

Untersuchungen zur genetischen Kontrolle des melanom-
induzierenden Gens von *Xiphophorus*:
Kartierung des *Xmrk*-spezifischen Regulatorlocus *R* und
molekulare Analyse von *Xmrk* Mutanten

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Heidrun Gutbrod
aus
Gemünden

Würzburg, 1999

1. Einleitung	1
1.1 Genveränderungen als Ursache der Tumorentstehung	1
1.2 Chromosomale Rekombination	2
1.3 Rekombination als Grundlage der Entstehung zahlreicher Mutationen	4
1.4 Das Xiphophorus Melanom-System	5
1.5 Zielsetzung	11
2. Material	14
2.1 Fische	14
2.2 Fischzelllinien	16
2.3 Bakterienstämme	16
2.4 Vektoren	16
2.5 Oligonukleotide	16
2.6 Hybridisierungssonden	18
2.7 Enzyme und Enzymkits	19
2.8 Radiochemikalien	19
2.9 Nylonmembranen	19
2.10 Medien, Stammlösungen und Puffer	19
2.11 Sonstige Chemikalien	20
2.12 Geräte	20
3. Methoden	22
3.1 Isolierung hochmolekularer DNA (nach Blin & Stafford, 1976)	22
3.2 Präparation von Rückenflossen-DNA ("Fin Clip" Methode)	22
3.3 Präparation von Plasmid-DNA in kleinem und mittlerem Maßstab	23
3.4 Präparation von Phagen-DNA in kleinem Maßstab	23
3.5 DNA-Gelelektrophorese	24
3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese	24
3.5.2 Native Polyacrylamidgele	25
3.5.3 Denaturierende Polyacrylamidgele	25
3.6 Konzentrationsbestimmung von DNA	25
3.6.1 Vergleichende Konzentrationsbestimmung im Agarosegel	25
3.6.2 Spektralphotometrische Bestimmung	25

3.7	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	26
3.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
3.9	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden am 5'-Ende	26
3.10	Phenolextraktion	26
3.11	Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch Polymerasekettenreaktion (PCR; Saiki et al., 1988)	27
3.12	Klonierung von PCR-Fragmenten	27
3.13	Ligation	28
3.14	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	28
3.15	Transformation kompetenter Bakterien	29
3.16	Anlegen von Bakterien-Dauerkulturen	29
3.17	Herstellung von "plating" Bakterien	29
3.18	Phagentiterbestimmung eines Plattenlysats und Phagenamplifizierung	29
3.19	"Single Strand Conformation Polymorphism" (SSCP)	30
3.20	Southern Analyse	30
3.20.1	Alkalischer Transfer von DNA auf eine Nylonmembran	31
3.20.2	Radioaktive Markierung eines DNA-Fragments (nach Feinberg & Vogelstein, 1983)	31
3.20.3	Hybridisierung	32
3.21	Methoden des DNA-Fingerabdrucks	33
3.21.1	"Arbitrarily Primed PCR" (AP-PCR; Welsh & Mc Clelland, 1990)	33
3.21.2	"Amplified Fragment Length Polymorphism" (AFLP)	33
3.22	Enzymatische Sequenzanalyse von DNA	35
3.22.1	Sequenzierung von Plasmid-DNA	35
3.22.2	Sequenzierung von PCR-Produkten	35
3.23	Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	35
3.24	Analyse der Genexpression durch RT-PCR	36
3.25	Analyse von DNaseI hypersensitiven Chromosomenabschnitten	36
3.26	Proteinbiochemische Methoden	38
3.26.1	Präparation von Proteinextrakten aus Fischgewebe	38
3.26.2	Stärkegelelektrophorese (modifiziert nach Siciliano & Shaw, 1976)	38
3.26.3	Nachweis von Isoenzymen durch Substratfärbung (Shaw & Prasad, 1970)	39
3.27	Zellbiologische Methoden	39
3.27.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	39
3.27.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	40

4. Ergebnisse	41
4.1 Kartierung des Tumorregulatorgens <i>R</i>	41
4.1.1 Untersuchung von Bastarden aus höheren Rückkreuzungen	41
4.1.1.1 Kopplung von <i>ESI</i> -Enzymlocus zu <i>R</i>	41
4.1.1.2 Melanomphänotyp	43
4.1.2 Molekulare Marker für <i>R</i>	44
4.1.2.1 AP-PCR und AFLP-Analysen	44
4.1.2.2 Vergleich der Methoden AP-PCR und AFLP	48
4.1.2.3 Untersuchung des Kandidatengens <i>CDKN2X</i> und <i>XDNMT-1</i> auf Kopplung zu <i>R</i>	50
4.1.3 Erstellen einer Genkarte	51
4.2 Analyse von verschiedenen <i>Xmrk</i> Mutanten	52
4.2.1 Genomische Struktur des <i>Xmrk</i> Onkogens	53
4.2.2 Vergleich mit dem EGF-Rezeptorgen des Hühnchens (<i>Gallus gallus</i>)	54
4.2.3 Unterschiede zwischen X- und Y-Kopie des <i>Xmrk</i> Onkogens	55
4.2.4 Analyse zweier "loss of function" (Lof) Mutanten	58
4.2.4.1 Lof-2	58
4.2.4.2 Lof-3	61
4.2.5 Untersuchung der Sr ⁻ -Mutante	62
4.2.6 Analyse von Crossover Mutanten des <i>Xmrk</i> Onkogens	63
4.2.7 Lokalisierung des <i>Xmrk</i> Protoonkogens	72
4.3 Untersuchung der Chromatinstruktur im <i>Xmrk</i> Onkogen	74
5. Diskussion	77
5.1 Der Tumorregulatorlocus <i>R</i>	77
5.1.1 Segregation der Tumorphänotypen und Kopplung von <i>ESI</i> und <i>R</i>	77
5.1.2 Molekulare Marker für <i>R</i>	79
5.1.3 <i>CDKN2X</i> und <i>XDNMT-1</i> als Kandidaten für <i>R</i> ?	80
5.1.4 Genkarte von Kopplungsgruppe V von <i>Xiphophorus</i>	81
5.2 Untersuchung der <i>Xmrk</i> Funktion durch Analyse verschiedener <i>Xmrk</i> Mutanten	83
5.2.1 Ausfall der Melanombildung durch Deletion des <i>Xmrk</i> Onkogens	85
5.2.2 Anzeichen für einen Rekombinations-"Hotspot" im <i>Xmrk</i> Onkogen	87
5.2.3 Kartierung der Region um die <i>Xmrk</i> Gene auf den Geschlechtschromosomen durch Analyse von <i>Xmrk</i> Crossover-Mutanten	89

5.2.4	Identifizierung einer genregulatorischen Region in <i>Xmrk</i>	91
6.	Zusammenfassung und Ausblick	95
	Summary and perspectives	98
7.	Anhang	100
8.	Literatur	