



**Die Rolle transposabler Elemente in der Genese des malignen
Melanom im Fischmodell Xiphophorus**

**The role of transposable elements in malignant melanoma
development in the Xiphophorus fish model**

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

Vorgelegt von

Luca Münch

aus

Heidelberg

Würzburg, April 2022



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Herr Prof. Dr. Tovote

1. Betreuer: Herr Prof. Dr. Dr. Scharl

2. Betreuer: Herr Prof. Dr. Schilling

3. Betreuer: Frau Prof. Dr. Meierjohann

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

.....

Inhaltsverzeichnis

<i>Einleitung</i>	1
1.1 Grundlagen der Tumorgenese	1
1.2 Malignes Melanom.....	2
1.3 Xiphophorus-Melanom-System.....	3
1.4 Eukaryotische Transposons.....	7
1.5 Zielsetzung	10
<i>Material</i>	12
1.6 Fische	12
1.7 Primer	14
1.8 Lösungen, Puffer und Medien	16
1.8.1 Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser (DEPC).....	16
1.8.2 10x Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS-Puffer)	17
1.8.3 10× Lade-Puffer.....	17
1.8.4 50× Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE-Puffer).....	17
1.9 Kits	18
1.10 Chemikalien	18
1.11 Geräte und Sonstiges	19
1.12 Software	19
<i>Methoden</i>	21
1.13 Präparation des Fischgewebes	21
1.14 Molekularbiologische Methoden	21
1.14.1 RNA-Extraktion.....	21
1.14.2 DNase-Verdau	22
1.14.3 RNA-Fällung.....	22
1.14.4 Messung der RNA Konzentration	22
1.14.5 Reverse Transkription	23
1.14.6 Genomische DNA-Extraktion	23
1.14.7 PCR	23
1.14.8 High-Discrimination-PCR (Hidi-PCR).....	25
1.14.9 Quantitative PCR.....	26
1.14.10 Agarose-Gelelektrophorese	27
1.15 Analyse der <i>xmrk</i> -Expression	27
1.16 Sequenzierung	28
1.17 Erstellung des Xiphophorus spezifischen TE-Expressionsprofils	28
1.18 RNA-Seq Verifikation und qPCR	29
1.19 Die Xiphophorus Phänokopie des <i>Lof1/Lof2</i> Mutanten	29
<i>Ergebnisse</i>	30
1.20 Expressionsbestimmung von <i>xmrk</i>	30
1.21 Auswertung des RNA-Expressionsprofils.....	31

1.22	Experimentelle Verifikation der TE- Sequenzierdaten.....	37
1.22.1	Expressionsanalyse von Xma_rnd-5_family-531_DNA/hAT-Charlie	38
1.22.2	Expressionsanalyse von Gaf_rnd-5_family-1020_Unknown.....	40
1.22.3	Expressionsanalyse von Oni_rnd-6_family-283_DNA/hAT	42
1.22.4	Expressionsanalyse von Cse_Pilar_54.65_DNA/hAT.....	43
1.23	Untersuchung der Lof1/Lof2 Phänokopie	46
	<i>Diskussion</i>	51
	<i>Zusammenfassung</i>	61
	<i>Abstract</i>	63
	<i>Danksagung</i>	65
	<i>Literaturverzeichnis</i>	66
	<i>Lebenslauf</i>	73
	<i>Eidesstaatliche Erklärung</i>	74

Einleitung

1.1 Grundlagen der Tumorgenese

Bösartige Tumorerkrankungen stellen nach Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. Allein im Jahre 2019 starben über 230000 Menschen an den Folgen maligner Gewebeneubildungen (*Causes of death - Statistisches Bundesamt, 2019*). In Anbetracht dieser Zahlen unternimmt die interdisziplinäre Wissenschaft fortwährend große Anstrengungen in die weitere Erforschung der Tumorgenese. Der Begriff „Tumor“ entstammt dabei dem lateinischen und kann mit Wucherung, Geschwulst oder Schwellung übersetzt werden, während „Genese“ auf altgriechisch „genesis“ zurückgeht und Geburt, Entwicklung oder das Werden einer Entität bedeutet. Die Zusammenführung der beiden Begriffe bezeichnet also die Bedingungen der Entartung von gesundem Gewebe in maligne Tumore. Diesem Vorgang liegen genetische Mutationen zugrunde, die das molekulare Gleichgewicht gesunder Zellen zugunsten der Proliferation verschieben und ihre Transformation in Tumorzellen bewirken (Foulds, 1954; Hanahan & Weinberg, 2000; Nowell, 1976). Bis heute sind eine Vielzahl von Mutationen und Genen identifiziert worden, die in der Tumorgenese involviert sind. Nicht allen kann dabei der gleiche Stellenwert zugesprochen werden. So bilden die sogenannten „Driver-Mutationen“ den Antrieb der Tumorentwicklung. Es handelt sich in 95% dieser genetischen Veränderungen um Punktmutationen in Genen, deren Produkte die Zellproliferation unmittelbar steuern und deren Alteration der betroffenen Zelle einen selektiven Wachstumsvorteil verschafft (Vogelstein et al., 2013). Sie werden via Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Von diesen Mutationen können die weit öfter auftretenden „Passenger-Mutationen“ unterschieden werden. Sie besitzen keinen direkten Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen, treten mehr oder weniger zufällig auf und entstehen bei den von den Driver-Mutationen angeregten multiplen Zellteilungen (Stratton et al., 2009). Ähnlich wie diese zwei Mutationsgruppen können zwei Genklassen unterschieden werden, denen eine Schlüsselrolle in der Tumorentstehung zugewiesen werden kann: Onkogene und Tumorsuppressorgene. Onkogene entwickeln sich durch Mutationen aus sogenannten Protoonkogenen, welche ubiquitär in den gesunden Zellen eines Organismus

zu finden sind. Ihre Produkte erfüllen eine unmittelbare Rolle in der physiologischen Zellteilung. Sie kodieren unter anderem für Tyrosinkinasen, Wachstumsfaktoren und Regulationsproteine (Stowers et al., 1987). Eine für ein Onkogen charakteristische Mutation kann in Form von Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen in der Promoterregion des Protoonkogens geschehen und führt zu einer konstitutiven Aktivierung oder Überexpression des Genprodukts (Spandidos, 1985). Tumorsuppressorgene hingegen sind maßgeblich für die Wachstumsinhibierung einer Zelle verantwortlich. Ihre Deaktivierung durch Mutationen können genau wie eine onkogene Aktivierung eines Protoonkogens, den ersten Schritt der Tumorgenese darstellen (Weinberg, 1991).

1.2 Malignes Melanom

Das maligne Melanom, auch bekannt als bösartiger schwarzer Hautkrebs, ist für 60% der Hautkrebstode verantwortlich und somit der tödlichste aller bekannten Hautkrebsformen (Hawryluk & Tsao, 2014). In den letzten Jahrzehnten sind insbesondere in der weißen Bevölkerung sowohl Inzidenz als auch Prävalenz besorgniserregend schnell und geschlechterübergreifend gestiegen (Böni et al., 2002). Die Erkrankung findet ihren Ursprung in den menschlichen Pigmentzellen, die hauptsächlich im Stratum basale der Epidermis vorkommen und für die Synthese des körpereigenen Stoffes Melanin verantwortlich sind (Cichorek et al., 2013). Melanin wird in Melanosomen gebildet und über dendritische Zellfortsätze an Keratinozyten in Haut und Haaren weitergegeben (Jung, 2007; Raposo & Marks, 2009). Die karzinogene Entgleisung der Pigmentzellen lässt sich auf etwaige genetische Mutationen in verschiedenen Genen zurückführen (Hodis et al., 2012). Erblich bedingte Predispositionen wie Pigmentierung, Familienhistorie, Nävi Anzahl oder Umweltfaktoren können die Pathogenese zudem beeinflussen (Böni et al., 2002). Dabei wird angenommen, dass UV-Strahlung den wichtigsten Umwelt- und Risikofaktor der Melanomenese darstellt. Eine exzessive Exposition kann, besonders in der Kindes- und Jugendzeit, zu schwerwiegenden DNA-Schäden führen und somit Mutationen induzieren (Anna et al. 2007). Insbesondere rothaarige und hellhäutige Menschen stellen bei erhöhter Exposition eine außergewöhnliche Risikogruppe dar (Hawryluk & Tsao, 2014). Trotz der weitreichenden

Erkenntnisse, die man über Jahre gewonnen hat, steht das maligne Melanom noch immer im Fokus der dermatologischen Krebsforschung. Die Identifikation von Driver-Mutationen oder der Nachvollzug einzelner zellulärer Transformationsschritte bedürfen unter anderem experimenteller Forschung. Tiermodelle wie das *Xiphophorus*-Melanom-System, welches sich durch die einfach reproduzierbare Erzeugung melanozytärer Läsionen sowie einem klar definierten genetischen Hintergrund auszeichnet, eignen sich hervorragend zur Erforschung des bösartigen schwarzen Hautkrebses (M. Schartl et al., 2013; M. Schartl & Walter, 2016).

1.3 *Xiphophorus*-Melanom-System

Bis heute sind 26 *Xiphophorus* Arten beschrieben worden, die zu der Familie der lebendgebärenden Zahnkarpfen (lat. Poeciliidae) gehören und überwiegend in den Fluss- und Seequellgebieten Zentralamerikas beheimatet sind (Kallman & Kazianis, 2006). *Xiphophorus* gehört zu der Tiermodellgruppe der „Evolutionary mutant models“ (Albertson et al., 2009; M. Schartl, 2014; M. Schartl & Walter, 2016), welche der Gruppe der transgenen Tiermodelle gegenüber gestellt wird. Beide Modellgruppen werden seit Jahrzehnten in der Krebsforschung genutzt. Bei gentechnisch veränderten Modellen werden Gene gezielt manipuliert, um neue Genprodukte oder veränderte Genexpression zu erreichen (Hermey et al., 2010). Evolutionary mutant models weisen hingegen natürlich entwickelte Krankheitsgene auf, deren Existenz keiner transgen herbeigefügten Veränderung bedarf (Albertson et al., 2010; M. Schartl & Walter, 2016). Die Gene befinden sich in ihrem unveränderten genetischen Umfeld, was die Aufstellung modellhafter Grundsätze der Tumorbildung in eben dieser Umgebung ermöglicht (Schwab et al., 1979). Universell bestehende genetische Gesetzmäßigkeiten sowie allgemein anerkannte Analogien im Prozess der Neoplasie erlauben die Übertragung der Erkenntnisse auf den menschlichen Organismus.

Die Basis der tumorösen Veränderung bei *Xiphophorus* bildet ein spezieller, manchen Populationen des *Xiphophorus maculatus* eigener Pigmentzelltyp, dessen Ausbildung auf bestimmte genetische Konstellationen zurückzuführen ist (Weissenfels et al., 1970). Bei diesen sogenannten Makromelanophoren handelt es sich um multinukleäre, terminal

differenzierte Zellen, deren Zytoplasma fast ausschließlich mit reifen Melanosomen bestückt ist. Sie besitzen eine dendritische Form, einen Durchmesser von bis zu 1000 µm und weisen ein stark überlappendes Wachstum auf, welches sie als schwarze Stellen auf der Haut der Fische erkennbar macht (F. Anders et al., 1984). Sie werden anhand ihrer Lokalisation auf dem Körper der Fische charakterisiert und in fünf Pigmentierungsmuster unterschieden: „Sp“ (spotted oder spot sided), „Sd“ (spottet dorsal), „Sr“ (stripe sided), „N“ (Nigra), also komplett schwarz und „Sb“ (black bottom oder spotted belly) (Kallman, 1975; Ozato & Wakamatsu, 1983). In Ergänzung zu den oben genannten Charakteristika weisen sie eine Spezies abhängige Variabilität auf (A. Gordon, 1957). Den zweiten *Xiphophorus* Melanozytentyp bilden die ubiquitär auf der Haut der Fische vorkommenden Mikromelanophoren. Diese Zellen erreichen einen Durchmesser von 30-100 µm und sorgen durch ihre weit weniger intensive Pigmentierung für eine gräuliche Färbung der Haut der Fische (Weis & Scharl, 1998). Im Gegensatz zu den Makromelanophoren folgen sie dem allgemeinen Prinzip der Zellkontakthemmung (F. Anders et al., 1984). Ab einer gewissen Zelldichte wird somit das Zellwachstum und die Zellteilung eingestellt.

In dem etablierten Tiermodell *Xiphophorus* wird eine Malignisierung des Phänotyps durch bestimmte Kreuzungsverfahren zwischen dem *Xiphophorus maculatus* (Platyfisch) und dem *Xiphophorus hellerii* (Schwertträger) erreicht. In dem gängigen Kreuzungsschema nach Anders et al. (Fritz Anders, 1991; M. Gordon, 1927; Kosswig, 1928) wird ein *Xiphophorus maculatus* Weibchen, welches das Pigmentierungsmuster Sd aufweist, mit einem Männchen der Spezies *X. hellerii* gekreuzt (Abbildung 1). Die daraus resultierenden F1-Hybrid Weibchen zeigen das mütterliche Pigmentierungsmuster in verstärkter Form und entwickeln benigne Läsionen (Vielkind et al., 1977). Im weiteren Verlauf wird der F1-Hybrid mit einem parentalen *X. hellerii* rückgekreuzt. Die entstehende BC₁-Generation spaltet sich wie folgt auf: 50% der Tiere weisen keinerlei melanozytärer Läsionen auf, 25% der Fische besitzen den gleichen Phänotyp wie das F1-Hybrid Weibchen und 25% entwickeln eine tiefschwarze Pigmentierung, die sich von der Rückenflosse bis hin zur Schwanzspitze erstreckt und alle Charakteristika eines malignen Melanoms erfüllt (M. Gordon, 1927; Häussler, 1928; Kosswig, 1928).

Gordon-Kosswig-Anders-Kreuzungsschema zur Entstehung eines malignen Melanoms

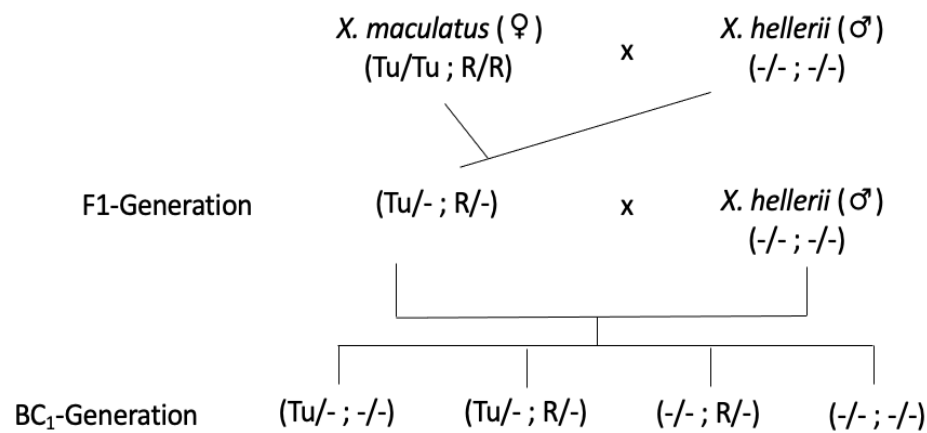


Abbildung 1: Gordon-Kosswig-Anders-Kreuzungsschema zur Entstehung eines malignen Melanoms im *Xiphophorus* Tiermodell. Durch die gezielte Kreuzung eines *X. maculatus* Weibchen mit je zwei Allelen des Tumorlokus (Tu) und des Regulationslokus (R) mit einem *X. hellerii* Männchen ohne einen der beiden Loci kommt es in der F1-Generation zu einem Hybrid mit benignen Läsionen (Genotyp: Tu/-; R/-). Die Rückkreuzung des F1-Hybrids mit einem *X. hellerii* Männchen führt in 25% der BC₁-Generation zur Entwicklung eines malignen Melanoms (Genotyp: Tu/-; -/-).

Ursache der malignen Melanomgenese in 25% der BC₁-Hybride ist ein chromosomaler Tumorlokus (Tu-Lokus), der durch *X. maculatus* vererbt wird. Der Tumorlokus wirkt kanzerogen, sofern er nicht von einem autosomalen Regulationslokus (R-Lokus) supprimiert wird (A. Anders et al., 1973; Breider, 1952). Die parentalen *X. hellerii* besitzen keinen der beiden Loci, wohingegen *X. maculatus* zwei Kopien beider aufweist. Aus dem Kreuzungsexperiment wird deutlich, dass die Rückkreuzung des F1-Hybrid die komplette Eliminierung des R-Lokus bei 25% der BC₁-Generation zur Folge hat. Vergleicht man die entstandenen Pigmentierungsmuster der BC₁-Hybride, so lässt sich die Pigmentierung durch die Präsenz der jeweiligen Loci ableiten. Hybride ohne Regulationslokus aber mit Tumorlokus entwickeln ein malignes Melanom. Fische der gleichen Generation, die je eine Kopie beider Loci aufweisen, zeigen nur eine verstärkte Pigmentierung, welche als benigne Läsion charakterisiert werden kann (Vielkind et al., 1977). Somit wird deutlich, dass durch die wiederholte Kreuzung eine sukzessive Eliminierung des Regulationslokus erreicht wird und es dadurch zu einer Malignisierung des Gewebes kommt.

Durch positionelle Klonierung gelang es, das Onkogen *xmrk* (*Xiphophorus*-Melanom-Rezeptor-Kinase; *ONC-xmrk*) in der Schlüsselregion des Tumorlokus zu identifizieren (Wittbrodt et al., 1989). *Xmrk* kodiert für eine Rezeptortyrosinkinase aus der Familie der EGF-Rezeptoren. Es existieren zwei Versionen dieses Gens auf dem X-Chromosom der Fische. *INV-xmrk* ist ubiquitär in den Zellen der Fische auffindbar und auf niedrigem Niveau exprimiert. Es stellt das Protoonkogen für die onkogen wirkende Version, *ONC-xmrk*, dar. *ONC-xmrk* ist ausschließlich in tumorösem Gewebe exprimiert und die Rate der Expression korreliert mit dem Grad der Malignisierung (A. Scharl et al., 1994). Die Entwicklung *ONC-xmrk's* lässt sich auf eine Duplikation des Protoonkogens zurückführen. Das Duplikat erhielt eine neue 5' Promoterregion und ist fortan unter die transkriptionelle Kontrolle des sogenannten Donorlokus gestellt (Förnzler et al., 1996; Volff et al., 2003). Die onkogene Wirkung *ONC-xmrk's* konnte durch den molekularen Vergleich von Protoonkogen und Onkogen nachvollzogen werden. In der extrazellulären Domäne von *ONC-xmrk* konnten zwei Mutationen nachgewiesen werden, die für eine onkogene Aktivierung des Rezeptors verantwortlich sind (Gómez et al., 2001). Bei den Mutationen handelt es sich um einen Austausch von Glycin zu Arginin in der dritten Subdomäne und um eine Substitution eines konservierten Cysteins einer intramolekularen Disulfidbrücke (Gómez et al., 2001). Beide Mutationen führen zu einer konstitutiven Dimerbildung, was die Tyrosinkinase in einen permanent aktivierten Zustand versetzt.

Der Beweis, dass es sich bei *ONC-xmrk* tatsächlich um das Kandidatengen des Tumorlokus handelt, konnte mit Hilfe genetischer Analysen zweier loss-of-function *Xiphophorus* Mutanten (lof 1-Mutante, lof 2-Mutante) erbracht werden. Beide Mutanten entwickelten trotz eines malignen Genotyps kein malignes Melanom (M. Scharl et al., 1999). Im Genom des lof 1-Mutanten bewirkte die Transposition eines Transposons eine ~7 kb Insertion in dem vierundzwanzigsten *xmrk*-Exon, was die strukturelle Veränderung eines Rezeptors zur Folge hatte. Durch das Fehlen der carboxyterminalen Domäne entfielen wichtige Bindungsstellen einiger Substratproteine. Als Konsequenz verlor der Rezeptor seine Signalfähigkeit, was eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit der transformierten Pigmentzellen bewirkte (M. Scharl et al., 1999; Wellbrock et al., 1999; Wellbrock & Scharl, 1999). Im Falle des lof-2 Mutanten hatte eine Transposon-

Transposition eine vollständige Deletion von *xmrk* zur Folge. In beiden Fällen war also ein eukaryotisches Transposon für den gesunden Phänotyp der Mutanten verantwortlich.

1.4 Eukaryotische Transposons

Transposable Elemente, auch Transposons (TEs) genannt, sind unterschiedlich lange Nukleotidsequenzen, die zu der Familie der repetitiven DNA-Elemente gezählt werden können. Zuerst wurden sie von Barbara McClintock anhand des Mais-Modells beschrieben (McClintock, 1950) und konnten seitdem in nahezu allen Genomen eukaryotischer Lebewesen entdeckt werden. Ihr Name begründet sich durch ihre Fähigkeit, ihre genomische Position verändern zu können, wodurch sie eine bedeutsame Rolle in der evolutionär bedingten Genomveränderung und genetischen Plastizität von Lebewesen einnehmen (Beauregard et al., 2008; Wicker et al., 2007). Klassifiziert werden sie anhand ihres Transpositionsmechanismus und ihrer molekularen Struktur in zwei Klassen (Finnegan, 1989). Die Transposition der Klasse 1 Transposons, auch Retrotransposons oder RNA-Transposons genannt, ähnelt einem „copy-and-paste“ Mechanismus und geschieht via eines RNA-Mediaten (Mita & Boeke, 2016). Zu Beginn wird ihre DNA-Sequenz transkribiert und die resultierende RNA durch eine reverse Transkriptase in cDNA rückumgeschrieben. Anschließend wird die Sequenz durch eine Integrase an einer anderen genomischen Position reinseriert (Finnegan, 1989; Wicker et al., 2007) (Abbildung 2). Strukturell unterscheidet man zwei Subklassen: Long-terminal-repeat (LTR) enthaltende und LTR nicht-enthaltende Retrotransposons. Dabei handelt es sich bei LTRs um terminale Wiederholungssequenzen, die die Retrotransposons an beiden Enden flankieren. Sie beinhalten Polyadenylierungssignal-, Promoter-, und Enhancersequenzen, wodurch sie über Gen-regulierende Fähigkeiten verfügen (Medstrand et al., 2001). Zu den LTR nicht-enthaltenden Transposons gehören unter anderem die „long-interspersed nuclear elements“ (LINEs), „short-interspersed nuclear elements“ (SINEs) und „Penelope“ Transposons (Wicker et al., 2007). Die Sequenzen der Klasse 2 Transposons, auch DNA-Transposons genannt, weisen keine LTRs auf. Stattdessen besitzen die meisten Subfamilien der DNA-Transposons, 9 bis 40 Basenpaar lange invertierte Wiederholungseinheiten (eng. terminal inverted repeats), die ihre DNA-Sequenzen flankieren (TIRs) (Wicker et al., 2007). Ihr Transpositionsmechanismus

ähnelt einem „cut-and-paste“ Mechanismus (Mita & Boeke, 2016), der maßgeblich durch das von ihnen kodierte Enzym, der sogenannten Transposase, ausgeführt wird. Diese erkennt die TIRs an beiden Enden der Transposonsequenz und schneidet sie heraus, bevor die gleiche Sequenz an einer anderen Position reinseriert wird. Manche Transposasen erkennen und binden an spezifische DNA-Zielsequenzen, um die herausgeschnittene Sequenz gezielt dort zu inserieren. Andere katalysieren unspezifische Transpositionen. Auch innerhalb dieser Transposon Klasse unterscheidet man aufgrund struktureller Ungleichheiten verschiedene Subfamilien: Tc1/mariner, hAT, Merlin oder P Transposons.

TE-Transpositionsmechanismen

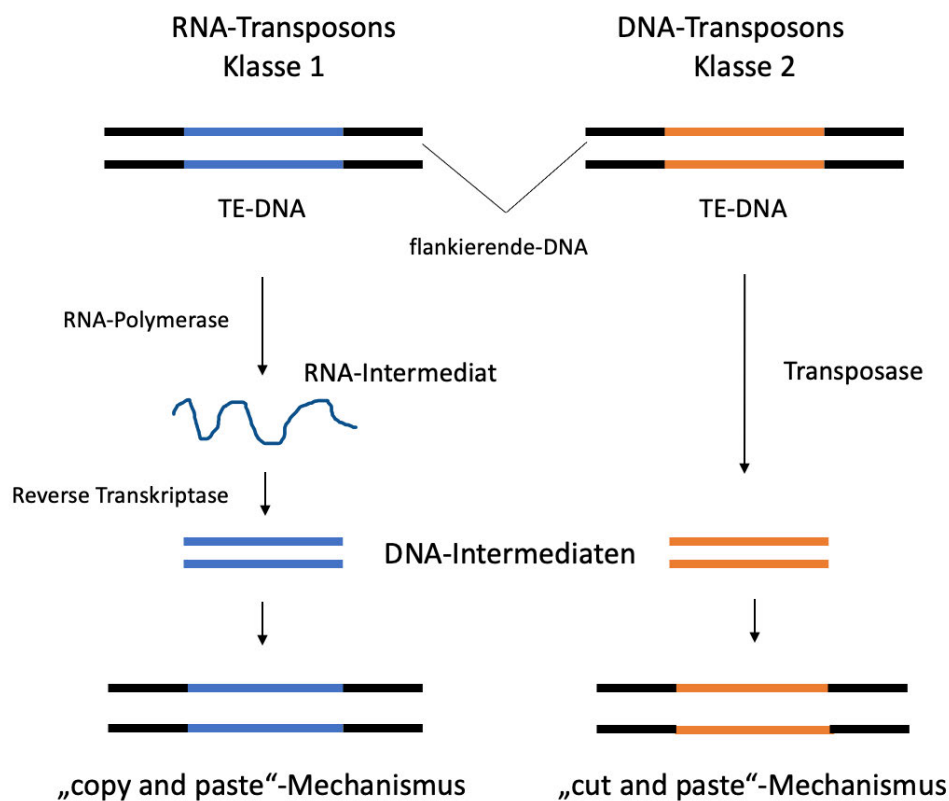


Abbildung 2: Der Transpositionsmechanismus der RNA-Transposons (Klasse 1) und DNA-Transposons (Klasse 2). Die meisten DNA-Transposons transponieren via eines „cut-and-paste“ Mechanismus. Sie kodieren das Enzym Transposase. Dieses erkennt terminale Wiederholungseinheiten an beiden Seiten der TE-Sequenz und schneidet die Sequenz heraus, bevor sie an einer anderen genomischen Position reinseriert wird. Retrotransposons transponieren durch

einen RNA-Mediaten. Anfangs wird ihre DNA-Sequenz transkribiert und durch eine reverse Transkriptase in cDNA rückumgeschrieben. Schlussendlich wird ihre Sequenz durch eine Integrase an einer anderen genomischen Position rückerneuert. Dieser Mechanismus ähnelt einem „copy-and-paste“ Mechanismus.

In beiden Transposon Klassen unterscheidet man autonome von nicht autonomen Transposons. Autonome Vertreter besitzen Gene und somit eine Kodierungsfähigkeit für Enzyme, die unmittelbar an ihrer Transposition beteiligt sind. Nicht autonome TEs haben diese Kodierungsfähigkeit verloren. Sie entstehen meist aus internen Deletionen ihrer autonomen Klassenmitglieder. Ihre Transposition wird im Wesentlichen durch die Genprodukte der vollständigen Transposons ihrer Familie ermöglicht (Kidwell, 2002). Am Ende der Transposition werden am Ort der genomischen Reinsertion beide DNA-Einzelstränge versetzt voneinander geschnitten. Nach der Insertion der Sequenz werden diese Lücken durch zelleigene Reparaturenzyme aufgefüllt. Dadurch entstehen DNA-Zielsequenzduplikationen, sog. direkte Wiederholungseinheiten (engl. target site duplications), welche spezifische Transposon Merkmale darstellen. Teile dieser Wiederholungseinheiten werden nach stattgefundener Transposition zurückgelassen und können somit zur Identifikation aktiv transponierender TEs genutzt werden (Mills et al., 2007; Munoz-Lopez & Garcia-Perez, 2010; Plasterk, 1991). Im menschlichen Genom machen TEs etwa 40-45% aus, wobei weniger als 0.05% aktiv transponieren (Mills et al., 2007; SanMiguel et al., 1996). Sie nehmen dabei keine Rücksicht auf durch ihre Transposition ausgelöste potenziell schädigende Prozesse innerhalb ihres Wirtsgenoms und werden aus diesem Grund auch „selfish-DNA-Sequences“ genannt (Hua-Van et al., 2005; Orgel & Crick, 1980). Ihre Transposition kann Insertionen, Deletionen, Translokationen oder Duplikationen an ihrer Reintegrationsstelle zur Konsequenz haben und somit genetische Krankheiten verursachen. Eine mutagene Wirkung konnte unter anderem auf eine direkte Disruption von Exons (Beck et al., 2011; Kazazian et al., 1988; M. Schartl et al., 1999), auf Exon-skipping durch Transpositionen in Intronssequenzen (Beck et al., 2011; Belancio et al., 2008) und auf die Endonuklease Aktivität mancher Transposons zurückgeführt werden (Bourque et al., 2018; Hedges & Deininger, 2007). Um den genannten Schäden zu entgehen und der genomischen Ausbreitung der Transposons entgegenzuwirken, entwickelten Wirtszellen verschiedene Mechanismen zur Suppression der Transposon Expression. So konnte DNA-Methylierung (Hirochika

et al., 2000) sowie spezielle Protein vermittelte Inhibitions-Mechanismen (Schumann, 2007) beschrieben werden. Allerdings bewirken TEs nicht nur mutagene Veränderungen. Innerhalb der letzten Jahre konnten prä-, und posttranskriptionelle Mechanismen ausgemacht werden, durch welche Transposons Genexpression steuern können (Chuong et al., 2017; Cohen et al., 2009; Cédric Feschotte, 2008). Dies sind Erkenntnisse, die die Frage nach der Gesamtheit ihrer genomischen Funktion aufwerfen. Handelt es sich bei dieser regulatorischen Einflussnahme um einzelne Transposons, die den protektiven Schutzmaßnahmen der Wirtszelle entkommen sind, oder besitzen TEs eine allgegenwärtige regulatorische Aktivität? Vermutungen wurden geäußert, dass Transposons die Pathogenese menschlicher Erkrankungen stärker beeinflussen könnten als bisher angenommen (Saleh et al., 2019).

1.5 Zielsetzung

Trotz weitreichender Erkenntnisse in den letzten Jahren befinden sich Transposons noch immer im Fokus aktueller Wissenschaft. Unter anderem ist experimentelle Forschung unabdingbar, um weiterhin offenen Fragen nachzugehen. Die vorliegende Arbeit soll hierzu einen Beitrag leisten. Sie beschäftigt sich mit der Rolle transposabler Elemente in der Genese des malignen Melanom von *Xiphophorus*. Das Forschungsvorhaben gliedert sich in drei Abschnitte:

Der erste Teil beschäftigt sich mit der Analyse eines im Vorfeld erstellten RNA-Expressionsprofils, aus welchem eine Vielzahl von Transposonsequenzen hervorgehen, die eine Herunter-, beziehungsweise Hochregulierung in maligne verändertem *Xiphophorus* Gewebe aufzeigt. Unter anderem soll an Ergebnisse einer Studie angeknüpft werden, die in verschiedenen menschlichen Tumortypen im Vergleich zu korrespondierendem gesundem Gewebe eine erhöhte TE-Expression nachweisen konnte (Kong et al., 2019). Es wird erstmalig geprüft, ob sich auch in dem *Xiphophorus*-Melanom-System ein solcher Nachweis finden lässt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit findet die experimentelle Verifikation der aus dem Expressionsprofil ersichtlichen Expressionsdaten statt. Die Regulation sowie die Expressionsstärke von vier exprimierten TEs wird via qPCR untersucht. Zudem wird die Expression dieser TEs in verschiedenen nicht-tumorösen *Xiphophorus* Gewebetypen analysiert.

Der letzte Teil setzt sich mit dem potenziell Gen-disruptierenden Einfluss transposabler Elemente auseinander. Die Untersuchung einer *Xiphophorus* Mutante (Lof1/Lof2 Phänokopie), die trotz malignen Genotyps (Tu^{-/-}, -/-) kein malignes Melanom entwickelte, wird durchgeführt. Es soll der Frage nachgegangen werden, ob die Transposition eines TEs für den gesunden Phänotyp der *Xiphophorus* Mutante verantwortlich gemacht werden kann.

Material

1.6 Fische

Alle in der vorliegenden Arbeit für die qPCR-Experimente verwendeten Fische wurden in dem Aquarium des Biozentrums der Julius-Maximilians-Universität Würzburg gekreuzt und unter Standardbedingungen gehalten (Kallman, 1975; M. Scharl et al., 1999). In den folgenden Tabellen sind die Fischlinien, das entnommene Gewebe, die Anzahl der verwendeten Fische und ihr Genotyp sowie die Fischstämme festgehalten. Für die Kapitel 1.17 und 1.21 wurden im Rahmen dieser Arbeit keine neuen Tiere verwendet. Es wurde ein vorhandener Datensatz analysiert.

Tabelle 1: Tumorfischlinie, entnommenes Gewebe und Anzahl der verwendeten Fische

Tumorfischlinie	Entnommenes Gewebe	Fischanzahl
<i>WLC 407 Sd/X.h. III BCn × X.h. III</i>	Hirn, Leber, Kieme, Auge, Tumor	9
<i>1844 Sd/X.h. III anders</i>	Hirn, Leber, Kieme, Auge, Tumor,	10

Tabelle 2: Kontrollfischlinie, entnommenes Gewebe und Anzahl der verwendeten Fische

Kontrollfischlinie	Entnommenes Gewebe	Fischanzahl
<i>407 Sd/X.h.III ohne Sd x X.h. III 6608</i>	Hirn, Leber, Kieme, Auge, Haut	10

Tabelle 3: Fischlinie der Fische mit prämaligen (benigen) Läsionen, entnommenes Gewebe und Anzahl der verwendeten Fische

Fischlinie der Fische mit benignen Läsionen	Entnommenes Gewebe	Fischanzahl
<i>6362 X.h.III/ mac J.p. 163A/h.F.0.I/ 8 × X.h.III BC6</i>	Hirn, Leber, Kieme, Auge, Tumor, Haut	1
<i>6312 X.h.III/ mac J.p. 163A/h.F.0.I/ 8 × X.h.III BC6</i>	Hirn, Leber, Kieme, Auge, Tumor, Haut	1

6113	<i>X.h.III/ mac J.p.</i>	Hirn, Leber, Kieme, Auge, Tumor,	1
163A/h.F.0.I/ 8 × X.h.III BC5		Haut	
6494	<i>X.h.III/ mac J.p.</i>	Hirn, Leber, Kieme, Auge, Tumor,	1
163A/h.F.0.I/ 8 × X.h.III BC6		Haut	
6363	<i>X.h.III/ mac J.p.</i>	Hirn, Leber, Kieme, Auge, Tumor,	1
163A/h.F.0.I/ 8 × X.h.III BC6		Haut	

Tabelle 4: Genotypen der verwendeten *Xiphophorus* Fische

Untersuchte <i>Xiphophorus</i> Fische	Genotyp
407 Tumorfische	Tu/- ; -/-
1844 Tumorfische	Tu/- ; -/-
Fische mit benignen Läsionen	Tu/- ; R/-
407 Kontrollfische	-/- ; -/-

Fischstämme:

- *WLC 407 Sd/X.h. III BCn × X.h. III*: Rückkreuzungshybride von *X. maculatus* (WLC 1274) und *X. hellerii* (WLC 1337). Aus der wiederholten Kreuzung der Makromelanophoren-Lokus ($mdl^{Sd-xmrk^B}$) tragenden *X. maculatus* Fische mit *X. hellerii*, entstand eine isogene Linie der *X. hellerii* (WLC 1337), die eine Kopie der $mdl^{Sd-xmrk^B}$ Region von dem X-Chromosom der *X. maculatus* aufweist. Bei 50% der weiteren Rückkreuzungsgeneration kommt es zur selbständigen Entwicklung von Melanomen.
- *1844 Sd/X.h. III anders*: Der 1844 Tumorfischstamm unterscheidet sich von dem WLC 407 Tumorfischstamm durch eine spontane Translokation des Onkogen *xmrk* von dem X-Chromosom auf ein Autosom der Fische.
- *X.h.III/ mac J.p. 163A/h.F.0.I/ 8 × X.h.III BC5 und BC6*: Die fünfte und sechste Generation von Rückkreuzungshybriden wurde in einer unabhängigen Serie aufeinanderfolgender Kreuzungen aus F1-Hybriden erzeugt, die aus der vorgeschalteten Kreuzung eines männlichen *X. maculatus* JP 163A mit einem Weibchen *X. hellerii* (*Lancetilla*) entstanden. Die F1-Hybridweibchen, die keine Tumore aufwiesen wurden mit *X. hellerii*-Männchen rückgekreuzt. Für jede

Rückkreuzungsgeneration wurden Fische verwendet, die eine verstärkte Pigmentierung (z.B. F1-Phänotyp) aber keine Melanomtumore aufwiesen.

- *407 Sd/X.h.III ohne Sd x X.h. III 6608*: Rückkreuzungshybride von *X. maculatus* und *X. hellerii* ohne Expression des Sd-Allels von *Tu*. Diese Fische zeigen einen gesunden Phänotyp.
- *Lof Phänokopie* (Fischlinie 407 ohne Sd 6608): Loss-of-function Mutante des *mdl^{Sd}-ONC-xmrk* X-Chromosom, isoliert von P. Weber, Würzburg. Der Phänotyp ist identisch mit dem der von Prof. Schartl beschriebenen Lof 1 und Lof 2 Mutanten (M. Schartl et al., 1999).

1.7 Primer

Alle verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Open-Source-Programms Primer 3 Web ([http://primer3.ut.ee/#SEQUENCE TEMPLATE INPUT](http://primer3.ut.ee/#SEQUENCE_TEMPLATE_INPUT)) entworfen (Koressaar & Remm, 2007; Untergasser et al., 2012) und von Sigma Aldrich Chemie GmbH synthetisiert.

Tabelle 5: Sequenzen, Produktgröße und Annealingtemperatur der verwendeten Primer

Gen/ Transposon	Sequenz Primer Forward (5'-3')	Sequenz Primer Reverse (5'-3')	Produkt- größe	Annealing- temperatur
<i>elfα 1</i>	AGTGAAATCCGTG GAGATGC	ATCTGACCTGGGT GGTTCAG	195 bp	60°C
<i>xmrk</i>	ACGCATCTGGAAA ATGAACA	AGCGCCAGGATT AAAACAT	147 bp	60°C
Gaf_rnd- 5_family- 1020_Unk nown	ACATGCTGAGAGT GAAAATCCT	CAAACAGGAAGG GCGGGAC	179 bp	59°C

Oni_rnd- 6_family- 283_DNA /hAT	ACTGGGAGGTTGA GTGGAGA	TGTGCCAGACAGA GTAACCA	153 bp	60°C
Xma_rnd- 5_family- 531_DNA /hAT- Charlie	TCAAGTACCCCCT GACACGGGC	CTTCCTGGTGGTC ACCGTCTTCTG	157 bp	60°C
Cse_Piler _54.65_D NA/hAT- Charlie	TCAGTTTGAGTTG GCCGAGT	GGGAAAGGTTTTG CTCGCAG	179 bp	60°C
<i>xmrk</i> - Exon 1	TGACCTGCCGGAC TCTAGTT	GTCAGAGCAGAAC CGATCCC	182 bp	60°C
<i>xmrk</i> - Exon 2	ACTCAGTGGCCAG TAGAGGA	TGACGTAACATGG ACCGGACT	216 bp	60°C
<i>xmrk</i> - Exon 3	TCAGCTCTTCTCT CTGCCTCT	ACATCGTCCAGAA GCTGCTC	258 bp	60°C
<i>xmrk</i> - Exon 4-6	CGGTTTGTTTGCC TCCAACA	TGATCAGTAGCAA CATTCATGGA	595 bp	60°C
<i>xmrk</i> - Exon 7-9	TGTTCCCTCGTTTCT TTGTGCAG	CCCTGGAGATCGG TACCTGA	815 bp	60°C
<i>xmrk</i> - Exon 10- 12	TCCTGCTCTGATG TCTGTGA	CTGAACACACCTG CCATCCA	830 bp	60°C
<i>xmrk</i> -	GTTTTGTTTTGTTT CTTGGTGCA	TGATTCGCTCATG TTTTGCTGT	659 bp	60°C

Exon 13-15				
<i>xmrk</i> - Exon 16-19	TGGTCTCTTTGTTT CCCACCA	GTCCCACCACAGC TCTTGAG	651 bp	60°C
<i>xmrk</i> - Exon 20-22	TTGTGACTCTGCG GGTTTCC	CAGGAAGCAGAG GGTGAAGG	902 bp	60°C
<i>xmrk</i> - Exon 23-25	TGCGGTGTTATTG CTAGGCT	TGTTTCAGGTTGC TGTTTCGG	776 bp	60°C
<i>xmrk</i> - Exon 27	TGGCCATGTTTTA TGTTAACCAG	CCACAGCTTCAGT CGGAGC	675 bp	60°C
<i>xmrk</i> - <i>Sequenz- Exon 1-27</i>	TGACCTGCCGGAC TCTAGTT	CGGACAGGAGTGT ACAGTGC	3763	60°C

1.8 Lösungen, Puffer und Medien

1.8.1 Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser (DEPC)

Tabelle 6: Zusammensetzung von 500 ml DEPC-Wasser:

Reagenz	Menge	Hersteller
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	0,5 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG
MilliQ-Wasser	500 ml	Merck Chemicals GmbH

Nach 12-stündiger Inkubation bei 4°C wurde die Lösung autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

1.8.2 10x Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS-Puffer)

Tabelle 7: Zusammensetzung von 800 ml PBS-Puffer

Reagenz	Menge	Hersteller
Natriumchlorid	80.06 g	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumchlorid	2.24 g	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumdihydrogenphosphat	2.04 g	Carl Roth GmbH + Co. KG
Dinatriumhydrogenphosphat	9.9 g	Carl Roth GmbH + Co. KG

Den Komponenten wurde 800 ml doppelt destilliertes Wasser hinzugegeben und der pH-Wert auf 7.4 eingestellt.

1.8.3 10x Lade-Puffer

Tabelle 8: Zusammensetzung von 5 ml 10x Lade-Puffer

Reagenz	Menge	Hersteller
90 % Formamide	4.5 ml	Merck Chemicals GmbH
5 mmol EDTA	50 µl	Carl Roth GmbH + Co. KG
10% Glycerol	0.5 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG
0.025% Bromphenolblau	62.5 µl	Merck Chemicals GmbH
0.025% Xylene Cyanol FF	62.5 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
0.025% Sodium dodecyl sulfat (SDS)	62.5 µl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

1.8.4 50x Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE-Puffer)

Tabelle 9: Zusammensetzung von 1 Liter 50xTAE-Puffer

Reagenz	Menge	Hersteller
Tris-aminomethan	242 g/l	Carl Roth GmbH + Co. KG
100% Essigsäure	57,1 ml/l	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethylendiamintetraessigsäure 0,5 M (0,5 M EDTA)	100 ml/l	Carl Roth GmbH + Co. KG

Den Komponenten wurde doppelt destilliertes Wasser hinzugegeben und der pH-Wert auf 8.0 eingestellt.

1.9 Kits

Tabelle 10: Verwendete Kits

Name	Hersteller
RevertAid-First-Strand-cDNA-Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific
GenElute-Gel-Extraction Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

1.10 Chemikalien

Tabelle 11: Name und Hersteller der benutzten Chemikalien

Name	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TRIzol® Reagenz	Thermo Fisher Scientific
Phenol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH + Co. KG
100% Ethanol	Thermo Fisher Scientific
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG
SyberGreen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dimethylsulfoxid (DSMO)	Carl Roth GmbH + Co. KG
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

1.11 Geräte und Sonstiges

Tabelle 12: Verwendete Gerätschaften

Name	Hersteller
Zentrifugen	-Thermo Heraeus Biofuge Pico -Centrifuge 5424 R, Eppendorf -Multifuge 1 L-R, Heraeus
Heizblock	Eppendorf Thermomixer 5436
Ultra-Turrax	Ultra-Turrax T100 basic, IKA-Werke GmbH & CO.KG
Gelelektrophorese Schlitten, Kämmen, Kammern	Biozentrum der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Spektralphotometer	NanoDrop ND-1000, PeQLab Biotechnology GmbH
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q Integral, Merck Chemicals GmbH
Vortex Mixer	IKA-Werke GmbH & Co. KG
PCR-Thermozykler	Biometra Tpersonal, Analytik Jena
Gradient PCR-Thermozykler	Biometra Tgradient, Analytik Jena
Quantitative PCR-Thermozykler	Eppendorf Mastercycler EP gradient S
Waage	Ohyo MP300
Feinwaage	Kern & Sohn GmbH
Tiefkühltruhe	-HFC 486 basic, Heraeus -Ultra Low Temperature, New Brunswick Scientific

1.12 Software

Tabelle 13: Verwendete Software

Software	Hersteller / Entwickler
R	Open Source
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, Inc.

MS Office	Microsoft
Inkscape	Open Source

Methoden

1.13 Präparation des Fischgewebes

Die Fische wurden unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Scharl und nach den Richtlinien der Regierung Unterfranken anästhesiert, dekapiert und anschließend sezirt. Gesunde Gewebetypen (Hirn, Leber, Kieme, Auge, Haut) sowie Tumorgewebe (Flosse, Haut) wurden entnommen und direkt eine RNA- oder DNA-Extraktion durchgeführt oder eine Lagerung in flüssigem Stickstoff bzw. auf Trockeneis bei -80°C angeschlossen.

1.14 Molekularbiologische Methoden

1.14.1 RNA-Extraktion

Zur RNA-Extraktion wurden 50-100g des frisch entnommenen oder zuvor gelagerten Gewebes in ein mit 1 ml Trizol vorgelegtes 2 µl Reaktionsgefäß überführt und mit Hilfe eines Gewebehomogenisators (Ultra-Turrax T100 basic, IKA-Werke GmbH & CO.KG) homogenisiert. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, ehe die Proben 10 Minuten bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert wurden. Der klare Überstand wurde nach Beendigung der Zentrifugation in autoklavierte 1,5 µl Reaktionsgefäße überführt und anschließend 0,2 ml Chloroform hinzugegeben, bevor das Reaktionsgefäß für 15 Sekunden kräftig geschüttelt wurde. Der darauffolgenden 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur war eine Zentrifugation über 10 Minuten bei 4°C und 12.000 x g angeschlossen. Die obere der drei entstandenen Phasen wurde abgenommen und in neue autoklavierte Reaktionsgefäße transferiert. Es folgte eine Hinzugabe von 0.5 ml Isopropanol und ein vermehrtes Invertieren der Reaktionsgefäße, ehe die Proben 5-15 Minuten auf Eis inkubiert wurden und anschließend 10 Minuten bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde entfernt, das entstandene RNA-Pellet durch Hinzugabe von 500 µl 75% Ethanol gewaschen und eine 10-minütige Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C angeschlossen. Nach Wiederholung des Waschschrittes wurde das RNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und durch Zugabe von 20 µl DEPC-Wasser von der Wand des Reaktionsgefäßes gelöst.

1.14.2 DNase-Verdau

Zum Verdau der genomischen DNA wurden bis zu 10 µg pro 50 µl RNA in ein autoklaviertes Reaktionsgefäß vorgelegt und 1 µl 10×Reaktionspuffer sowie 1 µl DNase 1 hinzugegeben. Danach wurde das Gesamtvolumen durch Hinzugabe von doppelt destilliertem Wasser auf 10 µl angehoben und eine 30-minütige Inkubation bei 37°C vorgenommen. Durch die Hinzugabe von 1 µl EDTA und der anschließenden Inkubation über 10 Minuten bei 65 °C wurde die Reaktion abgestoppt und eine schlussendliche Lagerung der Proben bei -80°C durchgeführt.

1.14.3 RNA-Fällung

Zur Reinigung der RNA wurde zunächst das Gesamtvolumen der Proben durch Hinzugabe von DEPC Wasser auf 200 µl angehoben, ehe 20 µl Natriumacetat sowie 200 µl absoluter Alkohol hinzugegeben wurden. Anschließend fand eine Inkubation über Nacht bei -80°C statt. Darauf folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g sowie eine Hinzugabe von 500 µl 70% Ethanol und eine 10 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g, bevor der Überstand abgenommen und eine Wiederholung des Waschschrittes vorgenommen wurde. Schließlich folgte die Lösung des RNA-Pellets durch Hinzugabe von 20 µl DEPC Wassers und eine Lagerung der Proben bei -20°C.

1.14.4 Messung der RNA Konzentration

Zur Messung der Konzentration und Reinheit der RNA wurde ein Spektralphotometer (NanoDrop ND-1000, PeQLab Biotechnology GmbH) verwendet und nach Protokoll vorgegangen (Desjardins & Conklin, 2011). Abschließend wurden die Proben entweder in cDNA transkribiert oder bei -80°C gelagert.

1.14.5 Reverse Transkription

Die zur Umschreibung der extrahierten RNA in cDNA benötigten Komponenten wurden dem RevertAid-First-Strand-cDNA-Synthesis Kit von Thermo Scientific™ entnommen und nach Protokoll vorgegangen. Letztlich wurden die Proben bei -20°C gelagert.

1.14.6 Genomische DNA-Extraktion

Zur Extraktion genomischer DNA wurden 20-40 g Gewebe der Fischrückenflosse in mit 300 µl Extraktionspuffer und 10 µl Protease K vorgelegte Reaktionsgefäße überführt. Anschließend folgte eine 3-stündige Inkubation bei 60°C, ehe dem Ansatz 150 µl Phenol hinzugefügt wurde und das Gemisch 10 Minuten unter stetigem Schütteln bei 4°C inkubierte. Der Inkubation war eine Hinzugabe von 150 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) angeschlossen. Im weiteren Verlauf wurde eine Zentrifugation über 10 Minuten bei 12.000 x g und 4°C vorgenommen und die sich gebildete obere Phase des Ansatzes in autoklavierte Reaktionsgefäße überführt. Eine solche Zugabe von 150 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) sowie anschließender Zentrifugation und Abnahme der oberen Phase wurde wiederholt, ehe dem Ansatz 700 µl absoluter Alkohol hinzugegeben wurde und nach mehrfachem Invertieren eine Inkubation über Nacht bei -20°C stattfand. Darauf folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C sowie eine Abnahme des klaren Überstandes und eine Hinzugabe von 500 µl 70% Ethanol sowie eine weitere Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen. Nach einer Wiederholung des Waschschrittes fand letztlich eine Lösung des DNA-Pellets in 40 µl doppelt destilliertem Wasser und die Lagerung der Proben bei -20°C statt.

1.14.7 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine enzymabhängige *in-vitro* Methode zur Amplifikation von DNA-Sequenzen. Zuerst erfolgt der Schritt der Denaturierung. Bei hoher Temperatur werden die Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Einzelsträngen gelöst, damit sich die Primer bei dem anschließenden Schritt der Primerhybridisierung bei niedrigerer Temperatur an die 3' Enden der zwei entstandenen Einzelstränge anlagern

können. Während der darauffolgenden Elongation synthetisiert die DNA-Polymerase von 5' nach 3' die komplementäre DNA-Sequenz. In den folgenden Tabellen sind sowohl das in der vorliegenden Arbeit verwendete 3-Schritt-PCR-Programm als auch der 1x PCR-Ansatz festgehalten.

Tabelle 14: PCR-Programm

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	15 sek	40
Primerhybridisierung	60 °C	30 sek	40
Elongation	72 °C	30 sek	40
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

Tabelle 15: 1× PCR-Ansatz

Komponenten	Menge
10×Reprofast Puffer	2.5 µl
dNTPs (10mM)	0.5 µl
Primer forward (10µM)	0.5 µl
Primer reverse (10µM)	0.5 µl
TaqPolymerase	0.2 µl
Doppelt destilliertes Wasser	15.8 µl
DMSO	1 µl

Für einen Gesamtansatz von 25 µl wurden zusätzlich 4 µl cDNA (50 ng) in jede Probe eingesetzt.

1.14.8 High-Discrimination-PCR (Hidi-PCR)

Die zur Durchführung einer hoch-selektiven PCR benötigte Hidi-DNA-Polymerase wurde dem High-Discrimination-DNA-Polymerase Kit von Genaxxon Bioscience GmbH entnommen und nach Protokoll vorgegangen. Die benötigten Komponenten sowie der 1x Ansatz sind in den folgenden Tabellen festgehalten.

Tabelle 16: 1× Hidi-PCR-Ansatz

Komponenten	Menge
10x Puffer	2.5 µl
dNTPs (10mM)	0.5 µl
Primer forward (10µM)	0.5 µl
Primer reverse (10µM)	0.5 µl
Hidi-DNA-Polymerase	0.25 µl
Doppelt destilliertes Wasser	16.25 µl
MgCl ₂ (25mM)	0.5 µl

Für einen Gesamtansatz von 25 µl wurden zusätzlich 4 µl cDNA (50 ng) in jede Probe eingesetzt.

Tabelle 17: Hidi-PCR-Programm

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	15 sek	40
Primerhybridisierung	62°C	10 sek	40
Elongation	72°C	2.5 min	40
Finale Elongation	72°C	10 min	1

1.14.9 Quantitative PCR

Bei der quantitativen PCR handelt es sich um eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäure, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht. Zudem ermöglicht sie eine Quantifizierung des amplifizierten Produktes durch zyklische Fluoreszenz Messungen in Echtzeit. Der Fluoreszenzfarbstoff SyberGreen (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) lagert sich nach dem Schritt der Elongation in den kleinen Furchen der DNA ein und produziert ein Leuchtsignal, das von dem angeschlossenen Thermozykler (Eppendorf Mastercycler EP Gradient S) erfasst und gemessen wird. Das Fluoreszenzsignal nimmt proportional mit der Menge des vervielfältigten Produktes zu. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete 3-Stufen-PCR-Programm sowie der als Standard verwendete Reaktionsansatz sind in den folgenden Tabellen 18 und 19 festgehalten.

Tabelle 18: 3-Stufen-PCR-Programm

Stufe	Temperatur	Zeit	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	180 sek	1
Denaturierung	95 °C	15 sek	40
Primerhybridisierung	60 °C	30 sek	40
Elongation	72 °C	30 sek	40
Finale Elongation	72°C	10 min	1

Tabelle 19: 1x qPCR-Reaktionsansatz

Komponenten	Menge
Doppelt destilliertes Wasser	15.8 µl
10×ReproFast Puffer	2.5 µl
dNTPs (5 mM)	0.5 µl
Forward Primer (10 ηm/µl)	0.5 µl
Reverse Primer (10 ηm/µl)	0.5 µl
His-Taq (5U/µl)	0.2 µl
DMSO	0.25 µl
SyberGreen	0.75 µl

Für einen Gesamtansatz von 25 µl wurde zusätzlich 4 µl cDNA (50 ng) in jede Probe eingesetzt. Nach Beendigung der Reaktion wurde die relative Expression nach (Schmittgen & Livak, 2008) bestimmt. Als Referenzgen fungierte der Elongationsfaktor $\alpha 1$.

- Bestimmung der ΔCt -Werte:

$$\Delta CT (\text{Zielgen}) = Ct\text{-Wert (Zielgen)} - Ct\text{-Wert (Referenzgen)}$$

1.14.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung elektrisch geladener DNA- oder RNA-Fragmente. Eine Stromquelle erzeugt ein elektrisches Feld, in welchem die Moleküle aufgrund ihres negativ geladenen Phosphat-Rückgrades bei 130 Volt aus angelegten Geltaschen in Richtung Anode wandern. In der vorliegenden Arbeit wurden Agarosegele zwischen 0,8-1,5 % gegossen. Die notwendige Agarosemenge wurde mit doppelt destilliertem Wasser und mit auf 1× verdünntem TAE vermennt und in einer Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde das Gel auf entsprechende Gelschlitten gegeben und nach Erhärtung durch Abkühlung auf Raumtemperatur in eine mit 1×TAE gefüllte Gelkammer eingesetzt. Im Anschluss daran wurden 4 µl der Proben mit der gleichen Menge 2×Ladepuffer versetzt und in die entstandenen Geltaschen geladen. Als Längenstandard dienten Fragmente bekannter Größen des 1kb DNA/RNA-Ladders (Thermo Fisher Scientific), der gemeinsam mit den Proben aufgetragen wurde. Nach 25-minütiger Wanderung der Proben auf dem Agarosegel wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend 1 Minute in Wasser gewaschen. Abschließend wurde die Auftrennung unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und zur Analyse ausgedruckt.

1.15 Analyse der *xmrk*-Expression

Zur Charakterisierung des verwendeten Materials wurde eine qPCR-Analyse der *xmrk*-Expression in malignem Gewebe von 5 Tumorfischen der 407 Fischlinie sowie in gesundem Gewebe von 5 407 Kontrollfischen durchgeführt. Die erhaltenen qPCR-Daten

wurden mittels des Anderson-Darling-Tests auf Normalverteilung überprüft und bei gegebener Normalverteilung die Signifikanz durch den t-Test errechnet (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

1.16 Sequenzierung

Die TE-Expressionsanalyse basierte auf unpublizierten Sequenzierdaten von 36 *Xiphophorus* Hybriden. Die Daten resultierten aus 4 Sequenzierungsrunden durchgeführt mit dem Illumina TruSeq library preparation system (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA).

1.17 Erstellung des *Xiphophorus* spezifischen TE-Expressionsprofils

Readcounts von 3 verschiedenen Sequenzierungsrunden wurden genutzt, um die unterschiedliche Expression der TEs zu errechnen. Dieser Datensatz umfasste 18 maligne und 5 benigne Gewebeproben von 23 *Xiphophorus* Fischen. Die vierte Sequenzierungsrunde beinhaltete Gewebepaare von gesunder Haut und benignem Gewebe von 10 Fischen mit benignem Genotyp (Tu/-; R/-) sowie malignes Gewebe von 3 Fischen mit malignem Genotyp (Tu/-; -/-). Aus den Sequenzierungen resultierten 100 Basen lange Sequenzen die mit Hilfe von Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012) auf eine fischspezifische Transposon-Datenbank (Chalopin et al., 2015) aligniert wurden. Anschließend wurden die den einzelnen Transposons zugeordneten Sequenzstücke (Reads) gezählt. Die Expressionsprofile für gesunde, benigne sowie maligne Proben wurden verglichen und das logarithmierte Verhältnis (Log2FC), der Mittelwert der Gruppenmittelwerte (baseMean) und der p-Wert mit Hilfe des R/Bioconductor DESeq2 (Love et al., 2014) für jedes Transposon berechnet. TEs mit einem baseMean > 10 wurden als exprimiert angesehen. Exprimierte TEs mit einem Log2FC > 1 und einem signifikanten p-Wert (Signifikanzniveau: 0.05) wurden als differentiell exprimiert definiert.

1.18 RNA-Seq Verifikation und qPCR

Um Aussagen über die Reproduzierbarkeit der Expressionsdaten treffen zu können, wurde die aus dem Expressionsprofil ersichtliche Expression und Regulation von vier exprimierten TEs via qPCR verifiziert. Die Expressionsunterschiede von mehr als zwei verglichenen Gewebetypen wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis Rangsummentests errechnet (postHoc-Test: Tukey und Kramer (Nemenyi)) (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

1.19 Die *Xiphophorus* Phänokopie des Lof1/Lof2 Mutanten

Um den möglichen Einfluss eines Transposons auf den Phänotyp der Mutante zu untersuchen, wurden 12 Primerpaare designed. Das Ziel war die Erfassung der *xmrk*-Promotersequenz und der einzelnen *xmrk*-Exons. Um die Produktgröße auf unter 1100 bp zu limitieren, wurden teilweise mehrere Exons von einem Primerpaar erfasst. Anschließend wurden die Kandidatensequenzen via PCR amplifiziert und mittels Gelelektrophorese analysiert. Als Vorlage für den Primerbau diente die in Abbildung 3 festgehaltene molekulare Darstellung von *xmrk*.

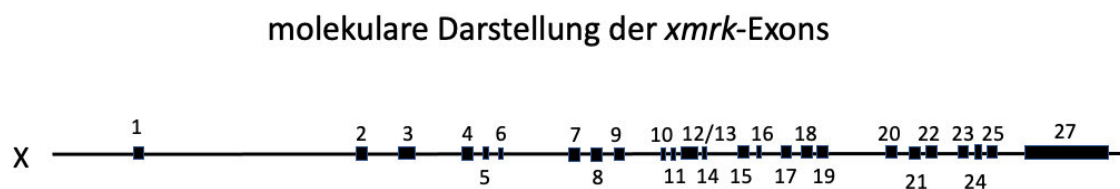


Abbildung 3: Molekulare Darstellung der *xmrk*-Exons. Vorlage für den Primerbau zur Erfassung der *xmrk*-Promotersequenz und der *xmrk*-Exons.

Ergebnisse

1.20 Expressionsbestimmung von *xmrk*

Die *xmrk*-Expressionsbestimmung erfolgte in malignem Gewebe von Fischen der 407 Tumورlinie sowie in gesundem Hautgewebe von 407 *Xiphophorus* Hybriden mit korrespondierendem gesundem Genotyp. Es wurde eine signifikant höhere *xmrk*-Expression in dem malignen Gewebe festgestellt (p-Wert: < 0.001), was mit den Ergebnissen einer früheren Studie übereinstimmt (Regneri & Scharfl, 2012) (Abbildung 4).

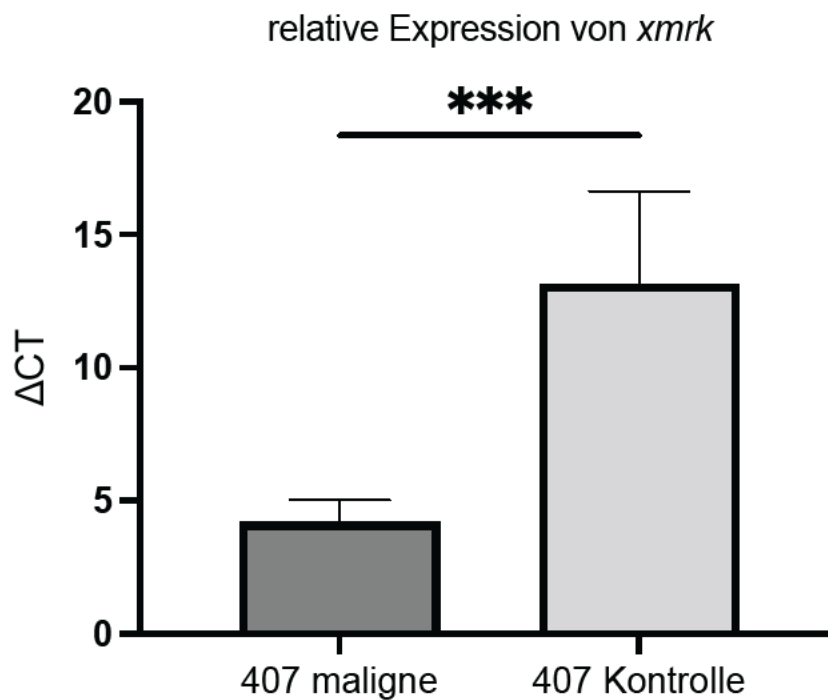
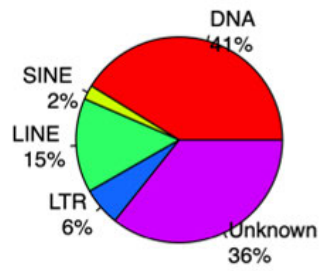


Abbildung 4: Barplot-Darstellung der *xmrk*-Expression. Die Daten wurden in malignem Melanomgewebe der 407 Tumorfische sowie in gesundem Kontrollgewebe der 407 *Xiphophorus* Hybride mit korrespondierendem Phänotyp bestimmt. (407 maligne Melanome: n= 5, 407 Kontrollgewebe: n= 5).

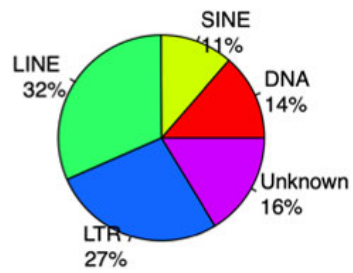
1.21 Auswertung des RNA-Expressionsprofils

Die verwendete Fisch-spezifische TE-Datenbank umfasste 4090 Transposons. 41% wurden als DNA-Transposons identifiziert. Sie machten den prozentual größten Anteil aus, gefolgt von 15% LINE-, 6% LTR- und 2% SINE-Transposons (Abbildung 5A). Als unklassifiziert konnten 36% TEs ausgemacht werden. 1695 TEs wurden mit einem BaseMean > 10 als exprimiert angesehen. 132 dieser exprimierten TEs zeigten eine differentielle Expression in benignem und malignem Gewebe auf. Davon waren 96 Transposons in malignem Gewebe herunterreguliert, während 36 TEs eine Hochregulierung aufzeigten. Die Gesamtanzahl der transkribierten TE-Reads wurde in gesundem Kontrollgewebe, benignen Läsionen und malignen Läsionen der *Xiphophorus* Hybride berechnet. Es zeigten sich Unterschiede zwischen dem genomischen Vorkommen und der Expression der Transposons. Während DNA-TEs den genomisch größten Anteil ausmachten, lagen sie in allen drei getesteten Gewebetypen $< 15\%$. Gleichzeitig zeigten sich LINE-, LTR- und SINE-TEs deutlich stärker exprimiert (Abbildung 5B, 5C, 5D), was auf eine höhere Transkriptionsaktivität von Retrotransposons im Vergleich zu DNA-Transposons hinweist. Zudem ließen sich proportionale Unterschiede in der Expression der TE-Familien zwischen den getesteten Gewebetypen beobachten (Abbildung 5B, 5C, 5D und Abbildung 6). Alle charakterisierten TE-Familien zeigten sich in benignen und malignen Läsionen im Vergleich zu gesunder Haut erhöht. Dabei zeigte sich eine mit der Malignisierung des Gewebes zunehmende Expressionserhöhung der charakterisierten TE-Familien.

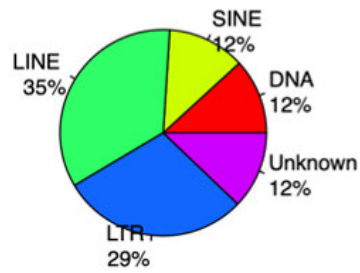
A TE-Familien innerhalb der Fisch-spezifischen Datenbank



B Kontrolle



C benigne



D maligne

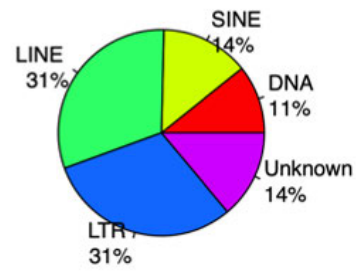


Abbildung 5: Kuchendiagramm der TE-Familien innerhalb der Fisch-spezifischen Datenbank (A). Prozentuale Verteilung der TE-Readcounts in gesundem Kontrollgewebe (B), benignen Läsionen (C) und malignem Gewebe (D) von *Xiphophorus* Hybriden.

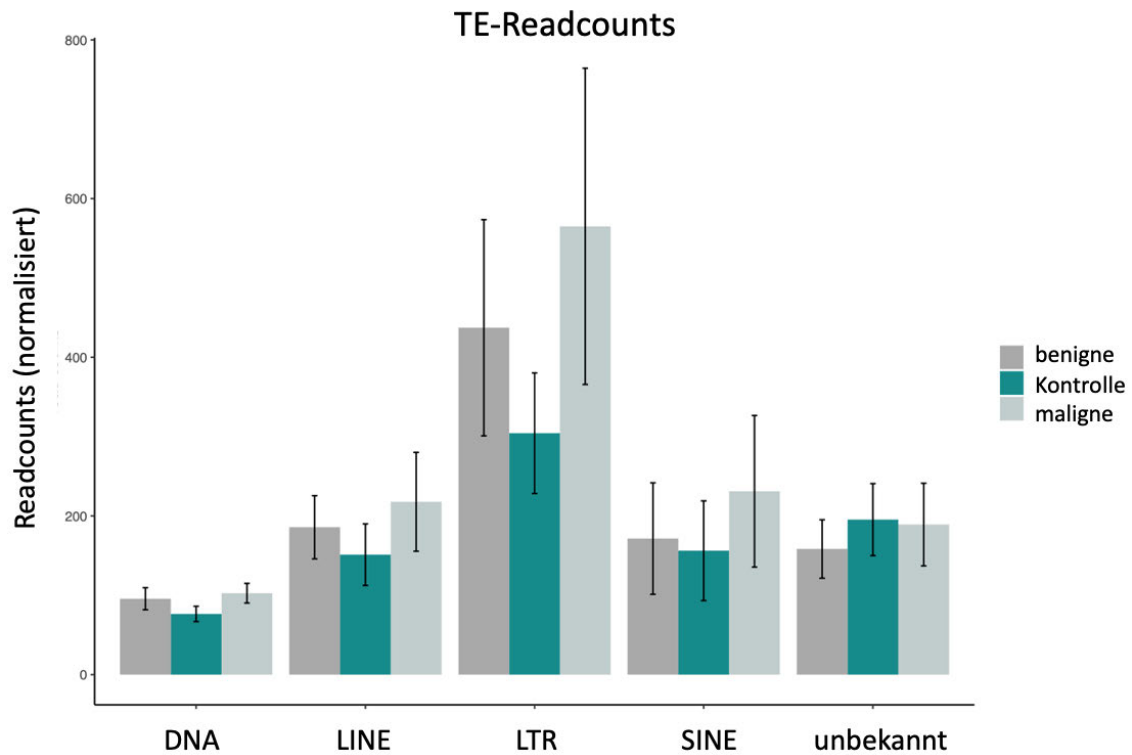


Abbildung 6: Barplot der normalisierte TE-Readcounts. Die Readcounts wurden in gesunder Haut (Kontrolle: n= 10), benignem (n= 15) und malignem Gewebe (n= 21) von 36 *Xiphophorus* Hybriden errechnet.

Um die Expression der TEs in den verschiedenen Entitäten zu vergleichen, wurden die normalisierten Readcounts in RNA-Seq Daten von gesundem Kontrollgewebe, benignen Läsionen und malignem Gewebe bestimmt (Abbildung 7A). Die niedrigste Expression zeigte sich in Kontrollgewebe. Eine leichte Erhöhung war in benignem Gewebe zu beobachten, während die höchste Expression in malignem Tumorgewebe sichtbar war. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zwischen Kontrollgewebe und malignem Gewebe (p-Wert: < 0.001) sowie zwischen benignem und malignem Gewebe (p-Wert: < 0.001). Im weiteren Verlauf wurde die TE-Expression in Gewebepaaren von gesunder Haut und benignem Gewebe von 10 Fischen mit benignem Genotyp (Tu/-; R/-) bestimmt. Hierbei zeigte sich eine differentielle Expression der TEs in den beiden getesteten Gewebetypen (Abbildung 7B).

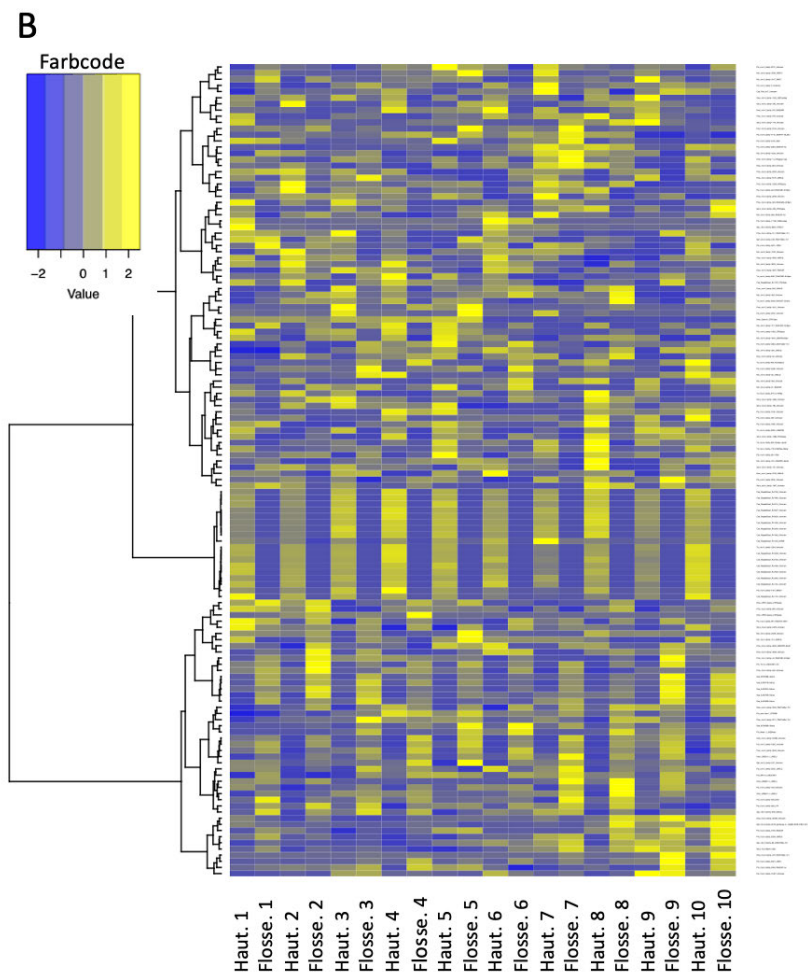
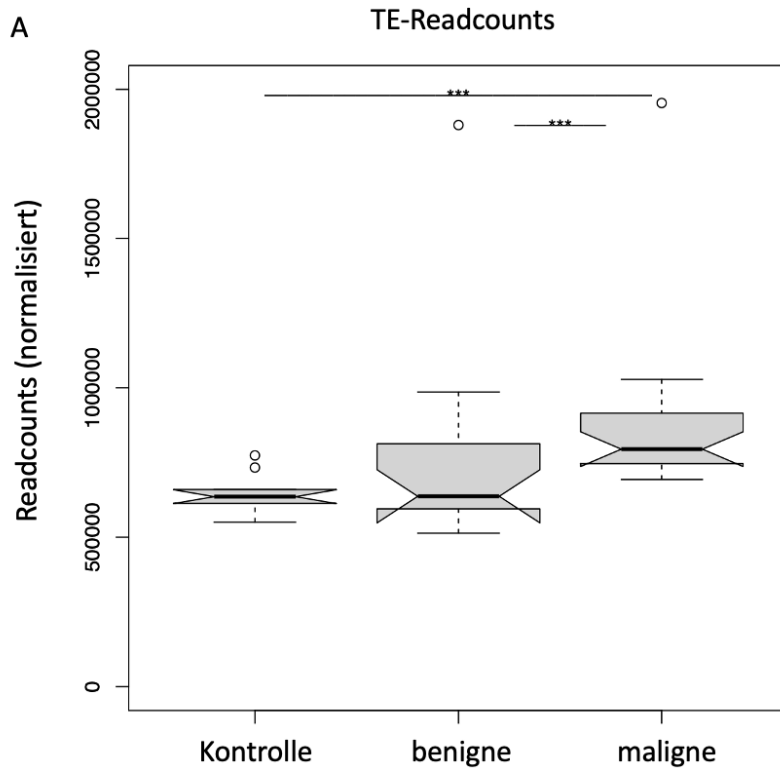
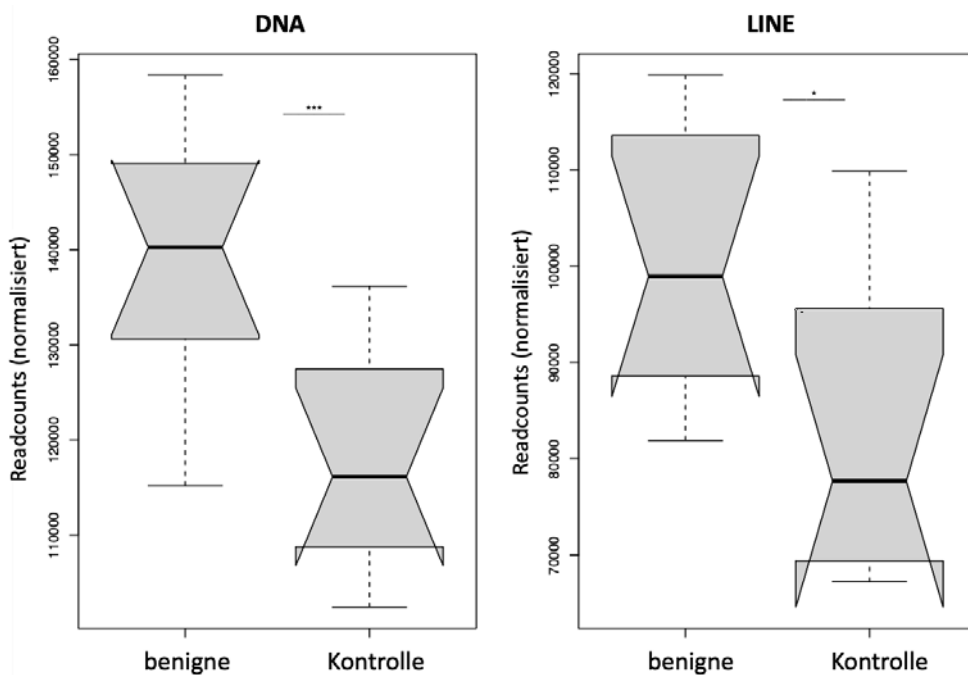


Abbildung 7: (A) Boxplot der normalisierten TE-Readcounts. Die Daten wurden errechnet aus RNA-seq Daten von gesundem Kontrollgewebe (n= 10), benignem (n= 15) sowie malignem Gewebe (n= 21) entnommen aus 36 *Xiphophorus* Hybriden. (B) Heatmap differentiell exprimierter TEs in benignem Gewebe (Flosse 1-10; n= 10) und gesundem Kontrollgewebe (Haut 1-10, n=10) entnommen aus 10 *Xiphophorus* Hybriden mit benignem Genotyp.

Um die in Abbildung 7B dargestellten TE-Expressionsunterschiede in gesunder Haut und benignen Läsionen der 10 Fische mit benignem Genotyp genauer zu analysieren, wurde eine Untersuchung der Read-Anzahl der einzelnen TE-Familien durchgeführt (Abbildung 8). Alle charakterisierten TE-Familien zeigten sich in benignem Gewebe erhöht. Dabei wies die Erhöhung von DNA- (p-Wert: < 0.001), LINE- (p-Wert: < 0.05) und LTR-TEs (p-Wert: < 0.001) Signifikanz auf. Bislang noch nicht klassifizierte TEs bzw. unbekannte TEs zeigten sich in gesundem Kontrollgewebe signifikant erhöht (p-Wert: < 0.001).



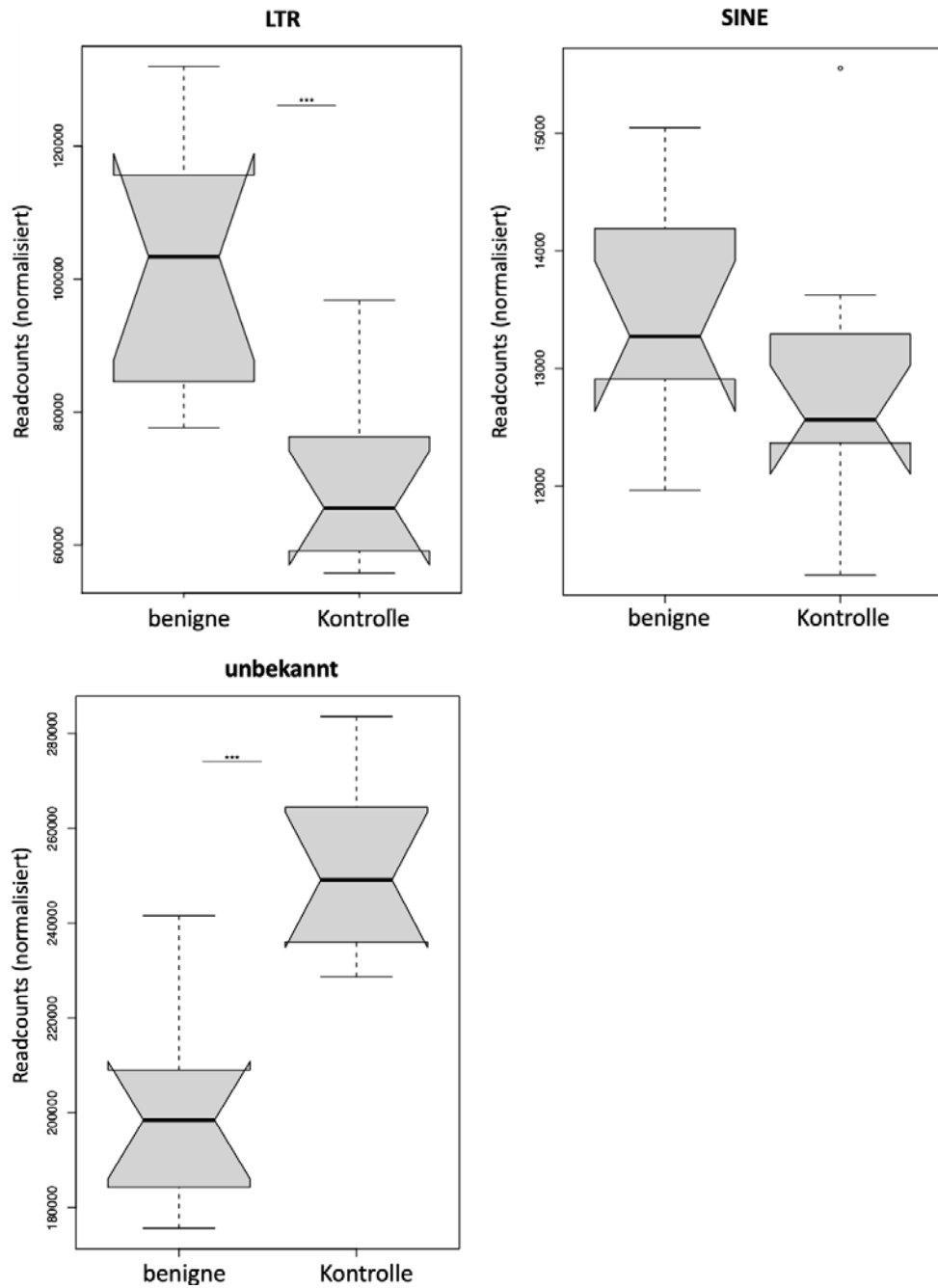


Abbildung 8: Vergleich der normalisierten Readcounts der einzelnen TE-Familien. Die Daten wurden errechnet aus RNA-Seq Daten von gesundem Kontrollgewebe (n= 10) und benignen Läsionen (n= 10) entnommen aus 10 *Xiphophorus* Hybriden mit benignem Genotyp.

1.22 Experimentelle Verifikation der TE- Sequenzierdaten

Nach der Analyse des RNA-Expressionsprofils galt es die aus dem Profil ersichtlichen Expressionsdaten experimentell zu verifizieren. Zur Verifikation der Daten wurde eine qPCR-Untersuchung der Expression und Regulation von 4 exprimierten TEs durchgeführt (Tabelle 20). Zuerst wurde die Expression in malignem Gewebe zweier Tumorfischlinien, benignem Gewebe und gesunder Haut bestimmt. Im Anschluss fand die Expressionsbestimmung zusätzlich in Hirn-, Leber-, Kiemen- und Augengewebe von *Xiphophorus* Hybriden statt, um die Expressionsmuster der ausgewählten TEs genauer zu analysieren.

Tabelle 20: Auswahl der 4 exprimierten TEs für die qPCR-Analyse

Transposon	baseMean	Log2FC (maligne/benigne)
Xma_rnd-5_family-531_DNA/hAT-Charlie	268,8	0,64
Gaf_rnd-5_family-1020_Unknown	26,23	0,41
Oni_rnd-6_family-283_DNA/hAT	544,85	-0,42
Cse_Piler_54.65_DNA/hAT-Charlie	18	-0,59

1.22.1 Expressionsanalyse von Xma_rnd-5_family-531_DNA/hAT-Charlie

Die direkte Gegenüberstellung der relativen Expression (ΔCT) in malignem Gewebe beider Tumorfischlinien und Gewebe aus benignen Läsionen sowie gesundem Hautgewebe der Kontrollfische zeigte die erhöhte Expression von Xma_rnd-5_family-531_DNA/hAT-Charlie in 407 malignem Gewebe (Abbildung 9). Ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den vier abgebildeten Gewebeprobe[n] konnte mit Hilfe des Kruskal-Wallis Rangsummentests nachgewiesen werden (p-Wert: 0.001). Im Vergleich zu dem 1844 Tumorgewebe zeigte sich die Expression des Transposons im 407 Tumorgewebe signifikant erhöht (p-Wert < 0.001). Auch zeigte sich ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen dem 407 Tumorgewebe und dem Gewebe aus benignen Läsionen (p-Wert < 0.01). Der p-Wert ermittelt zwischen 407 malignem Gewebe und gesunder Haut der Kontrollfische war nicht signifikant. Durch diese Analyse konnte die in den Sequenzierdaten beobachtete Hochregulierung des TEs in malignem Gewebe im Vergleich zu benignem Gewebe im Falle des 407 Tumorgewebes experimentell verifiziert werden.

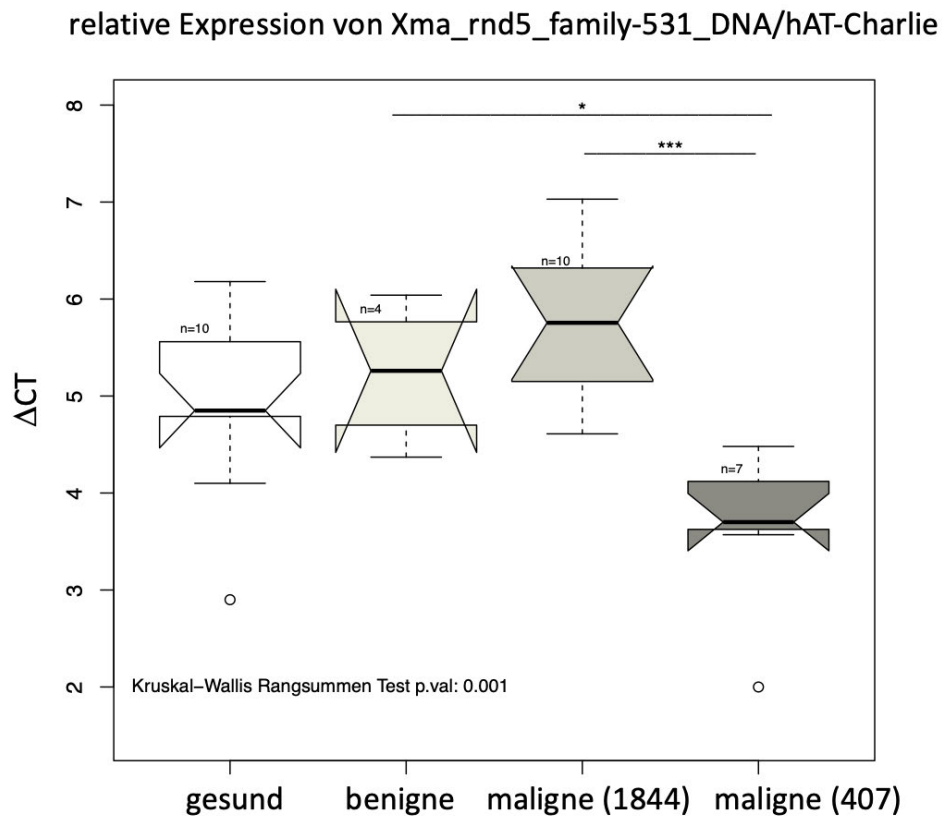


Abbildung 9: Boxplot-Darstellung zur Ermittlung der relativen Expression (ΔCT) des Transposon Xma_rnd-5_family-531_DNA/hAT-Charlie. Die Daten wurden ermittelt in malignem Gewebe der 407 und 1844 Tumorfische sowie in Gewebe aus benignen Läsionen und Kontrollgewebe. (407 Tumorfische: n=7, 1844 Tumorfische: n=10, Benigne Läsionsfische: n=4, 407 Kontrollfische: n=10).

Auch die Expressionsanalyse in verschiedenen nicht-tumorösen *Xiphophorus* Gewebetypen zeigte interessante Ergebnisse auf (Abbildung 10). Die niedrigste relative Expression wurde in Lebergewebe gemessen. Im Kontrast dazu zeigte sich in Kiemengewebe eine leicht erhöhte Expression in den vier untersuchten Fischlinien. Zudem zeigte Xma_rnd-5_family-531_DNA/hAT-Charlie eine gesteigerte Expression in Augengewebe. Die höchsten Expressionsraten des Transposons konnte in Hirngewebe beobachtet werden. Der Vergleich des Vorkommens in malignem Gewebe mit dem Vorkommen in benignen Läsionen und gesunder Haut der jeweiligen Fische zeigte die in Abbildung 9 dargestellte Expressionserhöhung in dem 407 Tumorgewebe.

relative Expression von Xma_rnd-5_family-531_DNA/hAT-Charlie

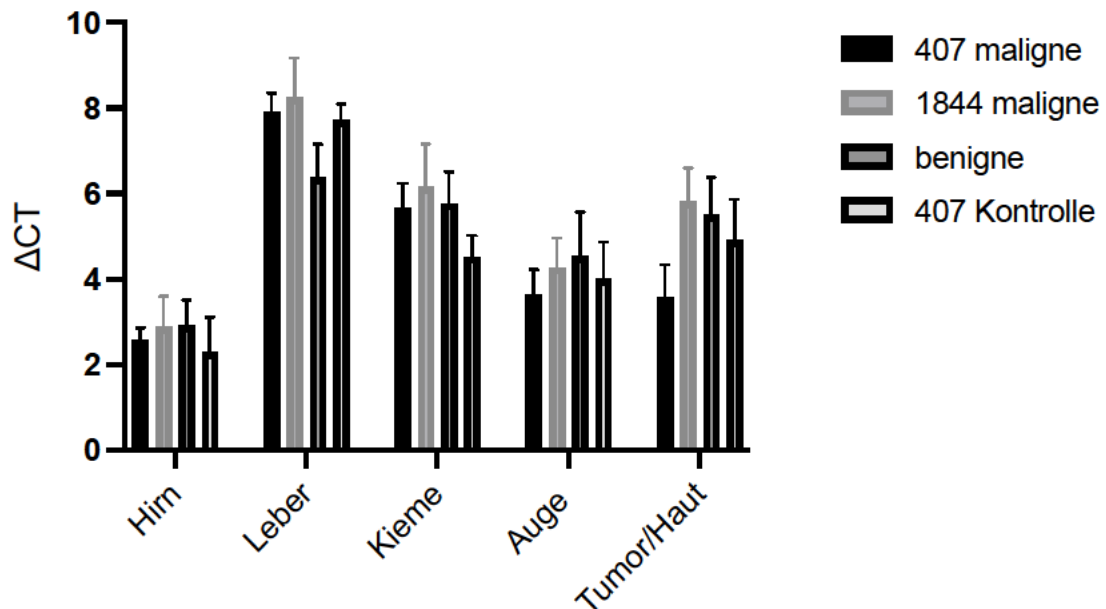


Abbildung 10: Mittelwerte, Standardabweichung und relative Expression (ΔCT) des Transposon Xma_rnd-5_family-531_DNA/hAT-Charlie. Die Daten wurden ermittelt in Hirn-, Leber-, Kiemen-, Augen- und Tumor- bzw. Hautgewebe der 407 und 1844 Tumorfische sowie der Fische mit benignen Läsionen und der 407 Kontrollfische. (407 Tumorfische: n=7, 1844 Tumorfische: n=10, Benigne Läsionsfische: n=4, 407 Kontrollfische: n=10).

1.22.2 Expressionsanalyse von Gaf_rnd-5_family-1020_Unknown

Die Gegenüberstellung der Δ CT Werte in malignem Gewebe beider Tumorfischlinien und Gewebe aus benignen Läsionen sowie gesundem Hautgewebe der Kontrollfische lies eine Hochregulierung von Gaf_rnd-5_family-1020_Unknown in malignem Gewebe beider Tumorfischlinien erkennen (Abbildung 11). Dabei konnte mit Hilfe des Kruskal-Wallis Rangsummentests ein nicht-signifikanter Expressionsunterschied zwischen den verglichenen Gewebeproben nachgewiesen werden (p-Wert: 0.059). Die höchste Expression zeigte Gaf_rnd-5_family-1020_Unknown in 407 Tumorgewebe gefolgt von 1844 Tumorgewebe, benignem Gewebe und gesunder Kontrollhaut. Die in den Sequenzierdaten beobachtete Hochregulierung des TEs in malignem Gewebe konnte damit experimentell verifiziert werden.

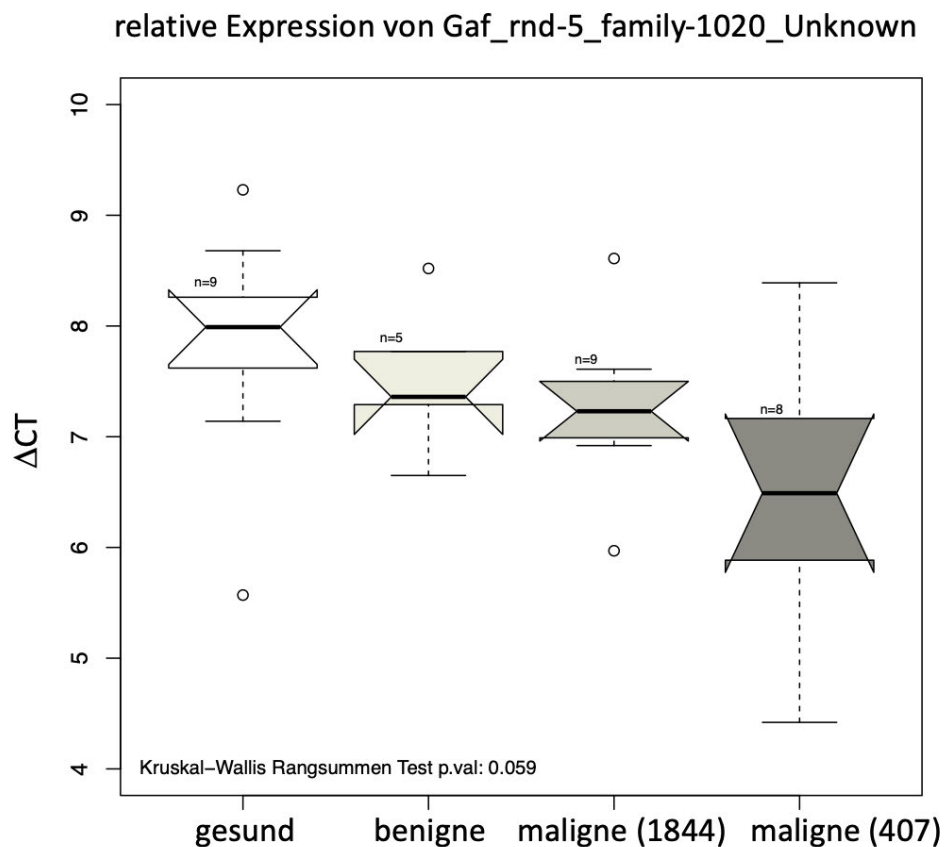


Abbildung 11: Boxplot-Darstellung zur Ermittlung der relativen Expression (Δ CT) des Transposon Gaf_rnd-5_family-1020_Unknown. Die Daten wurden ermittelt in malignem Gewebe

der 407 und 1844 Tumorfische sowie in Gewebe aus benignen Läsionen und Kontrollgewebe. (407 Tumorfische: n=8, 1844 Tumorfische: n=9, Benigne Läsionsfische: n=5, 407 Kontrollfische: n=9).

In Lebergewebe zeigte das Transposon *Gaf_rnd-5_family-1020_Unknown* in allen untersuchten Fischlinien die niedrigste relative Expression auf (Abbildung 12). Im Kontrast dazu konnten in Kiemengewebe leicht erhöhte Werte festgestellt werden. Eine gesteigerte Expression ließ sich in Augengewebe beobachten. Die höchsten Expressionsraten des Transposons konnten wie auch bei *Xma_rnd-5_family-531_DNA/hAT-Charlie* in Hirngewebe aller untersuchten Fischlinien gemessen werden.

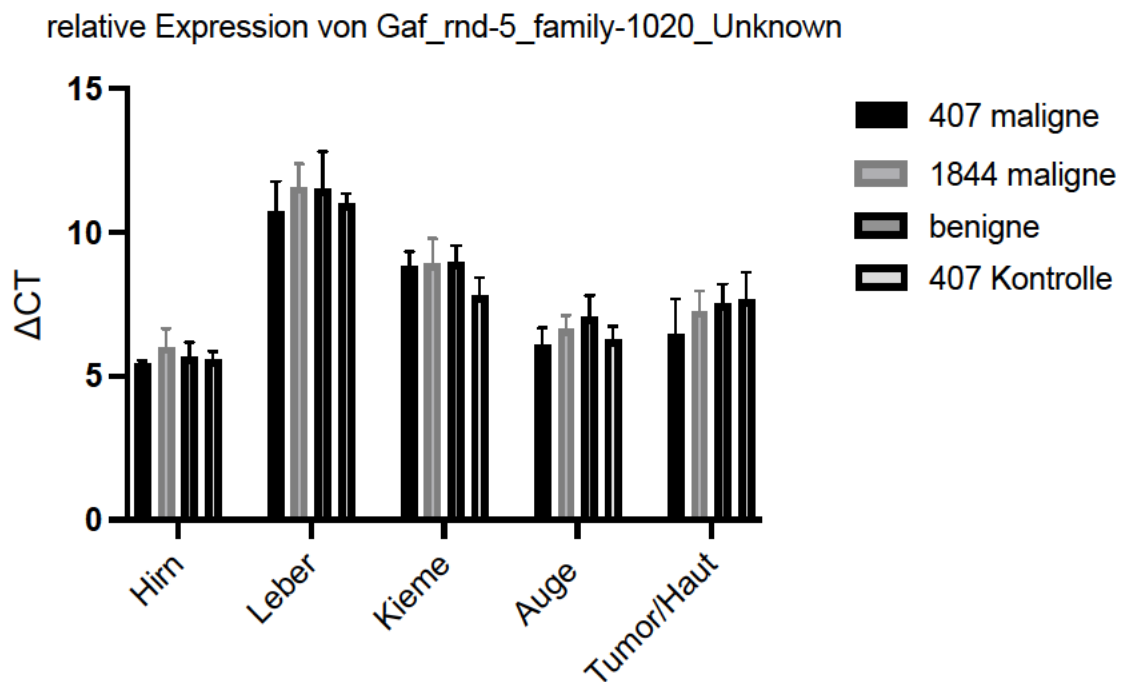


Abbildung 12: Gebildete Mittelwerte, Standardabweichung und relative Expression (Δ CT) des Transposon *Gaf_rnd-5_family-1020_Unknown*. Die Daten wurden ermittelt in Hirn-, Leber-, Kiemen-, Augen- und Tumor- bzw. Hautgewebe der 407 und 1844 Tumorfische sowie der Fische mit benignen Läsionen und der 407 Kontrollfische. (407 Tumorfische: n=8, 1844 Tumorfische: n=9, Benigne Läsionsfische: n=5, 407 Kontrollfische: n=9).

1.22.3 Expressionsanalyse von Oni_rnd-6_family-283_DNA/hAT

Die Gegenüberstellung der Δ CT Werte in malignem Gewebe beider Tumorfischlinien, Gewebe aus benignen Läsionen sowie gesundem Hautgewebe der Kontrollfische zeigte die erhöhte Expression von Oni_rnd-6_family-283_DNA/hAT in gesundem Gewebe (Abbildung 13). Mit Hilfe des Kruskal-Wallis Rangsummentests konnte ein nicht-signifikanter Expressionsunterschied zwischen den verglichenen Gewebetypen nachgewiesen werden (p-Wert: 0.066). Oni_rnd-6_family-283_DNA/hAT zeigte in beiden untersuchten Tumorgeweben eine im Vergleich zu benignem Gewebe erniedrigte Expression. Damit konnte die in den Sequenzierdaten beobachtete Expressionsminderung in malignem Gewebe erfolgreich verifiziert werden.

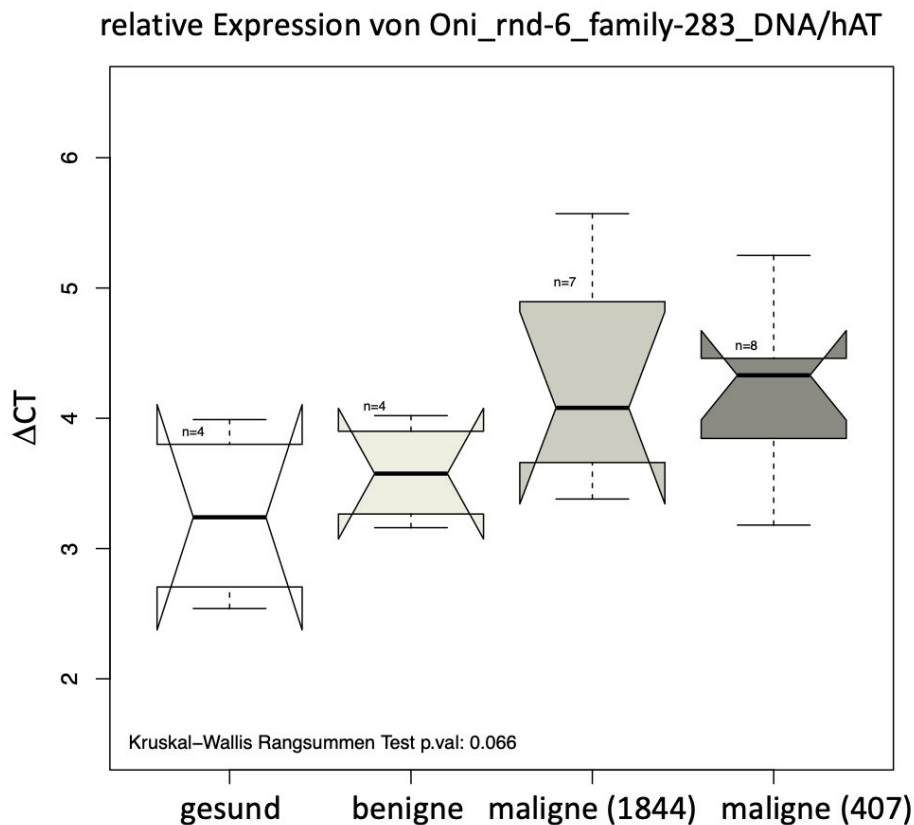


Abbildung 13: Boxplot-Darstellung zur Ermittlung der relativen Expression (Δ CT) des Transposon Oni_rnd-6_family-283_DNA/hAT. Die Daten wurden errechnet in malignem Gewebe der 407 und 1844 Tumorfische sowie in Gewebe aus benignen Läsionen und Kontrollgewebe. (407 Tumorfische: n=8, 1844 Tumorfische: n=7, Benigne Läsionsfische: n=4, 407 Kontrollfische: n=4).

Auch die Expressionsanalyse in verschiedenen *Xiphophorus* Gewebetypen zeigte interessante Ergebnisse auf. Die für alle Fischlinien niedrigste Expression des TEs konnte in Lebergewebe gemessen werden (Abbildung 14). Eine im Kontrast dazu leicht erhöhte Expression wurde in Hirn- und Augengewebe aller untersuchten Fischlinien ermittelt. Die höchsten Expressionswerte zeigte Oni_rnd-6_family-283_DNA/hAT in Kiemengewebe. Der Vergleich der malignen Gewebe mit gesunder Haut und Gewebe aus benignen Läsionen offenbarte die bereits beschriebene Expressionserhöhung in gesunder Haut.

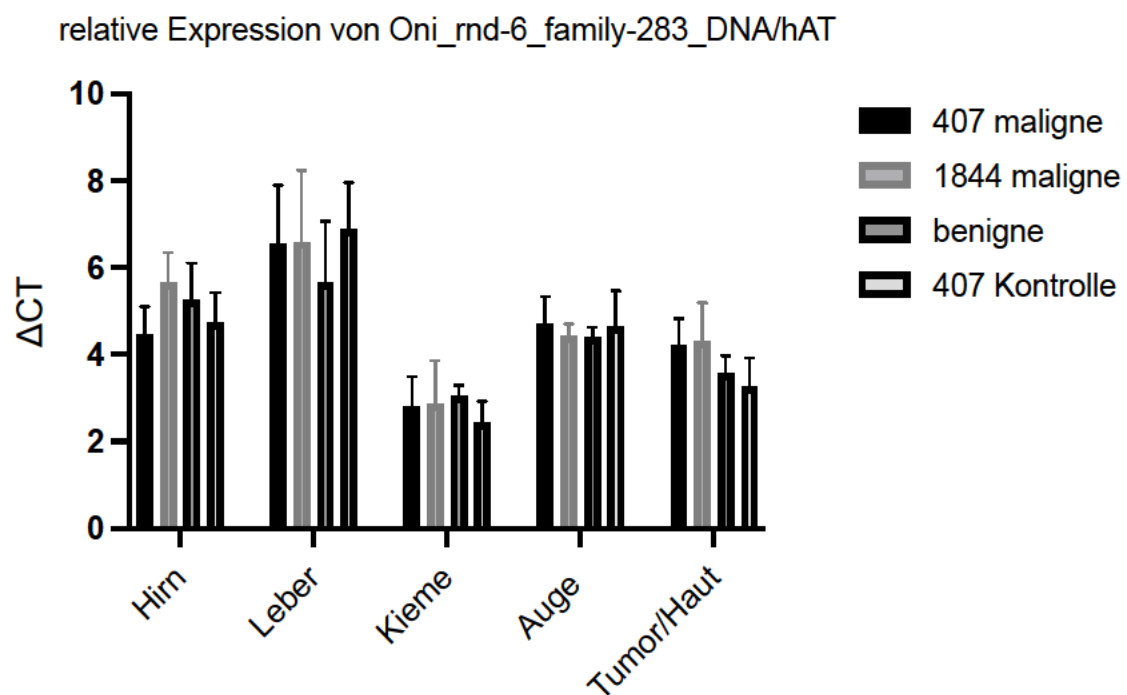


Abbildung 14: Mittelwerte, Standardabweichungen und relative Expression (Δ CT) des Transposon Oni_rnd-6_family-283_DNA/hAT. Die Daten wurden ermittelt in Hirn-, Leber-, Kiemen-, Augen- und Tumor- bzw. Hautgewebe der 407 und 1844 Tumorfische sowie der Fische mit benignen Läsionen und der 407 Kontrollfische. (407 Tumorfische: n=8, 1844 Tumorfische: n=7, Benigne Läsionsfische: n=4, 407 Kontrollfische: n=4).

1.2.2.4 Expressionsanalyse von Cse_Pilar_54.65_DNA/hAT

Der direkte Vergleich der Δ CT Werte in malignem Gewebe mit Gewebe aus benignen Läsionen und gesunder Haut der Kontrollfische zeigte eine Hochregulierung von Cse_Pilar_54.65_DNA/hAT in benignem Gewebe (Abbildung 15). Dabei konnte mit

Hilfe des Kruskal-Wallis Rangsummentests ein nicht-signifikanter Expressionsunterschied zwischen den getesteten Gewebetypen nachgewiesen werden (p-Wert: 0.692). Die höchste Expression wurde in benignem Gewebe gemessen gefolgt von 1844 malignem Gewebe, gesunder Kontrollhaut und 407 malignem Gewebe. Die in den Sequenzierdaten beobachtete Expressionsminderung in malignem Gewebe konnte damit experimentell verifiziert werden.

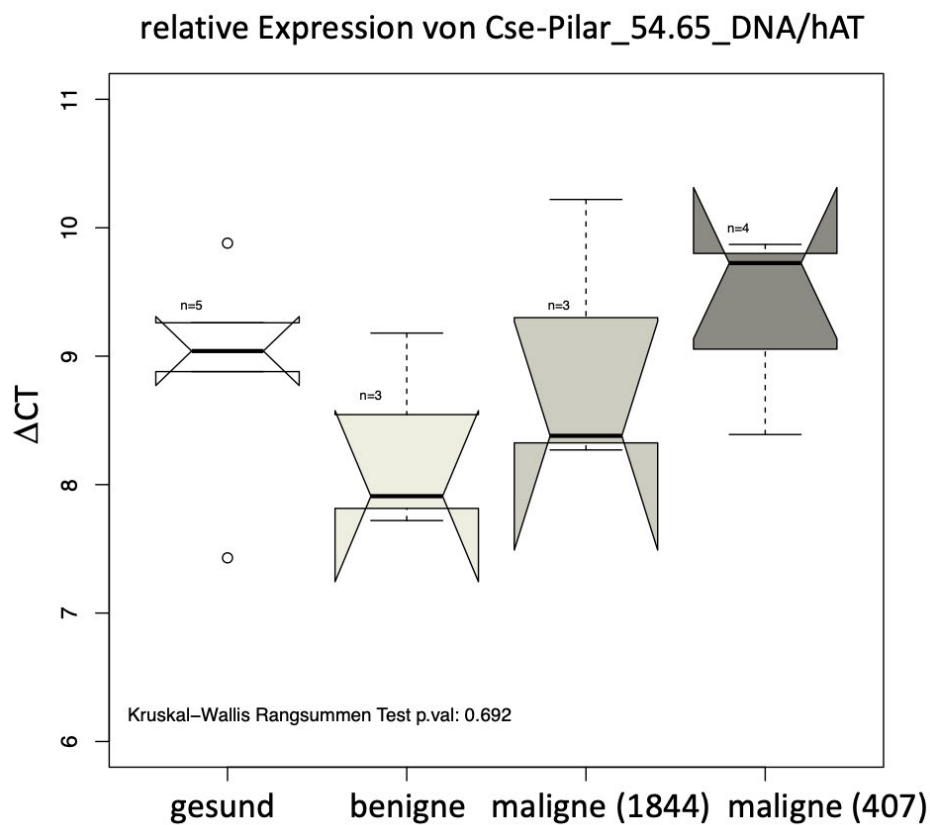


Abbildung 15: Boxplot-Darstellung zur Ermittlung der relativen Expression (Δ CT) des Transposon Cse_Piler_54.65_DNA/hAT-Charlie. Die Werte wurden errechnet in malignem Gewebe der 407 und 1844 Tumorfische sowie in Gewebe aus benignen Läsionen und Kontrollgewebe. (407 Tumorfische: n=4, 1844 Tumorfische: n=3, Benigne Läsionsfische: n=3, 407 Kontrollfische: n=5).

Aus Abbildung 16 wurde eine insgesamt niedrige relative Expression des Transposons Cse_Piler_54.65_DNA/hAT-Charlie in den verschiedenen Entitäten deutlich. Mit Ausnahme des Hirngewebes aller Fischlinien waren Expressionswerte (Δ CT) von > 7 zu beobachten. Die insgesamt niedrigste Expression konnte in Lebergewebe aller Fischlinien gemessen werden, wohingegen die höchste Expression in Hirngewebe zu beobachten war.

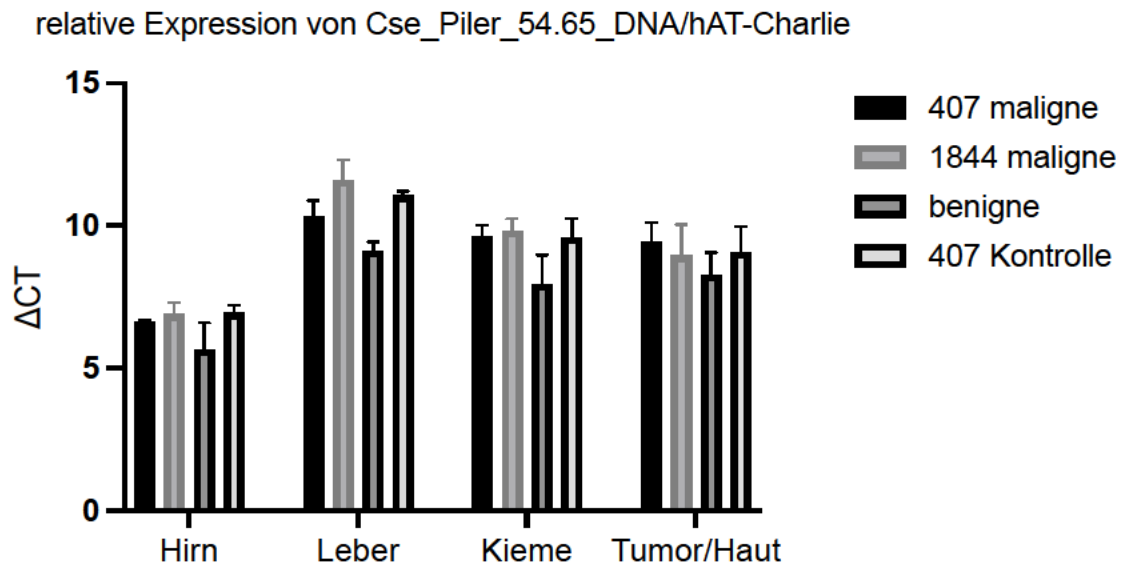


Abbildung 16: Gebildete Mittelwerte, Standardabweichungen und relative Expression (Δ CT) des Transposon Cse_Piler_54.65_DNA/hAT-Charlie. Die Daten wurden ermittelt in Hirn-, Leber-, Kiemen-, Augen- und Tumor- bzw. Hautgewebe der 407 und 1844 Tumorfische sowie der Fische mit benignen Läsionen und der 407 Kontrollfische. (407 Tumorfische: n=4, 1844 Tumorfische: n=3, Benigne Läsionsfische: n=3, 407 Kontrollfische: n=5).

1.23 Untersuchung der Lof1/Lof2 Phänokopie

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Mutante (Abbildung 17d) (Fischlinie 407 ohne Sd 6608) ist gemeinsam mit den von Prof. Schartl beschriebenen Lof 1 (b) und Lof 2 (c) Mutanten (M. Schartl et al., 1999) und dem mdl^{sd} -ONC-*xmrk* tragenden Wildtyp (a) in Abbildung 17 dargestellt. Der makroskopisch gesunde Phänotyp der Mutanten ist klar ersichtlich.

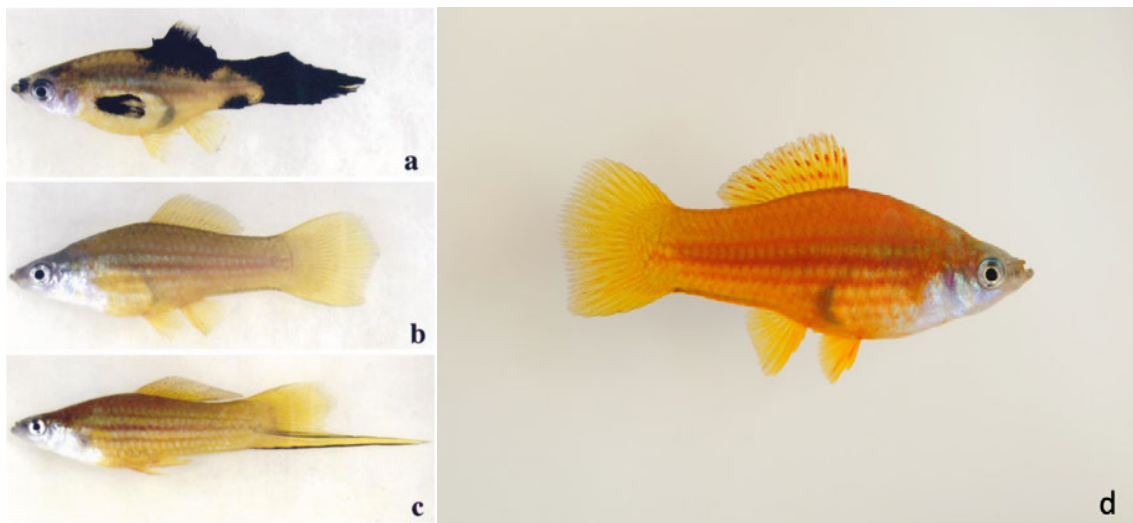


Abbildung 17: Darstellung des mdl^{sd} -ONC-*xmrk* tragenden Wildtyps (a), der Lof 1 (b) und Lof 2 (c) Mutante (M. Schartl et al., 1999) sowie der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mutante (d, Fischlinie: 407 ohne Sd 6608).

Um den potenziellen Einfluss eines Transposons auf den Phänotyp der Mutante nachzuweisen, galt es zunächst die Promotersequenz des Onkogens *xmrk* auf gDNA zu untersuchen (Abbildung 18). Sowohl in beiden malignen Proben (Tu1 und Tu2) als auch in zwei gepoolten Hautproben der Mutante (M1 und M2) sowie in gepooltem Hautgewebe eines Nachkommens der Mutante (Off) waren deutliche Banden auf der zu erwartenden Höhe (592 bp) zu erkennen. Eine Verunreinigung konnte durch die abgebildete Negativkontrolle (-) ausgeschlossen werden. Eine viele Basenpaare umfassende Insertion eines Transposons oder anderer DNA-Sequenzen in diesem Bereich ist somit nicht Ursache des mutanten Phänotyps.

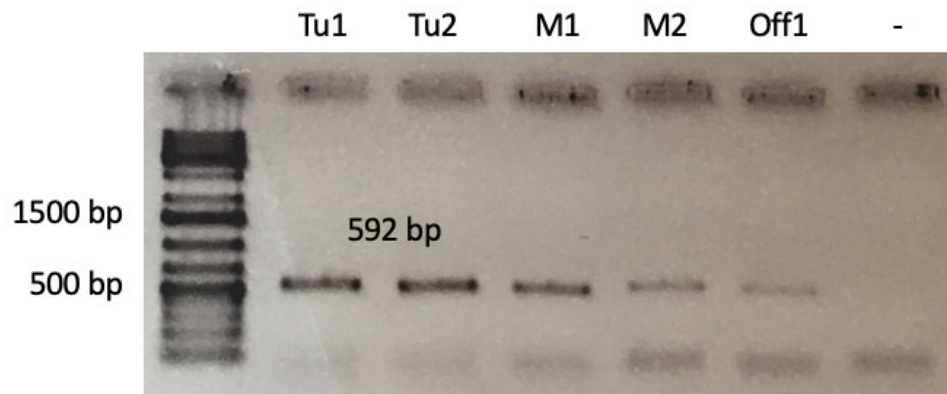


Abbildung 18: Untersuchung der proximalen *xmrk*-Promotersequenz auf gDNA. Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte von zwei Proben eines malignen 407 Tumorfisches (Tu1 und Tu2), zwei Proben gepoolter Haut der *Xiphophorus* Mutante (M1 und M2) und in Hautgewebe eines Nachkommens der Mutante (Off). Als Negativkontrolle (-) wurde Wasser verwendet.

Nachdem die Promotersequenz untersucht wurde, folgte die Analyse der *xmrk*-Exons. Die Untersuchung erfolgte auf gDNA und wurde in malignem Gewebe eines 407 Tumorfisches (Tu) und in gepooltem, phänotypisch gesundem Hautgewebe der *Xiphophorus* Mutante (Mu) durchgeführt (Abbildung 19). Alle Primerpaare lieferten ein PCR-Produkt. Gleichzeitig zeigten alle Banden in beiden Gewebetypen, mit Ausnahme von Exon 7-9, die jeweilig erwartete Produktgröße auf. Während die Exons 7-9 repräsentierende Bande in malignem Gewebe des 407 Tumorfisches mit 815 bp die zu erwartende Produktgröße aufwies, war in Hautgewebe der Mutante mit Hilfe des DNA-Ladders eine Produktgröße von circa 300 bp zu erkennen. Zugleich konnten in beiden dargestellten Gewebeproben schwache Doppelbanden beobachtet werden.

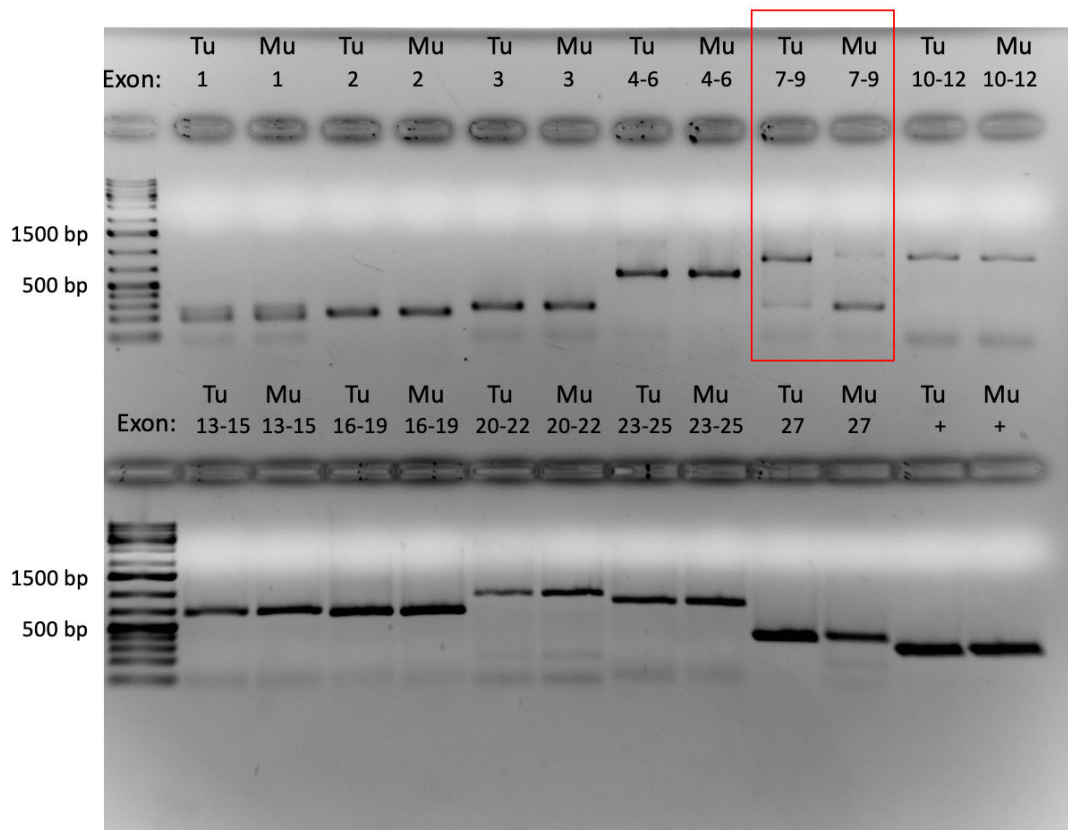


Abbildung 19: Expressionsabbildung der *xmrk*-Exons auf gDNA. Gegenübergestellt sind die PCR-Produkte von malignem Gewebe eines 407 Tumorfisches (Tu) und gepooltem Hautgewebe der *Xiphophorus* Mutante (Mu). Die *xmrk*-Exons wurden chronologisch nummeriert und dargestellt. Der Kasten markiert den Größenunterschied der Exon 7-9 Banden.

Um dem Größenunterschied der Exon 7-9 Banden nachzugehen, wurde die Onkogen-Spezifität der hergestellten Exon 7-9 Primer überprüft, indem ein Alignment von *xmrk* mit dem Protoonkogen *egfrb* vorgenommen wurde (Abbildung 20). Die Kennzeichnung der Primer zeigt deutlich, dass keine Onkogen-Spezifität erreicht wurde. Vielmehr erfassten beide Primer Sequenzen von *xmrk* und *egfrb*. Folglich ließ sich keine adäquate Aussage über die *xmrk*-kodierende Sequenz treffen.

		for	
Exon 7	Xmrk	attctggtttcatttagtttctaactccatt	16545
	EgfrbX	ATTCTGGTTTCATTTAGTTTCTAACTCCATTTGTTCCCTGTTTCTTCATGCAGGCTTGCA	15629

	Xmrk	gggacttcaacgatgatggaacctgtaaggacacctgtcctccgcccgaatatctatgaca	16605
	EgfrbX	GGGACTTCAACGATGATGGAACCTGTAAGGACACCTGTCTCCGCCGAAAATCTATGACA	15689

	Xmrk	tctgagccaccagggtggtggacaacccaacatcaagtacactttcggagccgcttctg	16665
	EgfrbX	TCGTCAGCCACCAGTGGTGGACAACCCCAACATCAAGTACACTTTCGGAGCCGCTTGTG	15749

	Xmrk	tcaaggaatgccctagtaagtataaaaaacatattcatatcagatcatccagacttcagt	16725
	EgfrbX	TCAAGGAATGCCCTAGTAGTATAAAAAACATATTATATCAGATCATCCACCTTACCT	15809

Xmrk	ggcctctgtatactgcagagtggttacatgtagaaatagttcacttcagatgaagaactga	16785	
EgfrbX	GGCCTCTGTATGCTGCAGAGTGTACATGTAGAAATAGTTCACTTCAGATGAAGAACTGA	15869	

Xmrk	ttatgtgacgatgtttgaggttctctgaaaatgcagcttgattagatctgtcctgcagctg	16845	
EgfrbX	TTATGTGACGATGTTTGTAGGTTCTGAAAATGCAGCTTGATTAGATCTGTCTGCAGCTG	15929	

Xmrk	gtaaacgtctgtcagtaagtgcgcccgttgttttagtctctgatgttgccttaagtgtttgtc	16905	
EgfrbX	GTA AACGCTGT CAGTAAGTCGCCGTTGTTTAGTCTCTGATGTTGCCTTAATGTTGTGTC	15989	

Xmrk	tttgttcacagtaactacgtggtgacagagggcgcatgtgtcgtcttgcagtgacagg	16965	
EgfrbX	TTTGTTCACAGGTA ACTACGTGGTGACAGAAGGTGCATGTGTCGCTCTGCAGTCGAGG	16049	

Exon 8	Xmrk	aatgcttgaggtagatgagaatggcaaacgaagctgcaagccatgacagggagctctgtcd	17025
	EgfrbX	AATGCTTGAGGTAGATGAGAATGGCAAAACGAAGCTGCAAGCCATGCGCAGGAGCTGTCC	16109

	Xmrk	caaaagtagaccgaccacacacacacacacacatacttgc-----	17066
EgfrbX	CAAAGGTAGACCGACCCA	16169	

Xmrk	-----	17066	
EgfrbX	CAAACCAGA	16229	

Xmrk	gcagattcccagagttgttcttctcctttctgcag	17126	
EgfrbX	GCAGATTCCCAAAGTTGTTCTTGTCTTCTTCTGCAAGTGTGTGATGGAATTGGAATCGGGTC	16289	

Exon 9	Xmrk	tctgagcaacactattgctgtcaactcaaccaacatcaggtccttcagcaactgcaccaa	17186
	EgfrbX	TCTGAGCAACACTATTGCTGTCAACTCAACCAACATCGGGTCCTTCAGCAACTGCACCAA	16349

	Xmrk	gatcaacggcgacatcatcctcaacaggaactcctttgaag	17246
	EgfrbX	GATCAACGGCGACATCATCCTCAACAGGAACCTCTTGAAGGTGAGGACATTTTACCT	16409

Xmrk	tttcttctacattatgtccttccatcatccatcattctgacctctgtggggtcagga	17306	
EgfrbX	TTTCTTCTTACATTTCTGTCTTCCATCATCCATCATGCTGACCCCTGTGGGGTCAGAA	16469	

		rev	
Xmrk	agggg	17365	
EgfrbX	AGGGGTACAGTACCGATCTCCAGGGTCAACCTGGACAGACTCCTCTGCCACCACAGAC	16529	

Abbildung 20: Alignierung von *xmrk* und *egfrb*. Exon 7 bis 9 sind in gelb sowie der forward- (for) und der reverse-Primer (rev) in rot markiert. Das Primerpaar erfasste sowohl Sequenzen von *xmrk* als auch von *egfrb*.

Zuletzt wurden alle Exons des Onkogens *xmrk* mit nur einem Primerpaar dargestellt. Um ein potenzielles Binden der gebauten Primer an passende Intronstellen genomischer DNA zu vermeiden, wurde für dieses Experiment cDNA präpariert. Der Forward-Primer lag am Anfang der für das *xmrk*-Exon 1 kodierenden Sequenz, der Reverse-Primer am Ende der für das *xmrk*-Exon 27 kodierenden Sequenz. Das in Abbildung 21 festgehaltene Ergebnis der Gelelektrophorese zeigte deutliche Banden in allen untersuchten Proben. Die Produktgröße stimmte sowohl in den 4 Proben aus malignem Gewebe der 407 Tumorfische (Tu), den 4 Proben aus Kiemengewebe der Mutante (Kie) als auch in den 4 Proben aus Lebergewebe der Mutante (Le) mit der erwarteten Basenpaaranzahl von circa 3700 überein.

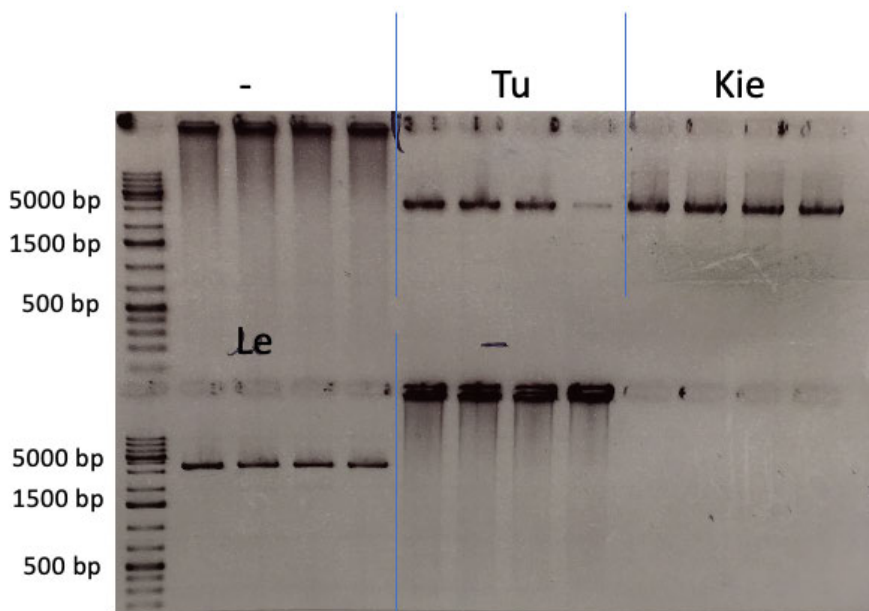


Abbildung 21: Darstellung der RT-PCR der *xmrk*-Exons 1-27 auf cDNA. Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte aus malignem Gewebe der 407 Tumorfische (Tu) und in Kiemen-, (Kie) sowie Lebergewebe (Le) der Mutante. Als Negativkontrolle (-) wurde Wasser verwendet.

Diskussion

Charakterisierung des verwendeten Materials

Im *Xiphophorus*-Melanom-System wird die Entwicklung des malignen Melanoms durch die Überexpression des gewebespezifischen Onkogens *xmrk* verursacht. Ein Transposon-unabhängiges Ergebnis der durchgeführten Expressionsanalyse war die Bestätigung der Expressionshöhe von *xmrk* in verschiedenen Gewebetypen. In der Vergangenheit konnte innerhalb einer Vielzahl von Studien ein hohes *xmrk*-Expressionsniveau in malignem Melanomgewebe der *Xiphophorus* gemessen werden. Die *xmrk*-Expression in gesunder Haut fiel im Gegensatz dazu verhältnismäßig gering aus (Regneri & Scharl, 2012; M. Scharl et al., 1999). Diese Beobachtungen konnten in der hier vorliegenden Arbeit durch qPCR-Analysen bestätigt werden. Zurückführen lassen sich diese Ergebnisse unter anderem auf Hypomethylierungsprozesse in der Promotersequenz von *xmrk* (Altschmied et al., 1997). Via methylierungssensitiven Restriktionsenzymen und PCR-Amplifikation konnte eine vollständige Demethylierung des *xmrk*-Promoters in malignem Gewebe dargestellt werden, während im Gegensatz dazu die Analyse des Methylierungsgrades von CpG-Dinukleotiden eine vollständige Methylierung des Promoters in gesundem Gewebe aufzeigte (Altschmied et al., 1997).

Genomische Funktion transposabler Elemente

Die in der Einleitung aufgeworfene Frage nach der genomischen Funktion transposabler Elemente reicht mehr als 60 Jahre zurück. Verschiedene Auffassungen, die in Form vergangener Publikationen vorgetragen wurden, weisen dabei eine gewisse Widersprüchlichkeit auf, die es zu diskutieren lohnt. Eine chronologische Ordnung der wissenschaftlich etablierten Annahmen verdeutlicht die verschiedenen Positionen und eine Art Evolution in der Wertung der Funktion transposabler Elemente. Zuerst wurden Transposons von Barbara McClintock beschrieben. Gemeinsam mit Britten & Davidson wiesen ihre Forschungsergebnisse auf eine weitreichende regulatorische Funktion transposabler Elemente hin, ohne den potenziell schädlichen Effekt ihrer Transpositionen zu vernachlässigen (Britten & Davidson, 1969; McClintock, 1951; Rebollo et al., 2012).

Andere Wissenschaftler konzentrierten sich auf das mutagene Potenzial und sahen, anthropomorphistisch gesprochen, in TE's hauptsächlich eigensinnige DNA-Sequenzen, die vor allem an ihrem Eigenüberleben interessiert sind (Doolittle & Sapienza, 1980; Orgel & Crick, 1980; Rebollo et al., 2012). Diese Meinung setzte sich durch und wurde erst durch Entdeckungen der letzten Jahre zunehmend hinterfragt. Unter anderem die Identifikation regulatorischer Elemente innerhalb von Transposonsequenzen bewirkte eine Veränderung der Wertung ihrer genomischen Funktion (Chuong et al., 2017; Faulkner et al., 2009). Zahlreiche Vermutungen zur Neueinschätzung wurden geäußert. Sie reichen von der Annahme, Transposons halten eine Art symbiotische Beziehung mit ihrem Wirtsorganismus aufrecht bis hin zu der Spekulation, dass die positiven Konsequenzen ihrer Transpositionen überwiegen (Mita & Boeke, 2016; Rebollo et al., 2012). Allein das mutagene Potenzial ihrer genomischen Insertionen bleibt derweil unbestritten und ist in vielen Tiermodellen gut belegt (Kidwell, 2002; Kidwell & Lisch, 2000). In *Drosophila melanogaster* konnten mehr als 50% der phänotypisch bemerkbaren Mutationen auf genomische Insertionen, verursacht durch TE-Transpositionen, zurückgeführt werden (Bourque et al., 2018; Eickbush & Furano, 2002). Und auch im Mausmodell sind mutagene Einflüsse durch Transpositionsvorgänge häufig beschrieben. 10-15% aller im Labor beobachteten bösartig vererbter Phänotypen wurden als Konsequenz stattgefundenener genomischer Sprünge erkannt (Bourque et al., 2018; Maksakova et al., 2006). Unter anderem können diese Erkenntnisse, insbesondere aber die Kennzeichen aktiver regulatorischer Elemente innerhalb von Transposonsequenzen (Chuong et al., 2017; Faulkner et al., 2009) als Indiz dafür verstanden werden, dass TEs mehr zu der Pathogenese menschlicher Erkrankungen beisteuern könnten, als bisher angenommen (Saleh et al., 2019). Auch in Bezug auf Krebszellen ist also eine regulatorische Einflussnahme auf Zellfunktionen denkbar. Um diese Rolle der TEs in der malignen Melanomgenese bei *Xiphophorus* zu analysieren, ist eine grundlegende Beschreibung der Transposongesamtanzahl und der Expressionsmuster einzelner Transposons in verschiedenen Gewebeproben hilfreich und notwendig. Diese Grundlagen wurden in der hier vorliegenden Arbeit geschaffen und somit eine Basis für zukünftige Forschung erarbeitet.

Analyse zur TE-Expression in tumorösem Gewebe

In einer publizierten Studie konnte in humanen Proben im Vergleich zu korrespondierendem gesundem Gewebe eine erhöhte TE-Expression in verschiedenen malignen Gewebetypen festgestellt werden (Kong et al., 2019). Im *Xiphophorus*-Melanom-Modell wurde eine solche Analyse bislang nicht durchgeführt. Um dieses Phänomen auch im *Xiphophorus*-Melanom-Modell zu analysieren, wurden RNA-Sequenzierdaten von 36 *Xiphophorus* Rückkreuzungshybriden untersucht. Es wurde die TE-Expression in gesundem Hautgewebe, benignem Flossengewebe und malignen Läsionen verglichen. Im Gegensatz zu gesunder Haut zeigte sich eine erhöhte TE-Read-Anzahl in benignem Flossengewebe. Eine zum gesunden Kontrollgewebe als auch zum benignen Gewebe signifikant erhöhte TE-Read-Anzahl konnte in malignen Läsionen nachgewiesen werden. Eine Erklärung dieser Ergebnisse liefert die Tatsache, dass Prozesse wie DNA-Methylierung und Histonmodifikation in tumorösem Gewebe ausgesetzt werden (Anwar et al., 2017). Beide Mechanismen gehören unter physiologischen Bedingungen zu den wichtigsten transkriptionellen Inhibitionsmechanismen transposabler Elemente (Rebollo et al., 2012; Xie et al., 2013). Ein Aussetzen dieser Prozesse kann demzufolge die Reaktivierung einer Vielzahl von TEs bedeuten, was einen direkten Einfluss auf die Expression nach sich ziehen kann. Ein Blick in die Literatur, beziehungsweise der Vergleich zu der anfangs erwähnten Studie von Kong und Kollegen, offenbart übereinstimmende Ergebnisse. In besagter Studie wurde die TE-Expression in insgesamt 14 verschiedenen malignen Tumortypen untersucht. Eine Erhöhung der TE-Expression konnte in 10 dieser 14 Tumortypen nachgewiesen werden. Wie auch in dieser Arbeit fungierte dem malignen Gewebe korrespondierendes gesundes Gewebe dabei als Kontrolle. Es wurde geschlussfolgert, dass sich die Rate an epigenetischer Dysregulation in den verschiedenen Tumortypen unterscheidet und mit der schlussendlichen TE-Expression korrespondiert (Kong et al., 2019). Obwohl Melanomgewebe nicht zu den von Kong und Kollegen untersuchten Gewebetypen gehörte, kann aus einer Reihe von Gründen angenommen werden, dass die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse auch auf epigenetischer Dysregulation beruhen. Zum einen sind derartige Prozesse auch in benignem Gewebe, wie beispielsweise in Gewebe aus gutartigen Darmpolypen, beschrieben (Goelz et al.,

1985). Zum anderen konnten in der Vergangenheit durchgeführte Experimente zeigen, dass auch Melanozyten innerhalb ihrer Karzinogenese starken epigenetischen Veränderungen ausgesetzt sind (Li et al., 2013; Micevic et al., 2017). Genauer konnte festgestellt werden, dass Melanozyten gerade zu Beginn ihrer Karzinogenese einer progressiven Hypomethylierung unterstehen (Li et al., 2013). Die in dieser Arbeit im Vergleich zu benignem Flossengewebe gefundene erhöhte TE-Read-Anzahl in malignen Läsionen kann dabei auch mit dem Grad der epigenetischen Dysregulation erklärt werden. So zeigte sich in einer vergangenen Studie eine geringere globale Methylierung in Gewebe aus malignen *Xiphophorus* Läsionen im Vergleich zu benignem Flossengewebe (Hausmann, 2019). Die in gesundem Kontrollgewebe gefundene niedrigere Gesamt-Read-Anzahl lässt auf eine basale TE-Transkriptionsrate in gesunder Haut schließen und stimmt mit den Ergebnissen der Expressionsstudie von Kong und Kollegen überein (Kong et al., 2019). Interessant wäre der Vergleich zwischen tumorösem Flossengewebe und gesundem Flossengewebe. Eine gewebeabhängige Schwankung der TE-Expression in verschiedenen Gewebetypen, beziehungsweise ein solcher Einfluss auf die erhaltenen Ergebnisse, könnte durch diesen Vergleich ausgeschlossen werden.

Eine weitere Erkenntnis der hier durchgeführten Analyse war, dass sich die TE-Familien-Verteilung in gesunder Haut, benignen Läsionen und malignem Gewebe von *Xiphophorus* Hybriden unterschied. Alle charakterisierten TEs zeigten sich in benignen und malignen Läsionen stärker exprimiert. Dabei stieg die Expression mit zunehmender Malignisierung des Gewebes. Epigenetische Mechanismen könnten demzufolge nicht nur die Gesamtexpression beeinflussen, sondern auch die Expression einzelner TEs.

Expressionsbestimmung einzelner Transposonsequenzen

Bis heute fehlt eine Analyse der TE-Gesamtexpression in verschiedenen *Xiphophorus* Gewebetypen wie man in der Literatur auch vergeblich nach Expressionsanalysen einzelner Transposonsequenzen im *Xiphophorus*-Melanom-Modell sucht. Gerade in Bezug auf die Frage nach dem Einfluss transposabler Elemente auf die Karzinogenese könnten einzelne TEs eine große Rolle spielen. Insbesondere in malignem Gewebe hochregulierten Transposons könnten hierbei eine besondere Signifikanz zukommen. Um

dieser Frage nachzugehen, wurden innerhalb dieser Arbeit RNA-Sequenzierdaten analysiert und experimentell verifiziert. Ein übergeordnetes Ziel war, durch qPCR Analysen ausgewählter TEs eine fundierte Aussage über die Reproduzierbarkeit der Expressionsdaten treffen zu können. Dadurch sollte eine Grundlage geschaffen werden, um in zukünftigen Experimenten einen potenziellen Einfluss hochregulierter Transposons auf den Prozess der Malignisierung eruieren zu können. Im Falle zweier Transposons konnte die aus den Sequenzierdaten hervorgegangene Hochregulierung in malignem Gewebe verifiziert werden. Zum einen zeigte Xma_rnd-5_family-531_DNA/hAT-Charlie eine signifikante Expressionserhöhung in dem 407 Tumorgewebe auf, während Gaf_rnd-5_family-1020_Unknown eine Hochregulierung in malignem Gewebe beider untersuchten Tumorfischlinien auswies. Xma_rnd-5_family-531_DNA/hAT-Charlie zählt dabei zu der Klasse der DNA-Transposons und weiter zur Subfamilie der *hobo/Ac/Tam3* (hAT). Gaf_rnd-5_family-1020_Unknown konnte bislang noch keiner TE-Klasse zugeordnet werden. Beim Expressionsvergleich der beiden Transposons fällt die fehlende Expressionserhöhung von Xma_rnd-5_family-531_DNA/hAT-Charlie in der 1844 Tumorfischlinie auf. Mehrere Gründe könnten für die erhaltenen Ergebnisse verantwortlich sein. Zum einen bietet der völlig verschiedene genetische Hintergrund beider Tumorfischlinien eine mögliche Erklärung. Sie entwickeln zwar den gleichen malignem Phänotyp, allerdings unterscheidet sich die 1844 Tumorfischlinie durch eine Translokation des Onkogens *xmrk* von dem X-Chromosom von *X. maculatus* auf ein Autosom von *X. hellerii*. Ein anderer Grund für die Diskrepanz der Ergebnisse könnte die TE-Überexpression nur in einem Teil der 1844 Melanomen darstellen, so dass eine größere Anzahl 1844 Melanomen hätte verwendet werden müssen, um die potenzielle Expressionserhöhung zu detektieren. Zum anderen könnten diese Ergebnisse auf einen fehlerhaften Alignierungsprozess in der Erstellung des RNA-Expressionsprofils zurückgeführt werden. Gerade in Bezug auf short-read-DNA-Sequenzierung kann die repetitive Natur der Transposons den Alignierungsprozess erschweren (Mita & Boeke, 2016; Robert & Watson, 2015).

Durch die signifikante Expressionserhöhung von Xma_rnd-5_family-531_DNA/hAT-Charlie in 407 Tumorgewebe qualifiziert sich insbesondere dieses TE für weiterführende Experimente. Ein zu verfolgender Ansatz bildet dabei die Expressionsbestimmung in diversen Zellkulturen. Die Bestimmung könnte in PSM, A2 und humanen

Melanomzelllinien erfolgen. Bei der PSM Zellkultur („Platy-Swordtail-Melanoma“) handelt es sich um Zellen von einem pigmentfreien Anteil eines spontanen malignen Melanoms von *Xiphophorus* Hybriden, die ein überexprimiertes *xmrk* aufzeigen (Wittbrodt et al., 1989). Die A2 Fischzelllinie stellt hingegen eine spontan immortalisierte, epitheliale Zellenkultur aus Embryonen von *Xiphophorus hellerii* dar (Regneri et al., 2015). Eine nachgewiesene Hochregulierung des Transposons in malignem Gewebe der PSM Zellen könnte die Ergebnisse dieser Arbeit weiter festigen. Schlussendlich könnte man die regulatorische Rolle des TEs und seine Einflussnahme auf Tumorzellfunktionen durch spezifische *in-vitro* Knockouts testen (Bourque et al., 2018). Gleichzeitig gälte es zu eruieren, ob diese Transposonsequenz auch im menschlichen Genom existiert. Eine aus der humanen Ziellinie erkenntliche Überexpression des besagten Transposons in malignem Gewebe würde die Übertragung der gewonnen Erkenntnisse auf den Menschen erlauben. Allerdings weisen Fischgenome eine höhere Diversität und eine andere evolutionäre Dynamik in der Entwicklung ihrer TE-Sequenzen auf (Ferreira et al., 2011), was eine Existenz der gleichen Transposons im menschlichen Genom eher unwahrscheinlich macht. Dazu kommt, dass es selbst innerhalb Genomen stark verwandter Spezies zu drastischen Unterschieden in der Struktur ihrer Transposons kommen kann (Feschotte & Pritham, 2007; Pritham et al., 2005). In zukünftigen Experimenten könnte daher der hier erprobte Ansatz auf menschliches Melanomgewebe übertragen werden. Ein Expressionsprofil für menschliche Transposons könnte erstellt sowie die Expression mancher dieser TEs via qPCR verifiziert und schlussendlich eine mögliche regulatorische Einflussnahme auf Tumorzellen durch *in-vitro* Knockouts ermittelt werden.

Im Falle von Cse_Pilar_54.65_DNA/hAT und Oni_rnd-6_family-283_DNA/hAT konnte die aus dem Expressionsprofil erkenntliche Expressionserhöhung in benignem Gewebe im Vergleich zu malignem Gewebe in beiden Tumorfischlinien verifiziert werden. So konnte mit Ausnahme der fehlenden Expressionserhöhung von Xma_rnd-5_family-531_DNA/hAT-Charlie in 1844 Tumorgewebe die aus dem RNA-Sequenzierungsprofil ersichtliche Regulation aller untersuchten TEs experimentell bestätigt werden. Auch zeigten sich die via qPCR gemessenen Expressionsniveaus der TEs vergleichbar zu der Expression ersichtlich aus den Sequenzierdaten.

Untersuchungen der Lof1/Lof2 Phänokopie

Wie bereits erwähnt, ist das mutagene Potenzial transposabler Elemente unbestritten. Es lässt sich allerdings argumentieren, dass durch Transpositionen verursachte genomische Aberrationen nicht zwangsläufig einen schädlichen Effekt nach sich ziehen müssen, sondern durchaus auch positive Auswirkungen für den Wirtsorganismus bedeuten können. Beispielsweise wurde im Tiermodell der *Xiphophorus* eine Mutante (Lof1) identifiziert, bei der die Transposition eines Transposons die Disruption des Onkogens zur Konsequenz hatte (M. Scharl et al., 1999). Im Falle dieser Mutante kam es durch eine Insertion des Transposon TX-1 in das vierundzwanzigste *xmrk*-Exon zum Funktionsverlust des betroffenen Allels (M. Scharl et al., 1999). Es bleibt daher anzumerken, dass in dem Beispiel der beeinflussten Genexpression der Ort der Transposition, beziehungsweise die Funktion der von der Disruption betroffenen Sequenz einen entscheidenden Faktor einnimmt. So kann die Disruption von Tumorsuppressorgenen einen tumorigenen Effekt zur Folge haben, während der Funktionsverlust eines Onkogens das Ausbleiben der Tumorentwicklung bedeuten kann. Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde eine *Xiphophorus* Mutante beobachtet, die trotz malignen Genotyps (Tu^{-/-}; -/-) kein malignes Melanom entwickelte. Es galt Vorarbeit zu leisten, um bestenfalls den potenziellen Einfluss eines Transposons auf den Phänotyp der Mutante zu beweisen. Die von Scharl und Kollegen (M. Scharl et al., 1999) angestellte genomische Analyse der Lof1-Mutante diente dabei zur Orientierung. Allerdings wurde ein anderer Ansatz verfolgt, um eine genomische Veränderungen im *xmrk* kodierenden Bereich auf eine TE-Transposition zurückzuführen. Insgesamt wurden 12 Primerpaare zur Erfassung der *xmrk*-Promotersequenz und der *xmrk*-Exons entwickelt. Anschließend wurde eine PCR-Amplifikation eben dieser Sequenzen durchgeführt und die Produkte via Gelelektrophorese abgebildet. Das Ziel war TE bedingte Insertionen oder Deletionen innerhalb der *xmrk*-Exons oder der Promotersequenz zu detektieren und abzubilden.

Die Untersuchung und Darstellung besagter Sequenzen lieferte uneindeutige Ergebnisse. Die Amplifikation der Promotersequenz zeigte eine deutliche Bande auf der zu erwartenden Größe in den Mutantenproben. Eine viele Basenpaar umfassende Insertion oder Deletion, sowie eine vollständige Disruption dieser Sequenz wurde daher

ausgeschlossen. Allerdings ist eine zukünftige Sequenzierung der PCR-Produkte notwendig, um genaue Aussagen über die Sequenz treffen zu können. Die Gegenüberstellung der genomischen Struktur der *xmrk*-Exons in malignem Gewebe mit gepooltem Hautgewebe der Mutantenproben zeigte ein anderes Bild auf. Während die PCR-Produkte von 10 der abgebildeten 11 Primerpaare in beiden Gewebetypen auf der zu erwartenden Höhe beobachtet wurden, konnte in den für Exon 7-9 korrespondierenden Banden ein Größenunterschied von circa 500 Basenpaaren beobachtet werden. In Bezug auf den potenziellen Einfluss eines TEs auf den Phänotyp der Mutante ließ sich dieses Bild am ehesten durch eine Deletion im Genom der *Xiphophorus* Mutante erklären. Eine solche Deletion könnte eine abnorme *xmrk*-Transkription bewirken. Eine funktionslose Rezeptor-Kinase wäre die Konsequenz, was ein Ausbleiben der Signalfähigkeit des Rezeptors (M. Schartl et al., 1999; Wellbrock et al., 1999; Wellbrock & Schartl, 1999) und somit den gesunden Phänotyp erklären würde. Um den Funktionsverlust des betroffenen Allels nachzuweisen und auf die Transposition eines TEs zurückzuführen, sollte nach zurückgebliebenen Zielsequenzduplikationen im Bereich des Exon 7-9 gesucht werden. Solche direkten Wiederholungseinheiten werden nach geschehener Transposition zurückgelassen und können zum Nachweis einer stattgefundenen Transposition verwendet werden (Mills et al., 2007; Munoz-Lopez & Garcia-Perez, 2010; Plasterk, 1991). Weiterhin kann angenommen werden, dass eine potenzielle Transposition in die für *xmrk* kodierende Sequenz während der frühen embryonalen Entwicklung des Tumorlokus tragenden Elterntiers geschehen sein könnte. Insbesondere in dieser frühen Entwicklung werden Methylierungsprozesse ausgesetzt, die Transposons inaktivieren können, und deren Ausfällen TE-Transpositionen begünstigen (Bourque et al., 2018). Die Weitergabe des deletierten *xmrk*-Allels via Keimbahnzellen des Elterntiers hat betroffene somatische als auch Keimbahnzellen der Mutante zur Folge und erklärt den Phänotyp und die phänotypisch gesunden Nachkommen der Mutante. Um der potenziellen Deletion nachzugehen, wurden *xmrk* und *egfrb* aligniert und das korrespondierende Primerpaar eingezeichnet. Das Alignment zeigte deutlich, dass die gebildeten Primer zur Erfassung der *xmrk*-Exons keine Onkogen-Spezifität aufwiesen. Stattdessen erfassten sie auch passende Sequenzen des Protoonkogen *egfrb*. Folglich ließen sich keine adäquate Aussage über die *xmrk*-kodierende Sequenz in den untersuchten Gewebeproben treffen. Als Ursache für die mangelnde Spezifität der

entwickelten *xmrk*-Primer kann die Gleichheit der *xmrk*- und *egfrb*-Sequenzen angeführt werden. In der Vergangenheit durchgeführte Sequenzanalysen zeigten, dass sich besagte Sequenzen nur in wenigen Nukleotiden unterscheiden. Zuletzt wurde eine cDNA Untersuchung aller *xmrk*-Exons mit Hilfe von nur einem Primerpaar vorgenommen. Damit sollte Vorarbeit geleistet werden, um in zukünftigen Experimenten eine Einsicht in die *xmrk* kodierende Sequenz der Mutante zu ermöglichen. Alle PCR-Produkte wiesen in Gewebe der Mutante und in malignem Gewebe der 407 Tumorfische die erwartete *xmrk*-Produktgröße von circa 3700 bp auf. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *xmrk* im Genom der Mutante in Bezug auf die Exons vollständig existiert. Daher machen die erhaltenen Ergebnisse eine durch eine Transposition bedingte viele Basenpaar umfassende Deletion oder Insertion in der *xmrk*-Sequenz der Mutante eher unwahrscheinlich. Kurze Deletionen in einzelnen *xmrk*-Exons konnten durch die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Gesunder Phänotyp: Konsequenz einer fehlerhaften DNA-Replikation?

Alternativ denkbar ist eine fehlerhafte DNA-Replikation als Ursache für das Ausbleiben der malignen Melanomgenese der Mutante. Den häufigsten und damit wahrscheinlichsten Mutationstyp stellt die Punktmutation da. Um nur einige Möglichkeiten aufzuzählen, könnte zum Beispiel eine Substitution den Einbau einer abweichenden Aminosäure bedeuten, was zur Translation eines veränderten Proteins führen kann. Auf *xmrk* bezogen könnte die konstante Dimer-Bildung und der damit einhergehende permanent aktivierte Zustand der Kinase (Gómez et al., 2001) somit unterbunden worden sein. Auch vorstellbar ist der Wegfall oder das Hinzukommen einer Base in die für *xmrk* kodierenden Sequenz, was eine Verschiebung des Leserasters bewirken könnte. Alle Sequenzen der Mutation folgenden Basentriplets wären verändert und folglich der vorzeitige Einbau eines Stopkodons und ein daraus resultierender verfrühter Translationsabbruch denkbar. Es bleibt zusammenzufassen, dass nur ein Einsehen in die *xmrk* kodierende Sequenzen der Mutante und der Vergleich mit der korrespondierenden Region aus malignem Gewebe eines Tumorfisches Klarheit verschaffen kann. Aus diesem Grund könnte die Entschlüsselung der für Exon 1 bis 27 kodierenden Sequenz aus PCR-Produkten ein

vielversprechendes zukünftiges Experiment darstellen. Auch die Sequenzierung des gesamten Genoms der Mutante stellt eine Möglichkeit dar, um den potenziellen Einfluss eines Transposons ausschließen oder belegen zu können.

Zusammenfassung

Der Name der transposablen Elemente beruht auf ihrer Fähigkeit, ihre genomische Position verändern zu können. Durch Chromosomenaberrationen, Insertionen oder Deletionen können ihre genomischen Transpositionen genetische Instabilität verursachen. Inwieweit sie darüber hinaus regulatorischen Einfluss auf Zellfunktionen besitzen, ist Gegenstand aktueller Forschung ebenso wie die daraus resultierende Frage nach der Gesamtheit ihrer biologischen Signifikanz. Die Weiterführung experimenteller Forschung ist unabdingbar, um weiterhin offenen Fragen nachzugehen. Das *Xiphophorus*-Melanom-Modell stellt hierbei eines der ältesten Tiermodelle zur Erforschung des malignen Melanoms dar. Durch den klar definierten genetischen Hintergrund eignet es sich hervorragend zur Erforschung des bösartigen schwarzen Hautkrebses, welcher nach wie vor die tödlichste aller bekannten Hautkrebsformen darstellt. Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle transposabler Elemente in der malignen Melanomgenese von *Xiphophorus*. Das Forschungsprojekt gliederte sich in drei Abschnitte.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Analyse eines vorab erstellten RNA-Expressionsprofils, welches auf Sequenzen von gesunden, benignen bzw. malignen Gewebeproben von *Xiphophorus* Rückkreuzungshybriden basierte. Es konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe eine erhöhte TE-Expression in prämaligen Läsionen von Fischen mit korrespondierendem Genotyp (Tu/-; R/) zu beobachten war. Eine weiterhin erhöhte TE-Expression konnte in malignem Gewebe von Tumorfischen festgestellt werden (Genotyp: Tu/-, -/.). Diese Ergebnisse wiesen zum einen auf eine basale TE-Transkriptionsrate in gesunder Haut hin und stimmten zum anderen im Ergebnis mit einer veröffentlichten Studie überein, die eine erhöhte TE-Expression in menschlichen Tumoren dokumentiert, wobei Melanome nicht untersucht wurden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass sich die Verteilung der TE-Familien in gesundem Kontrollgewebe und prämaligen Gewebe der gleichen Fische unterscheidet.

Das Ziel des zweiten Teils war die experimentelle Verifikation der aus dem Expressionsprofil ersichtlichen Regulation ausgewählter TEs. Dabei konzentrierte ich mich ausschließlich auf TEs die statistisch exprimiert waren. Die via qPCR ermittelte Regulation stimmte weitestgehend mit der statistisch ermittelten überein. Im Falle eines Transposons konnte eine signifikante Expressionserhöhung in malignem Gewebe via qPCR ermittelt werden. In zukünftigen Experimenten könnten potenzielle regulatorische Eigenschaften dieser TE-Sequenz durch Knockouts in Zellkulturmodellen weiter eruiert werden, da überexprimierte TEs eine besondere Rolle im Hinblick auf einen möglichen regulatorischen Einfluss auf Zellfunktionen spielen könnten.

Gegenstand des letzten Teils war die Untersuchung eine *Xiphophorus* Mutante, die trotz „malignen“ Genotyps (Tu/-;-/-) kein malignes Melanom entwickelte. Es sollte der potenzielle Einfluss einer TE-Transposition auf den Phänotyp eruiert werden. Hierfür wurden insgesamt 12 Primerpaare zur Erfassung der proximalen *xmrk*-Promotersequenz und der 26 *xmrk*-Exons entwickelt. Via PCR-Amplifikation und Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte abgebildet. Auf diese Weise sollte eine durch eine mögliche TE-Transposition bedingte Insertion oder Deletion abgebildet werden. Während sich in der Darstellung der Promotersequenz kein Anhalt für eine viele Basenpaare umfassende Deletion oder Insertion nachweisen ließ, zeigten sich Auffälligkeiten in der *xmrk*-Exon Sequenz 7-9. Im Zuge der daraufhin erfolgten Alignierung von *xmrk* und *egfrb* zeigte sich, dass die synthetisierten Primer keine ausreichende Onkogen-Spezifität aufwiesen. Zurückführen ließ sich diese Tatsache auf die Gleichheit der *xmrk* Sequenz mit der Protoonkogenesequenz von *egfrb*. Die nachfolgende Darstellung aller *xmrk*-Exons auf cDNA-Ebene in gepoolten Gewebeproben der Mutanten lieferte ebenso keine Hinweise für eine durch TE-Transposition hervorgerufene Deletion oder Insertion. Es bleibt daher zu schlussfolgern, dass eine Transposon bedingte genetische Aberration durch die erhaltenen Ergebnisse eher unwahrscheinlich erscheint und nur die vollständige Sequenzanalyse der für *xmrk* kodierenden Sequenz der Mutante Klarheit verschaffen kann.

Abstract

The term “transposable elements” (TEs) is based on their ability to change their genomic position. Through insertions, deletions or chromosomal aberrations, their genomic mobility can cause genetic instability. The extent to which they further exert regulatory influence on cellular functions is the subject of current research, as is the resulting question of their overall biological significance. To further pursue these questions the continuation of experimental research is indispensable. In this regard, the *Xiphophorus*-melanoma-model represents one of the oldest animal models for the study of malignant melanoma. Thanks to its clearly defined genetic background, it is excellently suited for research into melanoma, which continues to be the most lethal of all known forms of skin cancer. The work presented here investigated the role of transposable elements in malignant melanomagenesis of *Xiphophorus*.

The research project is divided into three sections. The first part of this work, dealt with the analysis of a previously established RNA expression profile based on sequences of healthy, benign and malignant tissue samples of *Xiphophorus* backcross hybrids. It was shown that increased TE expression was present in premalignant lesions compared to healthy skin of fish with benign genotype (Tu/-; R/-). A further expression increase was detected in malignant tissue of fish with malignant genotype (Tu/-; -/-). These results indicated a basal TE transcription rate in healthy skin and were in agreement with a study that reported an increased transposon expression in several human tumor types, however melanoma was not studied. Simultaneously, it could be shown that TE family composition differs in healthy control tissue and premalignant tissue of the same fish.

The aim of the second part was to experimentally verify the regulation of selected transposons, which became evident from the transcriptome data. I focused exclusively on statistically expressed TEs. It was shown that the regulation determined via qPCR was largely consistent with the statistically determined regulation. In case of one transposon, a significant increase in expression was detected in malignant melanoma. In future experiments, potential regulatory properties of this TE can be further explored by in-vitro knockouts, since overexpressed TEs could play a particular role with regard to a possible regulatory influence on cell functions.

The subject of the last part was the investigation of a *Xiphophorus* mutant that does not develop malignant melanoma despite a “malignant” genotype (Tu/-; -/-). The potential influence of TE transposition on the phenotype was investigated. For this purpose, a total of 12 primer pairs were designed to capture the proximal *xmrk* promoter sequence and the 27 *xmrk* exons. PCR amplification and electrophoresis were used to map the PCR products. This way, an insertion or deletion caused by a TE transposition should be displayed. While there was no evidence for TE transposition in the promoter sequence representation, I did find abnormalities in the *xmrk* exon sequence 7-9. In the course of the subsequent alignment of *xmrk* and *egfrb*, it was found that the synthesized primers did not show sufficient oncogene specificity. This was due to the similarity of the *xmrk* sequence with the proto-oncogene sequence of *egfrb*. Subsequent visualization of all *xmrk* exons on cDNA-level in pooled tissue samples of the mutants did not provide any evidence for transposition-induced deletions or insertions. Therefore, it has to be concluded that a transposon-related genetic aberration seems rather improbable based on the results obtained and that only a closer look into the *xmrk* coding sequence will provide information on the genetic basis of the mutant phenotype.

Danksagung

Zu größtem Dank verpflichtet bin ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Scharl. Ihm verdanke ich die stetige sowohl fachliche als auch moralische Unterstützung meines Projekts.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Susanne Kneitz, für ihre sehr hilfreichen Anleitungen hinsichtlich des statistischen Teils dieser Arbeit.

Bei meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn Dr. Frederik Helmprobst, möchte ich mich für die viele Zeit, die er mir und meinem Projekt gewidmet hat, ganz herzlich bedanken.

Ein großer Dank gilt des Weiteren Frau Prof. Dr. Meierjohann und Herrn Prof. Dr. Schilling für ihre Mitbetreuung in meinem GSLS Promotionskomitee. Prof. Dr. Schilling danke ich zudem für meine Teilnahme an der ADF Winterakademie 2019.

Auch bedanke ich mich herzlich bei der gesamten AG Scharl und sämtlichen Mitarbeitern des Biozentrums für die schier unendliche Geduld, mit der mir jede erdenkliche Frage beantwortet wurde.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner Freundin Julia. Ihr unterstützt mich bei allem was ich tue. Vielen Danke, ich liebe euch.

Literaturverzeichnis

- Albertson, R. C., Cresko, W., Detrich, H. W., & Postlethwait, J. H. (2009). Evolutionary mutant models for human disease. *Trends in Genetics*, 25(2), 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.11.006>
- Albertson, R. C., Cresko, W., Iii, H. W. D., & Postlethwait, J. H. (2010). *NIH Public Access*. 25(2), 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.11.006>. Evolutionary
- Altschmied, J., Ditzel, L., & Scharl, M. (1997). Hypomethylation of the Xmrk oncogene promoter in melanoma cells of Xiphophorus. *Biological Chemistry*, 378(12), 1457–1466. <https://doi.org/10.1515/bchm.1997.378.12.1457>
- Anders, A., Anders, F., & Klinke, K. (1973). Regulation of Gene Expression in the Gordon-Kosswig Melanoma System. In *Genetics and Mutagenesis of Fish* (pp. 33–52). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-65700-9_4
- Anders, F., Scharl, M., Barnekow, A., & Anders, A. (1984). Xiphophorus as an In vivo Model for Studies on Normal and Defective Control of Oncogenes. In *Adv Cancer Res* (Vol. 42).
- Anders, Fritz. (1991). Contributions of the Gordon-Kosswig Melanoma System to the Present Concept of Neoplasia. *Pigment Cell Research*, 4(1), 7–29. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1991.tb00309.x>
- Anna, B., Blazej, Z., Jacqueline, G., Andrew, C. J., Jeffrey, R., & Andrzej, S. (2007). Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma. *Expert Review of Dermatology*, 2(4), 451–469. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.05.010>
- Anwar, S. L., Wulaningsih, W., & Lehmann, U. (2017). Transposable elements in human cancer: Causes and consequences of deregulation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18050974>
- Beauregard, A., Curcio, M. J., & Belfort, M. (2008). The Take and Give Between Retrotransposable Elements and their Hosts. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 587–617. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091549>
- Beck, C. R., Garcia-Perez, J. L., Badge, R. M., & Moran, J. V. (2011). LINE-1 Elements in Structural Variation and Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 12(1), 187–215. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082509-141802>
- Belancio, V. P., Roy-Engel, A. M., & Deininger, P. (2008). The impact of multiple splice sites in human L1 elements. *Gene*, 411(1–2), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.12.022>
- Böni, R., Schuster, C., Nehrhoff, B., & Burg, G. (2002). Epidemiology of skin cancer. *Neuroendocrinology Letters*, 23(SUPPL. 2), 48–51. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.146.s61.2.x>
- Bourque, G., Burns, K. H., Gehring, M., Gorbunova, V., Seluanov, A., Hammell, M., Imbeault, M., Izsvák, Z., Levin, H. L., Macfarlan, T. S., Mager, D. L., & Feschotte, C. (2018). Ten things you should know about transposable elements. In *Genome biology* (Vol. 19, Issue 1, p. 199). NLM (Medline). <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1577-z>
- Breider, H. (1952). Über Melanosarkome, Melaninbildung und homogene Zellmechanismen. *Strahlentherapie*, 88, 619–639.
- Britten, R. J., & Davidson, E. H. (1969). Gene regulation for higher cells: A theory.

- Science*, 165(3891), 349–357. <https://doi.org/10.1126/science.165.3891.349>
- Causes of death - Statistisches Bundesamt*, 2019. (n.d.). Retrieved January 16, 2021, from https://www.destatis.de/EN/Themes/Society-Environment/Health/Causes-Death/_node.html
- Chalopin, D., Naville, M., Plard, F., Galiana, D., & Volff, J. N. (2015). Comparative analysis of transposable elements highlights mobilome diversity and evolution in vertebrates. *Genome Biology and Evolution*, 7(2), 567–580. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv005>
- Chuong, E. B., Elde, N. C., & Feschotte, C. (2017). Regulatory activities of transposable elements: From conflicts to benefits. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 18, Issue 2, pp. 71–86). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.139>
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., & Tyminska, A. (2013). Skin melanocytes: Biology and development. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 30(1), 30–41. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33376>
- Cohen, C. J., Lock, W. M., & Mager, D. L. (2009). Endogenous retroviral LTRs as promoters for human genes: A critical assessment. In *Gene* (Vol. 448, Issue 2, pp. 105–114). <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.06.020>
- Desjardins, P. R., & Conklin, D. S. (2011). Microvolume quantitation of nucleic acids. *Current Protocols in Molecular Biology*, SUPPL.93, 1–4. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mba03js93>
- Doolittle, W. F., & Sapienza, C. (1980). Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, 284(5757), 601–603. <https://doi.org/10.1038/284601a0>
- Eickbush, T. H., & Furano, A. V. (2002). Fruit flies and humans respond differently to retrotransposons. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 12, Issue 6, pp. 669–674). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00359-3](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00359-3)
- Faulkner, G. J., Kimura, Y., Daub, C. O., Wani, S., Plessy, C., Irvine, K. M., Schroder, K., Cloonan, N., Steptoe, A. L., Lassmann, T., Waki, K., Hornig, N., Arakawa, T., Takahashi, H., Kawai, J., Forrest, A. R. R., Suzuki, H., Hayashizaki, Y., Hume, D. A., ... Carninci, P. (2009). The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nature Genetics*, 41(5), 563–571. <https://doi.org/10.1038/ng.368>
- Ferreira, D. C., Porto-Foresti, F., Oliveira, C., & Foresti, F. (2011). Transposable elements as a potential source for understanding the fish genome. *Mobile Genetic Elements*, 1(2), 112–117. <https://doi.org/10.4161/mge.1.2.16731>
- Feschotte, Cédric. (2008). Transposable elements and the evolution of regulatory networks. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 9, Issue 5, pp. 397–405). <https://doi.org/10.1038/nrg2337>
- Feschotte, Cleacuteldric, & Pritham, E. J. (2007). DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 41, pp. 331–368). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.40.110405.090448>
- Finnegan, D. J. (1989). Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in Genetics*, 5(C), 103–107. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(89\)90039-5](https://doi.org/10.1016/0168-9525(89)90039-5)
- Förnizler, D., Altschmied, J., Nanda, I., Kolb, R., Baudler, M., Schmid, M., & Scharl, M. (1996). The Xmrk Oncogene Promoter is Derived from a Novel Amplified Locus of Unusual Organization. *Genome Research*, 6, 102–113.
- Foulds, L. (1954). The Experimental Study of Tumor Progression: A Review. *Cancer Research*, 14(5).
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.2579435>
- Gómez, 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. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3333–3340. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006574200>
- Gordon, A. (1957). Maintenance of polymorphism by potentially injurious genes in eight natural populations of the Platyfish, *Xiphophorus maculatus*. *New York Aquarium, New York Zoological Society*, 55(1).
- Gordon, M. (1927). The Genetics of a Viviparous Top-Minnow *Platyocercus*; the Inheritance of Two Kinds of Melanophores. *Genetics*, 12, 253–283.
- Gutbrod, H., & Scharl, M. (1999). Intragenic sex-chromosomal crossover of Xmrk oncogene alleles affect pigment pattern formation and the severity of melanoma in *Xiphophorus*. *Genetics*, 151(2), 773–783.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>
- Hausmann, M. (2019). *Analyse der Genexpression verschiedener Kandidatengene und der Methylierung im Xiphophorus Melanom Analysing Gene Expression of Candidate Genes and Methylation in Xiphophorus Melanoma*. Universität Würzburg. <https://doi.org/10.25972/OPUS-20525>
- Häussler, G. (1928). Über Melanombildung bei Bastarden von *Xiphophorus helleri* und *Platyocercus maculatus* var. *rubra*. *Klin. Wochenschr.*, 33, 1561–1562.
- Hawryluk, E. B., & Tsao, H. (2014). *Insights*. 1–17.
- Hedges, D. J., & Deininger, P. L. (2007). Inviting instability: Transposable elements, double-strand breaks, and the maintenance of genome integrity. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 616(1–2), 46–59. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.11.021>
- Hermey, G., Mahlke, C., Schwake, M., & Sommer, T. (2010). *Der Experimentator*.
- Hirochika, H., Okamoto, H., & Kakutani, T. (2000). Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by the *ddm1* mutation. *Plant Cell*, 12(3), 357–368. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.3.357>
- Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J. P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D., Ramos, A. H., Lawrence, M. S., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Voet, D., Saksena, G., Stransky, N., Onofrio, R. C., ... Chin, L. (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, 150(2), 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.024>
- Hua-Van, A., Le Rouzic, A., Maisonhaute, C., & Capy, P. (2005). Abundance, distribution and dynamics of retrotransposable elements and transposons: Similarities and differences. *Cytogenetic and Genome Research*, 110(1–4), 426–440. <https://doi.org/10.1159/000084975>
- Jung, K. (2007). The Important Role of Melanin as Protector against Free Radicals in Skin. *SÖFW-Journal*, 133(August 2014), 26–33.
- Kallman, K. D. (1975). *Handbooks of genetics* (R. C. King (Ed.); 1st ed., Vol. 4). Plenum Press.
- Kallman, K. D., & Kazianis, S. (2006). The Genus *Xiphophorus*; Kallman .pdf. *Zebrafish*, 3(3), 15.
- Kazazian, H. H., Wong, C., Youssoufian, H., Scott, A. F., Phillips, D. G., & Antonarakis, S. E. (1988). Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1

- sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature*, 332(6160), 164–166. <https://doi.org/10.1038/332164a0>
- Kidwell, M. G. (2002). Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica*, 115(1), 49–63. <https://doi.org/10.1023/A:1016072014259>
- Kidwell, M. G., & Lisch, D. R. (2000). Transposable elements and host genome evolution. In *Trends in Ecology and Evolution* (Vol. 15, Issue 3, pp. 95–99). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01817-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01817-0)
- Kong, Y., Rose, C. M., Cass, A. A., Williams, A. G., Darwish, M., Lianoglou, S., Haverty, P. M., Tong, A. J., Blanchette, C., Albert, M. L., Mellman, I., Bourgon, R., Greally, J., Jhunjhunwala, S., & Chen-Harris, H. (2019). Transposable element expression in tumors is associated with immune infiltration and increased antigenicity. *Nature Communications*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13035-2>
- Koressaar, T., & Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, 23(10), 1289–1291. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm091>
- Kosswig, C. (1928). Über Kreuzungen zwischen den Teleostiern *Xiphophorus helleri* und *Platyepocilus maculatus*. *Indukt Abstammung-Vererbungslehre*, 47, 150–158.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Li, J. L., Mazar, J., Zhong, C., Faulkner, G. J., Govindarajan, S. S., Zhang, Z., Dinger, M. E., Meredith, G., Adams, C., Zhang, S., Mattick, J. S., Ray, A., & Perera, R. J. (2013). Genome-wide methylated CpG island profiles of melanoma cells reveal a melanoma coregulation network. *Scientific Reports*, 3, 2962. <https://doi.org/10.1038/srep02962>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Maksakova, I. A., Romanish, M. T., Gagnier, L., Dunn, C. A., van de Lagemaat, L. N., & Mager, D. L. (2006). Retroviral Elements and Their Hosts: Insertional Mutagenesis in the Mouse Germ Line. *PLoS Genetics*, 2(1), e2. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020002>
- McClintock, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 36(6), 344–355. <https://doi.org/10.1073/pnas.36.6.344>
- McClintock, B. (1951). Chromosome organization and genic expression. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 16, 13–47. <https://doi.org/10.1101/SQB.1951.016.01.004>
- Medstrand, P., Landry, J. R., & Mager, D. L. (2001). Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3), 1896–1903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006557200>
- Mills, R. E., Bennett, E. A., Iskow, R. C., & Devine, S. E. (2007). Which transposable elements are active in the human genome? In *Trends in Genetics* (Vol. 23, Issue 4, pp. 183–191). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.006>
- Mita, P., & Boeke, J. D. (2016). How retrotransposons shape genome regulation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 37, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.01.001>

- Munoz-Lopez, M., & Garcia-Perez, J. (2010). DNA Transposons: Nature and Applications in Genomics. *Current Genomics*, *11*(2), 115–128. <https://doi.org/10.2174/138920210790886871>
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, *194*(4260), 23–28. <https://doi.org/10.1126/science.959840>
- Orgel, L. E., & Crick, F. H. C. (1980). Selfish DNA: The ultimate parasite. *Nature*, *284*(5757), 604–607. <https://doi.org/10.1038/284604a0>
- Ozato, K., & Wakamatsu, Y. (1983). Multi-step genetic regulation of oncogene expression in fish hereditary melanoma. *Differentiation*, *24*(1–3), 181–190. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1983.tb01318.x>
- Plasterk, R. H. (1991). The origin of footprints of the Tc1 transposon of *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO Journal*, *10*(7), 1919–1925. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07718.x>
- Pritham, E. J., Feschotte, C., & Wessler, S. R. (2005). Unexpected diversity and differential success of DNA transposons in four species of *Etamoeba* protozoans. *Molecular Biology and Evolution*, *22*(9), 1751–1763. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi169>
- Raposo, G., & Marks, M. S. (2009). Transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(10), 786–797. <https://doi.org/10.1038/nrm2258>. Melanosomes
- Rebollo, R., Romanish, M. T., & Mager, D. L. (2012). Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes. *Annual Review of Genetics*, *46*, 21–42. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155621>
- Regneri, J., & Scharl, M. (2012). Expression regulation triggers oncogenicity of xmrk alleles in the *Xiphophorus* melanoma system. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *155*(1), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.04.003>
- Regneri, J., Volff, J. N., & Scharl, M. (2015). Transcriptional control analyses of the *Xiphophorus* melanoma oncogene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, *178*, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.09.001>
- Robert, C., & Watson, M. (2015). Errors in RNA-Seq quantification affect genes of relevance to human disease. *Genome Biology*, *16*(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0734-x>
- Saleh, A., Macia, A., & Muotri, A. R. (2019). Transposable elements, inflammation, and neurological disease. *Frontiers in Neurology*, *10*(AUG). <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00894>
- SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y. K., Motchoulskaia, N., Zakharov, D., Melake-Berhan, A., Springer, P. S., Edwards, K. J., Lee, M., Avramova, Z., & Bennetzen, J. L. (1996). Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science*, *274*(5288), 765–768. <https://doi.org/10.1126/science.274.5288.765>
- Scharl, A., Dimitrijevic, N., & Scharl, M. (1994). Evolutionary Origin and Molecular Biology of the Melanoma-Inducing Oncogene of *Xiphophorus*. *Pigment Cell Research*, *7*(6), 428–432. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1994.tb00072.x>
- Scharl, M. (2014). Beyond the zebrafish: Diverse fish species for modeling human disease. In *DMM Disease Models and Mechanisms* (Vol. 7, Issue 2, pp. 181–192). The Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dmm.012245>
- 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., & Walter, R. B. (2016). *Cancer and Zebrafish*. 916, 531–552. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-30654-4>
- Schartl, M., Walter, R. B., Shen, Y., Garcia, T., Catchen, J., Amores, A., Braasch, I., Chalopin, D., Volff, J. N., Lesch, K. P., Bisazza, A., Minx, P., Hillier, L., Wilson, R. K., Fuerstenberg, S., Boore, J., Searle, S., Postlethwait, J. H., & Warren, W. C. (2013). The genome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, provides insights into evolutionary adaptation and several complex traits. *Nature Genetics*, 45(5), 567–572. <https://doi.org/10.1038/ng.2604>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schumann, G. G. (2007). APOBEC3 proteins: Major players in intracellular defence against LINE-1-mediated retrotransposition. *Biochemical Society Transactions*, 35(3), 637–642. <https://doi.org/10.1042/BST0350637>
- Schwab, M., Abdo, S., Schartl, M., & Siegers, J. (1979). Tumoren beim Zahnkarpfen *Xiphophorus* als Modelle in der Krebsforschung. *Mikrokosmos*, 10, 302–309.
- Shao, F., Wang, J., Xu, H., & Peng, Z. (2018). FishTEDB: a collective database of transposable elements identified in the complete genomes of fish. *Database*, 2018(2018), 106. <https://doi.org/10.1093/database/bax106>
- Spandidos, D. A. (1985). Mechanism of Carcinogenesis: The Role of Oncogenes, Transcriptional Enhancers and Growth Factors. *Anticancer Research*, 5, 485–498.
- Stowers, S. J., Maronpot, R. R., Reynolds, S. H., & Anderson, M. W. (1987). The role of oncogenes in chemical carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 75, 81–86. <https://doi.org/10.2307/3430580>
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719–724. <https://doi.org/10.1038/nature07943>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vela, D., Fontdevila, A., Vieira, C., & García Guerreiro, M. P. (2014). A Genome-Wide Survey of Genetic Instability by Transposition in *Drosophila* Hybrids. *PLoS ONE*, 9(2), e88992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088992>
- Vielkind, U., Schlage, W., & Anders, F. (1977). Melanogenesis in genetically determined pigment cell tumors of platyfish and platyfish-swordtail hybrids: correlation between tyrosinase activity and degree of malignancy. *Zeitschrift Für Krebsforschung Und Klinische Onkologie*, 90(3), 285–299. <https://doi.org/10.1007/BF00284302>
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science*, 339(6127), 1546–1558. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>
- Volff, J. N., Körting, C., Froschauer, A., Zhou, Q., Wilde, B., Schultheis, C., Selz, Y., Sweeney, K., Duschl, J., Wichert, K., Altschmied, J., & 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. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(03\)00168-X](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(03)00168-X)
- Weinberg, R. (1991). Tumor suppressor genes. *Science*, 254(5035), 1138–1146.

- <https://doi.org/10.1126/science.1659741>
- Weis, S., & Schartl, M. (1998). The macromelanophore locus and the melanoma oncogene Xmrk are separate genetic entities in the genome of *Xiphophorus*. *Genetics*, *149*(4), 1909–1920.
- Weissenfels, N., Schäfer, D., & Bretthauer, R. (1970). Über die entartung der makromelanophoren und den Einfluß des infiltrierenden melanomwachstums auf die muskulatur von Poeciliiden-Bastarden. *Virchows Archiv B Cell Pathology Zell-Pathologie*, *5*(1), 144–158. <https://doi.org/10.1007/BF02893558>
- 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. *Experimental Cell Research*, *251*(2), 340–349. <https://doi.org/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. *European Journal of Biochemistry*, *260*(1), 275–283. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00180.x>
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J. L., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., SanMiguel, P., & Schulman, A. H. (2007). A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, *8*(12), 973–982. <https://doi.org/10.1038/nrg2165>
- Wittbrodt, J., Adam, D., Malitschek, B., Mäueler, W., Raulf, F., Telling, a, Robertson, S. M., & Schartl, M. (1989). Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing Tu locus in *Xiphophorus*. *Nature*, *341*(6241), 415–421. <https://doi.org/10.1038/341415a0>
- Xie, M., Hong, C., Zhang, B., Lowdon, R. F., Xing, X., Li, D., Zhou, X., Lee, H. J., Maire, C. L., Ligon, K. L., Gascard, P., Sigaroudinia, M., Tlsty, T. D., Kadlecsek, T., Weiss, A., O'Geen, H., Farnham, P. J., Madden, P. A. F., Mungall, A. J., ... Wang, T. (2013). DNA hypomethylation within specific transposable element families associates with tissue-specific enhancer landscape. *Nature Genetics*, *45*(7), 836–841. <https://doi.org/10.1038/ng.2649>

Eidesstaatliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Die Rolle transposabler Elemente in der Genese des malignen Melanom im Fischmodell *Xiphophorus*“ 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 “The role of transposable elements in the malignant melanoma development in the *Xiphophorus* fish model” 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