelstein, B., Hamilton, S. R., & Feinberg, A. P. (1985). Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science*, *228*(4696), 187-190.
- Gomez, A., Wellbrock, C., Gutbrod, H., Dimitrijevic, N., & Scharl, M. (2001). Ligand-independent dimerization and activation of the oncogenic Xmrk receptor by

- two mutations in the extracellular domain. *J Biol Chem*, 276(5), 3333-3340. doi:10.1074/jbc.M006574200
- Gordon, H., & Gordon, M. (1957). Maintenance of polymorphism by potentially injurious genes in eight natural populations of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *Journal of Genetics*, 55(1), 1-44.
- Gordon, M. (1927). The Genetics of a Viviparous Top-Minnow *Platycoecilus*; the Inheritance of Two Kinds of Melanophores. *Genetics*, 12(3), 253-283.
- Grover, R., Ross, D. A., Richman, P. I., Robinson, B., & Wilson, G. D. (1996). C-myc oncogene expression in human melanoma and its relationship with tumour antigenicity. *Eur J Surg Oncol*, 22(4), 342-346.
- Guibert, S., & Weber, M. (2013). Functions of DNA methylation and hydroxymethylation in mammalian development. *Curr Top Dev Biol*, 104, 47-83. doi:10.1016/B978-0-12-416027-9.00002-4
- Hartman, M. L., & Czyz, M. (2015). MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cell Mol Life Sci*, 72(7), 1249-1260. doi:10.1007/s00018-014-1791-0
- Hassel, J. C., Winnemoller, D., Scharl, M., & Wellbrock, C. (2008). STAT5 contributes to antiapoptosis in melanoma. *Melanoma Res*, 18(6), 378-385. doi:10.1097/CMR.0b013e32830ce7d7
- Häussler, G. (1928). Über Melanombildungen bei Bastarden von *Xiphophorus helleri* und *Platycoecilus maculatus* var. *rubra*. *Journal of Molecular Medicine*, 7(33), 1561-1562.
- Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T., & Fisher, D. E. (1998). MAP kinase links the transcription factor *Microphthalmia* to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature*, 391(6664), 298-301. doi:10.1038/34681
- Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 349(21), 2042-2054. doi:10.1056/NEJMra023075
- Hershey, C. L., & Fisher, D. E. (2005). Genomic analysis of the *Microphthalmia* locus and identification of the MITF-J/*Mitf*-J isoform. *Gene*, 347(1), 73-82. doi:10.1016/j.gene.2004.12.002
- Houghton, A. N., & Polsky, D. (2002). Focus on melanoma. *Cancer Cell*, 2(4), 275-278.
- Hsiao, J. J., & Fisher, D. E. (2014). The roles of *microphthalmia*-associated transcription factor and pigmentation in melanoma. *Arch Biochem Biophys*, 563, 28-34. doi:10.1016/j.abb.2014.07.019
- Hultman, K. A., Bahary, N., Zon, L. I., & Johnson, S. L. (2007). Gene Duplication of the zebrafish kit ligand and partitioning of melanocyte development functions to kit ligand a. *PLoS Genet*, 3(1), e17. doi:10.1371/journal.pgen.0030017
- Jiang, Y., Liu, S., Chen, X., Cao, Y., & Tao, Y. (2013). Genome-wide distribution of DNA methylation and DNA demethylation and related chromatin regulators in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1835(2), 155-163.
- Jiao, J., Fan, Y., & Zhang, Y. (2015). Expression and clinicopathological significance of microRNA-21 and programmed cell death 4 in malignant melanoma. *J Int Med Res*, 43(5), 672-678. doi:10.1177/0300060515583707

- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3(6), 415-428. doi:10.1038/nrg816
- Kallman, K. D. (1975). The platyfish, *Xiphophorus maculatus* *Handbook of genetics* (pp. 81-132): Springer.
- Kazianis, S., Coletta, L. D., Morizot, D. C., Johnston, D. A., Osterndorff, E. A., & Nairn, R. S. (2000). Overexpression of a fish CDKN2 gene in a hereditary melanoma model. *Carcinogenesis*, 21(4), 599-605.
- Kazianis, S., Gutbrod, H., Nairn, R. S., McEntire, B. B., Della Coletta, L., Walter, R. B., . . . Morizot, D. C. (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(3), 210-220.
- Kazianis, S., Morizot, D. C., Coletta, L. D., Johnston, D. A., Woolcock, B., Vielkind, J. R., & Nairn, R. S. (1999). Comparative structure and characterization of a CDKN2 gene in a *Xiphophorus* fish melanoma model. *Oncogene*, 18(36), 5088-5099. doi:10.1038/sj.onc.1202884
- Koswig, C. (1928). Über bastarde der Teleostier *Platyopocilus* und *Xiphophorus*. *Z Indukt Abstamm Vererbungsl*, 47, 150-158.
- Kraehn, G. M., Utikal, J., Udart, M., Greulich, K. M., Bezold, G., Kaskel, P., . . . Peter, R. U. (2001). Extra c-myc oncogene copies in high risk cutaneous malignant melanoma and melanoma metastases. *Br J Cancer*, 84(1), 72-79. doi:10.1054/bjoc.2000.1535
- Lankat-Buttgereit, B., & Goke, R. (2009). The tumour suppressor Pcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation. *Biol Cell*, 101(6), 309-317. doi:10.1042/BC20080191
- Larue, L., Dougherty, N., Porter, S., & Mintz, B. (1992). Spontaneous malignant transformation of melanocytes explanted from Wf/Wf mice with a Kit kinase-domain mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(16), 7816-7820.
- Lassam, N., & Bickford, S. (1992). Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. *Oncogene*, 7(1), 51-56.
- Lee, B., Mukhi, N., & Liu, D. (2012). Current management and novel agents for malignant melanoma. *J Hematol Oncol*, 5, 3. doi:10.1186/1756-8722-5-3
- Lee, J. J., Murphy, G. F., & Lian, C. G. (2014). Melanoma epigenetics: novel mechanisms, markers, and medicines. *Lab Invest*, 94(8), 822-838. doi:10.1038/labinvest.2014.87
- Levy, C., Khaled, M., & Fisher, D. E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med*, 12(9), 406-414. doi:10.1016/j.molmed.2006.07.008
- Lister, J. A., Close, J., & Raible, D. W. (2001). Duplicate mitf genes in zebrafish: complementary expression and conservation of melanogenic potential. *Dev Biol*, 237(2), 333-344. doi:10.1006/dbio.2001.0379
- Lister, R., & Ecker, J. R. (2009). Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res*, 19(6), 959-966. doi:10.1101/gr.083451.108
- Lu, Y., Boswell, M., Boswell, W., Kneitz, S., Hausmann, M., Klotz, B., . . . Walter, R. (2017). Molecular genetic analysis of the melanoma regulatory locus in *Xiphophorus* interspecies hybrids. *Mol Carcinog*, 56(8), 1935-1944. doi:10.1002/mc.22651



- Malitschek, B., Fornzler, D., & Schartl, M. (1995). Melanoma formation in Xiphophorus: a model system for the role of receptor tyrosine kinases in tumorigenesis. *Bioessays*, 17(12), 1017-1023. doi:10.1002/bies.950171205
- Matsushashi, S., Narisawa, Y., Ozaki, I., & Mizuta, T. (2007). Expression patterns of programmed cell death 4 protein in normal human skin and some representative skin lesions. *Exp Dermatol*, 16(3), 179-184. doi:10.1111/j.1600-0625.2006.00531.x
- Maueler, W., Schartl, A., & Schartl, M. (1993). Different expression patterns of oncogenes and proto-oncogenes in hereditary and carcinogen-induced tumors of Xiphophorus. *Int J Cancer*, 55(2), 288-296.
- McCain, J. (2013). The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *P T*, 38(2), 96-108.
- Meierjohann, S., Hufnagel, A., Wende, E., Kleinschmidt, M. A., Wolf, K., Friedl, P., . . . Schartl, M. (2010). MMP13 mediates cell cycle progression in melanocytes and melanoma cells: in vitro studies of migration and proliferation. *Mol Cancer*, 9, 201. doi:10.1186/1476-4598-9-201
- Meierjohann, S., Mueller, T., Schartl, M., & Buehner, M. (2006). A structural model of the extracellular domain of the oncogenic EGFR variant Xmrk. *Zebrafish*, 3(3), 359-369. doi:10.1089/zeb.2006.3.359
- Meierjohann, S., & Schartl, M. (2006). From Mendelian to molecular genetics: the Xiphophorus melanoma model. *Trends Genet*, 22(12), 654-661. doi:10.1016/j.tig.2006.09.013
- Meierjohann, S., Wende, E., Kraiss, A., Wellbrock, C., & Schartl, M. (2006). The oncogenic epidermal growth factor receptor variant Xiphophorus melanoma receptor kinase induces motility in melanocytes by modulation of focal adhesions. *Cancer Res*, 66(6), 3145-3152. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2667
- Mellgren, E. M., & Johnson, S. L. (2005). kitb, a second zebrafish ortholog of mouse Kit. *Dev Genes Evol*, 215(9), 470-477. doi:10.1007/s00427-005-0001-3
- 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(6471), 539-542. doi:10.1038/368539a0
- Miller, A. J., & Mihm, M. C., Jr. (2006). Melanoma. *N Engl J Med*, 355(1), 51-65. doi:10.1056/NEJMra052166
- Mills, M. G., Nuckels, R. J., & Parichy, D. M. (2007). Deconstructing evolution of adult phenotypes: genetic analyses of kit reveal homology and evolutionary novelty during adult pigment pattern development of Danio fishes. *Development*, 134(6), 1081-1090. doi:10.1242/dev.02799
- Morcinek, J. C., Weisser, C., Geissinger, E., Schartl, M., & Wellbrock, C. (2002). Activation of STAT5 triggers proliferation and contributes to anti-apoptotic signalling mediated by the oncogenic Xmrk kinase. *Oncogene*, 21(11), 1668-1678. doi:10.1038/sj.onc.1205148
- Morizot, D. C., & Siciliano, M. J. (1983). Linkage group V of platyfishes and Swordtails of the genus Xiphophorus (Poeciliidae): linkage of loci for malate dehydrogenase-2 and esterase-1 and esterase-4 with a gene controlling the severity of hybrid melanomas. *J Natl Cancer Inst*, 71(4), 809-813.

- Mudbhary, R., Hoshida, Y., Chernyavskaya, Y., Jacob, V., Villanueva, A., Fiel, M. I., . . . Sadler, K. C. (2014). UHRF1 overexpression drives DNA hypomethylation and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, *25*(2), 196-209. doi:10.1016/j.ccr.2014.01.003
- Natali, P. G., Nicotra, M. R., Winkler, A. B., Cavaliere, R., Bigotti, A., & Ullrich, A. (1992). Progression of human cutaneous melanoma is associated with loss of expression of c-kit proto-oncogene receptor. *Int J Cancer*, *52*(2), 197-201.
- Nishigaki, M., Aoyagi, K., Danjoh, I., Fukaya, M., Yanagihara, K., Sakamoto, H., . . . Sasaki, H. (2005). Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. *Cancer Res*, *65*(6), 2115-2124. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3340
- Nishikawa, S., Kusakabe, M., Yoshinaga, K., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., . . . Nishikawa, S. (1991). In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development. *EMBO J*, *10*(8), 2111-2118.
- Oster, S. K., Marhin, W. W., Asker, C., Facchini, L. M., Dion, P. A., Funa, K., . . . Penn, L. Z. (2000). Myc is an essential negative regulator of platelet-derived growth factor beta receptor expression. *Mol Cell Biol*, *20*(18), 6768-6778.
- Patton, E. E., Mitchell, D. L., & Nairn, R. S. (2010). Genetic and environmental melanoma models in fish. *Pigment Cell Melanoma Res*, *23*(3), 314-337. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00693.x
- Peris, K., Cerroni, L., Chimenti, S., Soyer, H. P., Kerl, H., & Hofler, H. (1991). Proto-oncogene expression in dermal naevi and melanomas. *Arch Dermatol Res*, *283*(8), 500-505.
- Regneri, J., & Scharl, M. (2012). Expression regulation triggers oncogenicity of xmrk alleles in the Xiphophorus melanoma system. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, *155*(1), 71-80. doi:10.1016/j.cbpc.2011.04.003
- Riggs, A. D., & Jones, P. A. (1983). 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv Cancer Res*, *40*, 1-30.
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (1999). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics methods and protocols*, 365-386.
- Santoriello, C., Gennaro, E., Anelli, V., Distel, M., Kelly, A., Koster, R. W., . . . Mione, M. (2010). Kita driven expression of oncogenic HRAS leads to early onset and highly penetrant melanoma in zebrafish. *PLoS One*, *5*(12), e15170. doi:10.1371/journal.pone.0015170
- Schaafhausen, M. K., Yang, W. J., Centanin, L., Wittbrodt, J., Bosserhoff, A., Fischer, A., . . . Meierjohann, S. (2013). Tumor angiogenesis is caused by single melanoma cells in a manner dependent on reactive oxygen species and NF-kappaB. *J Cell Sci*, *126*(Pt 17), 3862-3872. doi:10.1242/jcs.125021
- Scharl, M. (1995). Platyfish and swordtails: a genetic system for the analysis of molecular mechanisms in tumor formation. *Trends Genet*, *11*(5), 185-189. doi:10.1016/S0168-9525(00)89041-1
- Scharl, 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*(3), 1385-1394.

- Schartl, M., Wilde, B., Laisney, J. A., Taniguchi, Y., Takeda, S., & Meierjohann, S. (2010). A mutated EGFR is sufficient to induce malignant melanoma with genetic background-dependent histopathologies. *Journal of Investigative Dermatology*, *130*(1), 249-258.
- Schwab, M., Ahuja, M., & Anders, F. (1976). *GENETICALLY CONDITIONED SUSCEPTIBILITY OF SPECIFIC CELL-TYPES TO NEOPLASTIC TRANSFORMATION IN XIPHOPHORINE FISH*. Paper presented at the Heredity.
- Shtivelman, E., Davies, M. Q., Hwu, P., Yang, J., Lotem, M., Oren, M., . . . Fisher, D. E. (2014). Pathways and therapeutic targets in melanoma. *Oncotarget*, *5*(7), 1701-1752. doi:10.18632/oncotarget.1892
- Simpson, D. A., Feeney, S., Boyle, C., & Stitt, A. W. (2000). Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis*, *6*, 178-183.
- Smalley, K. S., Contractor, R., Nguyen, T. K., Xiao, M., Edwards, R., Muthusamy, V., . . . Nathanson, K. L. (2008). Identification of a novel subgroup of melanomas with KIT/cyclin-dependent kinase-4 overexpression. *Cancer Res*, *68*(14), 5743-5752. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0235
- Smith, S. D., Kelley, P. M., Kenyon, J. B., & Hoover, D. (2000). Tietz syndrome (hypopigmentation/deafness) caused by mutation of MITF. *J Med Genet*, *37*(6), 446-448.
- Song, S., Ewald, A. J., Stallcup, W., Werb, Z., & Bergers, G. (2005). PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. *Nat Cell Biol*, *7*(9), 870-879. doi:10.1038/ncb1288
- Stark, M., & Hayward, N. (2007). Genome-wide loss of heterozygosity and copy number analysis in melanoma using high-density single-nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res*, *67*(6), 2632-2642. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4152
- Sundberg, C., Ljungstrom, M., Lindmark, G., Gerdin, B., & Rubin, K. (1993). Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor-beta receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol*, *143*(5), 1377-1388.
- Suzuki, S., Heldin, C. H., & Heuchel, R. L. (2007). Platelet-derived growth factor receptor-beta, carrying the activating mutation D849N, accelerates the establishment of B16 melanoma. *BMC Cancer*, *7*, 224. doi:10.1186/1471-2407-7-224
- Takamatsu, S., Zhang, Q., Schrader, K. K., elSohly, H. N., & Walker, L. A. (2002). Characterization of Mycotypha metabolites found to be inhibitors of cell adhesion molecules. *J Antibiot (Tokyo)*, *55*(6), 585-592.
- Takemoto, C. M., Yoon, Y. J., & Fisher, D. E. (2002). The identification and functional characterization of a novel mast cell isoform of the microphthalmia-associated transcription factor. *J Biol Chem*, *277*(33), 30244-30252. doi:10.1074/jbc.M201441200
- Tassabehji, M., Newton, V. E., & Read, A. P. (1994). Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat Genet*, *8*(3), 251-255. doi:10.1038/ng1194-251

- Van Tongelen, A., Lorient, A., & De Smet, C. (2017). Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Lett*, 396, 130-137. doi:10.1016/j.canlet.2017.03.029
- Vidwans, S. J., Flaherty, K. T., Fisher, D. E., Tenenbaum, J. M., Travers, M. D., & Shrager, J. (2011). A melanoma molecular disease model. *PLoS One*, 6(3), e18257. doi:10.1371/journal.pone.0018257
- Vielkind, U., Schlage, W., & Anders, F. (1977). Melanogenesis in genetically determined pigment cell tumors of platyfish and platyfish-swordtail hybrids: correlation between tyrosine activity and degree of malignancy. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol*, 90(3), 285-299.
- Vikhreva, P. N., & Korobko, I. V. (2014). Expression of Pcd4 tumor suppressor in human melanoma cells. *Anticancer Res*, 34(5), 2315-2318.
- Volff, J. N., Korting, C., Froschauer, A., Zhou, Q., Wilde, B., Schultheis, C., . . . Schartl, M. (2003). The Xmrk oncogene can escape nonfunctionalization in a highly unstable subtelomeric region of the genome of the fish Xiphophorus. *Genomics*, 82(4), 470-479.
- Wakamatsu, Y. (1981). Establishment of a cell line from the platyfish-swordtail hybrid melanoma. *Cancer Res*, 41(2), 679-680.
- Wang, D., Guo, S., Han, S. Y., Xu, N., Guo, J. Y., & Sun, Q. (2013). Distinct roles of different fragments of PDCD4 in regulating the metastatic behavior of B16 melanoma cells. *Int J Oncol*, 42(5), 1725-1733. doi:10.3892/ijo.2013.1841
- Wang, G. H., Yao, L., Xu, H. W., Tang, W. T., Fu, J. H., Hu, X. F., . . . Xu, X. M. (2013). Identification of MXRA5 as a novel biomarker in colorectal cancer. *Oncol Lett*, 5(2), 544-548. doi:10.3892/ol.2012.1038
- Wellbrock, C., & Arozarena, I. (2015). Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res*, 28(4), 390-406. doi:10.1111/pcmr.12370
- 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*, 251(2), 340-349. doi:10.1006/excr.1999.4580
- Wellbrock, C., & Schartl, M. (1999). Multiple binding sites in the growth factor receptor Xmrk mediate binding to p59fyn, GRB2 and Shc. *Eur J Biochem*, 260(1), 275-283.
- Wellbrock, C., Weisser, C., Geissinger, E., Troppmair, J., & Schartl, M. (2002). Activation of p59(Fyn) leads to melanocyte dedifferentiation by influencing MKP-1-regulated mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*, 277(8), 6443-6454. doi:10.1074/jbc.M110684200
- Whiteman, D. C., Green, A. C., & Olsen, C. M. (2016). The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. *J Invest Dermatol*, 136(6), 1161-1171. doi:10.1016/j.jid.2016.01.035
- Winkler, C., Wittbrodt, J., Lammers, R., Ullrich, A., & Schartl, M. (1994). Ligand-dependent tumor induction in medakafish embryos by a Xmrk receptor tyrosine kinase transgene. *Oncogene*, 9(6), 1517-1525.

- Winnemoeller, D., Wellbrock, C., & Schartl, M. (2005). Activating mutations in the extracellular domain of the melanoma inducing receptor Xmrk are tumorigenic in vivo. *Int J Cancer*, *117*(5), 723-729. doi:10.1002/ijc.21232
- Wittbrodt, J., Adam, D., Malitschek, B., Maueler, W., Raulf, F., Telling, A., . . . Schartl, M. (1989). Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing Tu locus in Xiphophorus. *Nature*, *341*(6241), 415-421. doi:10.1038/341415a0
- 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*(6), 575-583.
- Zechel, C., Peters, H., Schleenbecker, U., & Anders, F. (1992). Expression of genes related to the human erbB, erbA, pdgf and pdgf-r in tumors of different etiology in Xiphophorus. *Int J Cancer*, *52*(1), 66-75.
- Zhu, J., Blenis, J., & Yuan, J. (2008). Activation of PI3K/Akt and MAPK pathways regulates Myc-mediated transcription by phosphorylating and promoting the degradation of Mad1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(18), 6584-6589. doi:10.1073/pnas.0802785105
- Zunker, K., Epplen, J. T., & Schartl, M. (2006). Genomic stability in malignant melanoma of Xiphophorus. *Melanoma Res*, *16*(2), 105-113. doi:10.1097/01.cmr.0000215038.30812.d2

# Danke

Ein besonders großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Manfred Scharl. Unter seiner Betreuung war es mir möglich diese Arbeit zu verwirklichen und dank ihm konnte ich einen unvergesslichen Forschungsaufenthalt in den USA verbringen. An dieser Stelle auch noch vielen Dank an Professor Ron Walter und sein Team für die Gastfreundlichkeit an der Texas State University.

Bei Herrn Prof. Dr. Manfred Gessler möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Dissertation bedanken. Danke an PD Dr. Roland Houben und Prof. Dr. Svenja Meierjohann für ihren Beisitz im Promotionskomitee.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinen beiden Betreuerinnen Dr. Barbara Klotz und Dr. Janine Regneri. Tausend Dank für eure stetige Hilfe und Unterstützung sowie ein besonders großer Dank für die lehrreiche und kurzweilige Zeit im Labor.

Vielen Dank an Dr. Susanne Kneitz für ihre hilfreichen Anleitungen und Anregungen hinsichtlich des statistischen Teils der Arbeit.

Danke auch dem restlichen Team der AG Scharl und AG Meierjohann sowie allen anderen Mitarbeitern des Biozentrums, die mich während meiner Zeit dort begleitet und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großes Dankeschön gilt auch Selina für ihre Unterstützung zur optischen Optimierung dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Motivation in jeder Lebenssituation danken. Vielen Dank auch an meine Geschwister Teresa, Stefan und Christian, die mir ebenso stets zur Seite stehen.

Die Arbeit wurde durch ein Stipendium zur Förderung der medizinischen Promotion der Graduiertenschule der Lebenswissenschaften (GSLs) gefördert.

# Publikationen

LU Y, BOSWELL M, BOSWELL W, KNEITZ S, **HAUSMANN M**, KLOTZ B, REGNERI J, SAVAGE M, AMORES A, POSTLETHWAIT J, WARREN W, SCHARTL M, WALTER R: Molecular genetic analysis of the melanoma regulatory locus in Xiphophorus interspecies hybrids. *Mol Carcinog.* 2017 Aug;56(8):1935-1944

LU Y, BOSWELL M, BOSWELL W, KNEITZ S, **HAUSMANN M**, KLOTZ B, REGNERI J, SAVAGE M, AMORES A, POSTLETHWAIT J, WARREN W, SCHARTL M, WALTER R: Comparison of Xiphophorus and human melanoma transcriptomes reveals conserved pathway interactions. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2018 Jul;31(4):496-508

REGNERI J, KLOTZ B, WILDE B, KOTTLER VA, **HAUSMANN M**, KNEITZ S, REGENSBURGER M, MAURUS K, GÖTZ R, LU Y, WALTER RB, HERPIN A, SCHARTL M: Analysis of the putative tumor suppressor gene cdkn2ab in pigment cells and melanoma of Xiphophorus and medaka. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019 Mar;32(2):248-258



# Eidesstattliche Erklärung

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Analyse der Genexpression verschiedener Kandidatengene und der Methylierung im Xiphophorus Melanom“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit I hereby confirm that my thesis entitled “Analysing Gene Expression of Candidate Genes and Methylation in Xiphophorus Melanoma” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis. Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, date

Signature

