

4. Ergebnisse

4.1 Kartierung des Tumorregulatorgens *R*

In einer vorangegangenen im Rahmen einer Dissertation (Förnizler, 1994) durchgeführten Untersuchung konnte die Kopplung zwischen einer Tumorregulatoraktivität *R* und einem Esterase-Isoenzymlocus, *ESI*, die bereits zuvor postuliert worden war (Siciliano et al., 1976b, Ahuja et al., 1980), bestätigt werden. Die Untersuchung von 250 Rückkreuzungsbastarden der ersten Rückkreuzungsgeneration (BC_1) hatte eine Rekombinationshäufigkeit von 30,4% ergeben. Bislang war nicht zu entscheiden, ob das an der Kontrolle der Tumorentwicklung beteiligte Autosom (Anders et al., 1973) einen einzigen regulatorischen Locus beinhaltet oder aber eine polyfaktorielle Regulation der Tumorentwicklung vorliegen könnte. Zudem stand keine Genkarte zur Verfügung, die die Voraussetzung für eine Positionsklonierung von *R* darstellt.

4.1.1 Untersuchung von Bastarden aus höheren Rückkreuzungen

Eine Beantwortung der Frage, ob mit *R* ein alleiniger regulatorischer Locus vorliegt oder aber mehrere Faktoren an der Tumorkontrolle beteiligt sind, könnte durch Analyse der Rekombinationshäufigkeit zwischen *ESI* und dem Tumorphänotyp an Bastarden aus höheren Rückkreuzungen möglich werden. Diese sollte im Fall nur eines beteiligten Genlocus im Verlauf der Generationen unter der Voraussetzung gleich bleiben, daß für die Weiterzucht nur Bastarde des parental Genotyps eingesetzt werden, die einen gutartigen Tumor bei Vorhandensein der Esterase^{1a}-Isoform (R^+/ESI^a) aufweisen. Im Falle mehrerer Regulatoren wäre dagegen ein allmählicher Verlust der Kopplung von *ESI* und *R* zu erwarten. Anstelle einer je 50% Verteilung gutartiger und bösartiger Tumorphänotypen würden mit steigender Rückkreuzungsgeneration zunehmend mehr Nachkommen mit malignem Tumor auftreten.

4.1.1.1 Kopplung von *ESI*-Enzymlocus zu *R*

Im Zeitraum dieser Arbeit standen Rückkreuzungshybride aus der zweiten bis fünften Rückkreuzung von *X. maculatus* (Rio Jamapa, Mdl^{Sd} -ONC-*Xmrk*) nach *X. helleri* zur Verfügung. Daneben wurden 18 weitere BC_1 -Fische zur Aufstockung der bereits vorhandenen Daten genutzt. Der Tumorphänotyp der Fische wurde makroskopisch unter Verwendung des

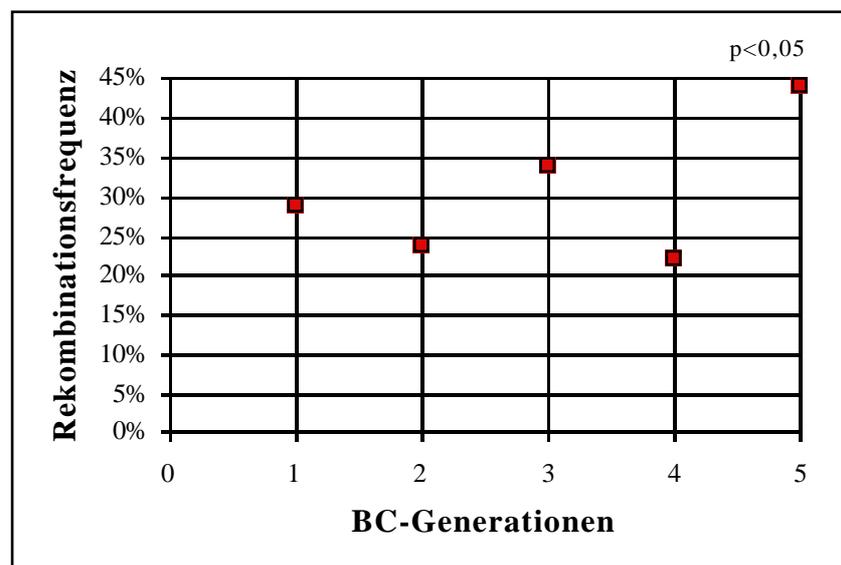
Kriteriums von invasivem Wachstum als Merkmal für maligne Tumoren bestimmt. Die Analyse der beiden Esterase1-Allele erfolgte nach Auftrennung der Proteinextrakte in einem 13%igen Stärkegel und einer Substratfärbung mit α -Naphthylpropionat (Förnzler, 1991).

Die Erhöhung der Zahl der Fische aus der BC₁-Generation von 250 auf 268 führte zu einer Verringerung der Rekombinationshäufigkeit zwischen *ESI^a* und *R* von 30,4% auf 29,5%. Die von den BC₁-BC₅ Generationen erhaltenen Werte zeigen alternierend Abweichungen von diesem Wert nach oben und unten, eine signifikante Abweichung ergab sich jedoch nur für die fünfte Rückkreuzungsgeneration (χ^2 -Test, $p < 0,05$). Die Rekombinationshäufigkeit für BC₅ läßt bei 87 untersuchten Tieren sogar keinen Rückschluß mehr auf eine Kopplung von *ESI^a* und *R* zu (lod score: 0,3).

Tab. 2: Kopplungsanalyse von *R* mit *ESI* in Fischen der Rückkreuzungsgenerationen BC₁-BC₅ (p, Rekombinationshäufigkeit)

Generation	parental	rekombinant	p [%]	lod score
BC ₁	189	79	29,5	10,1
BC ₂	85	27	24,1	6,6
BC ₃	74	38	33,9	2,6
BC ₄	53	15	22,1	4,7
BC ₅	49	38	43,7	0,3

Diagramm 1: Rekombinationshäufigkeiten von *R* und *ESI* in Fischen der Rückkreuzungsgenerationen BC₁-BC₅



Von der BC₂-BC₅ zeigt nur die BC₅ eine signifikante Abweichung von den 29,5% Rekombinationsrate der BC₁.

4.1.1.2 Melanomphänotyp

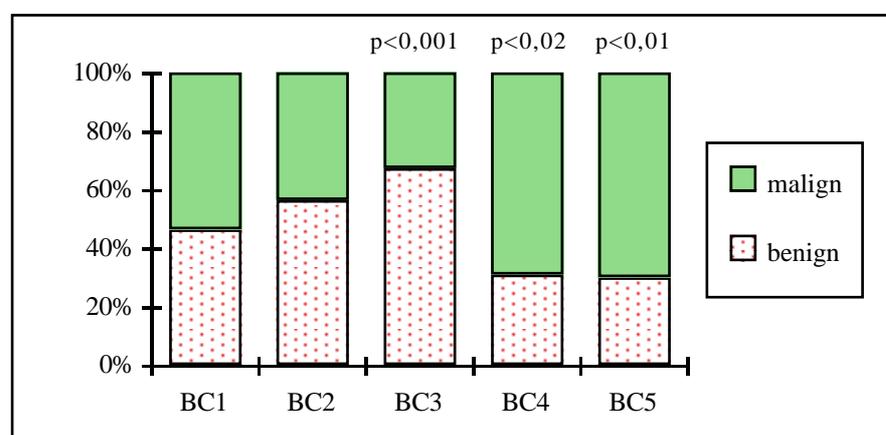
Geht man von der Annahme aus, daß die Tumorbildung nur von einem einzigen Genlocus reguliert wird, wäre zu erwarten, daß von den Tieren unter den Rückkreuzungsgenerationen, die das Tumor-verursachende *Xmrk* Onkogen erben, gleichbleibend die Hälfte der Fische ein gutartiges, die andere Hälfte ein bösartiges Melanom ausprägen.

Tab. 3: Auftreten benigner und maligner Tumoren bei Fischen der Rückkreuzungsgenerationen BC₁-BC₅ (n, Anzahl der analysierten Fische)

Generation	benign	malign	n
BC ₁	125	143	268
BC ₂	63	49	112
BC ₃	75	37	112
BC ₄	21	47	68
BC ₅	26	61	87

Die makroskopische Klassifizierung der Rückkreuzungshybriden zeigte, daß ab der dritten Rückkreuzungsgeneration eine signifikante Abweichung von der erwarteten 1:1 Verteilung benigner zu maligner Tumoren auftritt (siehe Diagramm 2).

Diagramm 2: Aufteilung von benignen und malignen Phänotypen bei BC₁-BC₅



4.1.2 Molekulare Marker für R

Die folgenden Analysen zur Detektion molekularer Markersequenzen für den regulatorischen Genlocus *R* wurden an Fischen der ersten Rückkreuzungsgeneration durchgeführt. Dem lagen die Überlegungen zugrunde, durch Minimierung der Anzahl durchlaufener Meiosen auch Marker zu erhalten, die außerhalb des Segments *ESI^a-R* positioniert sind und aufgrund des Fehlens anderer Selektionsmarker in höheren Rückkreuzungsgenerationen andernfalls verlorengehen könnten.

4.1.2.1 AP-PCR und AFLP-Analysen

Das bereits mit der Diplomarbeit (Gutbrod, 1996) begonnene Projekt der Markeranalyse mittels der Methode der radioaktiven AP-PCR wurde fortgeführt, wobei die Oligonukleotide OPA16-20 und U1-U7 zur Anwendung kamen. Alle Marker wurden auf korrekte Vererbung nach den Mendelschen Regeln überprüft (χ^2 -Test) und solche mit $p < 0,02$ nicht in die Auswertung miteinbezogen. Es wurden zunächst 18 Fische der parental Genotypen (*X. maculatus*: *ESI^a/R⁺* und *X. helleri*: *ESI^b/R⁻*) zusammen mit je zwei Fischen der Elternarten auf das Vorkommen polymorpher Marker getestet. Trat dabei ein Marker kandidat auf, der Kopplung zu *ESI^a/R⁺* -Fischen zeigte, wurden weitere Individuen analysiert. Die Einbeziehung von Rekombinanten (*ESI^a/R⁻* und *ESI^b/R⁺*) erlaubte eine ungefähre positionelle Eingliederung gegenüber *Esterase1*- und *R*-Genlocus.

Die Gesamtheit der mit den oben genannten Primern detektierten *X. maculatus* spezifischen Marker ist im Anhang in den Tab. 13 und 14 aufgeführt. Die Anzahl der zu Kopplungsgruppe V zählenden Markersequenzen konnte von drei (10.1, 12.1, 13.3; Gutbrod, 1996) auf fünf erhöht werden.

Tab. 4: Kopplung der AP-PCR Marker 10.1, 12.1, 13.3, 18.2 und 19.5 zu *R*

Name des Markers	n	parental	rekombinant	p	lod score
10.1	43	29	14	0,33	1,2
12.1	42	28	14	0,33	1,0
13.3	31	18	13	0,42	0,2
18.2	40	28	12	0,30	1,4
19.5	43	31	12	0,28	1,9

Abkürzungen: n, Anzahl der getesteten Individuen; p, Rekombinationshäufigkeit

Tab. 5: Kopplung der AP-PCR Marker 10.1, 12.1, 13.3, 18.2 und 19.5 zu *ES 1^a* (Abkürzungen siehe Tab.4)

Name des Markers	n	parental	rekombinant	p	lod score
10.1	71	69	2	0,03	17,4
12.1	70	70	0	0,00	21,1
13.3	57	51	6	0,11	8,8
18.2	63	55	8	0,13	8,6
19.5	70	59	11	0,16	7,9

Während alle fünf Markersequenzen eine zum Teil starke Kopplung zum *Esterase1*-Enzymlocus zeigen, ist keine gesicherte Kopplung zum Tumorerregulatorlocus *R* erkennbar (lod score < 3).

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von D. C. Morizot am MD ANDERSON CANCER CENTER in Texas, U.S.A. sollte untersucht werden, ob die neu detektierten Marker auch in anderen *Xiphophorus* Kreuzungen eine Kopplung zeigen. Gegebenenfalls könnten diese in die bereits bestehende Genkarte von *Xiphophorus*, die zum damaligen Zeitpunkt 17 Kopplungsgruppen umfaßte (Kazianis et al., 1996), integriert werden. Für diese Analyse wurden DNAs aus folgenden Kreuzungen getestet:

Kreuzung 1: *X. hell* Rio Sarabia x (*X. mac* Rio Jamapa 163B x *X. hell* Rio Sarabia)

Kreuzung 2: *X. hell* Rio Sarabia x (*X. mac* Rio Jamapa 163A x *X. hell* Rio Sarabia)

Im Gegensatz zu der in unserem Labor verwendeten klassischen Kreuzung wurden hier *X. helleri* Tiere eines anderen Fundortes, nämlich Rio Sarabia anstelle von Rio Lancetilla als rekurrentes Elternteil eingesetzt. *X. maculatus* Tiere Jp 163B weisen das Makromelanophoren-muster Sp auf, wohingegen der Stamm Jp 163A das Sd-Muster trägt. Letzterer entspricht dem Genotyp von *X. maculatus*, der in der klassischen Kreuzung verwendet wird. Das Ergebnis dieser Kopplungsanalyse ist in den Tabellen 6 und 7 dargestellt.

Die Marker 12.1 und 13.3 waren in beiden Kreuzungen (1, 2, Texas) nicht polymorph und konnten somit nicht übertragen werden. 10.1, 18.2 und 19.5 zeigten gegenüber unserer Kreuzung (klassische Kreuzung, Würzburg) eine vergleichbare Kopplung zu *ES1^a*, eine Kopplung zum Tumorphänotyp war auch in den beiden anderen Kreuzungen nicht festzustellen. Bei Vereinigung der Daten aus allen drei Kreuzungen bleiben die Rekombinationshäufigkeiten der Marker 10.1, 18.2 und 19.5 zu *ES1^a* ungefähr gleich, der lod score erhöht sich erwartungsgemäß aufgrund der vergrößerten Individuenzahl. Die

Rekombinationsfrequenzen dieser Marker zu *R* zeigen jeweils einen intermediären Wert (10.1: 34%, 18.2: 37%, 19.5: 35%; vergleiche Tab. 4 und 6), doch trotz erhöhter Individuenzahl bleibt der lod score unter drei. Neben den übertragbaren Markern wurde ein weiterer Marker (10.2) detektiert, der Kopplung zum Enzymlocus zeigte. Fünf weitere neu aufgetretene Polymorphismen konnten anderen Kopplungsgruppen zugeordnet werden (Kopplungsgruppen IV, XII, U16, U18, U19; Morizot et al., 1998).

Tab. 6: Kopplung der AP-PCR Marker 10.x, 18.x und 19.5 zu *R*; die Daten der zwei Kreuzungen wurden zusammengefaßt (Abkürzungen siehe Tab. 4)

Name des Markers	n	parental	rekombinant	p	lod score
10.0*	71	44	27	0,38	0,9
10.1	68	44	24	0,35	1,3
10.2*	59	35	24	0,41	0,5
10.2a*	60	33	27	0,45	0,1
10.3*	50	32	18	0,36	0,9
18.0*	27	11	16	0,59	0,2
18.1*	62	30	32	0,52	0,0
18.2	44	25	19	0,43	0,2
19.5	50	29	21	0,42	0,3

*: in diesen Kreuzungen neu detektierte Markersequenzen

Tab. 7: Kopplung von AP-PCR Markern zu *ESI^a*; zusammengefaßte Daten (Abkürzungen siehe Tab. 4)

Name des Markers	n	parental	rekombinant	p	lod score
10.0*	134	60	74	0,55	0,3
10.1	126	121	5	0,04	28,8
10.2*	110	87	23	0,21	8,6
10.2a*	110	51	59	0,54	0,1
10.3*	96	55	41	0,43	0,4
18.0*	61	27	34	0,56	0,2
18.1*	126	66	60	0,48	0,1
18.2	84	74	10	0,12	12,0
19.5	95	79	16	0,17	9,9

*: in diesen Kreuzungen neu detektierte Markersequenzen; Mitglieder von Kopplungsgruppe V sind fettgedruckt hervorgehoben

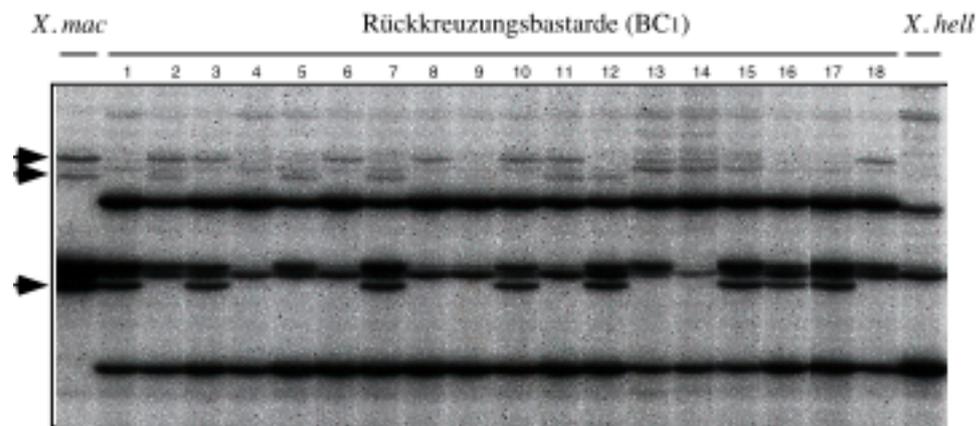


Abb. 5: AP-PCR mit dem Primer OPA-10 bei Parental- und BC₁-Fischen der Kreuzung 2. Die Pfeile markieren die Marker 10.2, 10.2a und 10.3.

Die Effizienz der Markerkartierung durch AP-PCR sollte mit der einer anderen Technik, der AFLP-Analyse verglichen werden. Es wurde zunächst überprüft, ob die von Vos et al. (1995) beschriebene Enzymkombination aus *EcoRI* und *MseI* auch für die Anwendung bei *Xiphophorus* geeignet wäre. Die Spaltung genomischer DNA von Mensch, Zebrafisch und *Xiphophorus* zeigte nach Auftrennung in einem Agarosegel Produkte, die sich im selben Größenbereich mit Hauptanteil bis 1300 bp vergleichbar verteilten (Daten nicht gezeigt). Dies lag im Bereich der durch PCR problemlos amplifizierbaren Länge, so daß diese Enzymkombination als geeignet ausgewählt wurde. Der Test von Primern mit drei selektiven Nukleotiden (siehe 3.21.2) an DNA der beiden Elternarten ergab eine ausreichende Komplexität des Bandenmusters im Autoradiogramm. Hierauf wurden verschiedene +3-Primerkombinationen an 18 DNAs von Bastarden der ersten Rückkreuzungsgeneration angewendet. Interessante Markersequenzen wurden an einer größeren Anzahl von BC₁-Fischen überprüft. Alle *X. maculatus* spezifischen polymorphen Marker sind im Anhang in Tab. 15 aufgeführt.

Durch AFLP-Analyse konnten 4 Marker detektiert werden, die mit dem *EsteraseI^a*-Isoenzymlocus kosegregieren. Zwei dieser Marker (K2.3, K31.9) zeigen ebenfalls eine Kopplung zum gutartigen Tumorphänotyp. Dieselbe Rekombinationshäufigkeit von K2.3 und K31.9 zu *R* läßt vermuten, daß die beiden Marker an gleicher Position auf dem Chromosom lokalisiert sind. Daß dies nicht der Fall ist, zeigt der genetische Abstand der beiden Marker zu *ESI^a*, der für K2.3 ca. 5 cM, für K31.9 dagegen etwa 11 cM beträgt. In Übereinstimmung damit beläuft sich der Abstand der Marker zueinander auf ungefähr 16 cM (lod score: 9,1).

Tab. 8: Kopplung der AFLP-Marker K2.3, K11.7, K13.7, K15.9, K19.1, K27.x, K31.9, K32.x zu *R*

Name des Markers	n	parental	rekombinant	p	lod score
K2.3	64	47	17	0,27	3,2
K11.7	64	40	24	0,38	0,9
K13.7	62	38	24	0,39	0,7
K15.9	36	22	14	0,39	0,4
K19.1	62	42	20	0,32	1,7
K27.3	64	43	21	0,33	1,7
K27.6	63	44	19	0,30	2,2
K31.9	64	47	17	0,27	3,2
K32.1	36	22	14	0,39	0,4
K32.10	36	23	13	0,36	0,6

Abkürzungen: n, Anzahl der getesteten Fische; p, Rekombinationshäufigkeit; Marker, die eine Kopplung zu *R* zeigen, sind fettgedruckt hervorgehoben

Tab. 9: Kopplung von AFLP-Markern zu *ESI^a*

Name des Markers	n	parental	rekombinant	p	lod score
K2.3	82	78	4	0,05	17,7
K11.7	82	64	18	0,22	5,9
K13.7	62	43	19	0,31	2,1
K15.9	36	25	11	0,31	1,2
K19.1	82	47	35	0,43	0,4
K27.3	82	42	40	0,49	0,0
K27.6	81	73	8	0,10	13,0
K31.9	82	73	9	0,11	12,4
K32.1	36	25	11	0,31	1,2
K32.10	36	26	10	0,28	1,6

Abkürzungen siehe Tab. 8; die mit *ESI^a* kosegregierenden Marker sind fettgedruckt hervorgehoben

4.1.2.2 Vergleich der Methoden AP-PCR und AFLP

Die Durchführbarkeit der von Welsh et al. (1991) beschriebenen Methode der AP-PCR und die von Vos et al. (1995) dargestellte AFLP-Analyse ist vergleichbar einfach. Die jeweils benötigte DNA-Menge pro Reaktion beträgt 20 bzw. 6,5 ng, der Zeitaufwand ist ähnlich gering, da die

zusätzlichen Restriktionsspaltungs- und Präamplifizierungsschritte bei der AFLP-Methode nicht mit jeder neuen Primerkombination durchzuführen sind.

Für die Kartierung von *R* wurden insgesamt 33 verschiedene Oligonukleotide in AP-PCR Reaktionen eingesetzt. Die Gesamtzahl der mit diesen detektierten *X. maculatus* spezifischen, auswertbaren Polymorphismen betrug 91, dies entspricht im Mittel 2,8 Banden je Primer. Durch AFLP wurden mit 35 verschiedenen Primerkombinationen 298 *X. maculatus* spezifische Marker erkannt, im Mittel 8,5 Banden je Kombination. Diese Diskrepanz beruht zum großen Teil darauf, daß bei der AP-PCR mit 9 Primern keine Polymorphismen zu finden waren, weil entweder die Bandenkomplexität insgesamt sehr gering war oder sich keinerlei Produkte ergaben. Dieser Fall trat bei der AFLP-Technik nur einmal ein. Auch in der Reproduzierbarkeit zeigte sich die Überlegenheit der AFLP-Technik. So stellte es kein Problem dar, Markerdaten auf beliebig viele Individuen auszudehnen, wohingegen es nicht gelang, nach längerem Zeitraum weitere Daten über die AP-PCR Marker 18.2 und 19.5 zu erhalten. Im Fall von 18.2 konnte auf der erwarteten Höhe im Gel kein Polymorphismus entdeckt werden, während bei 19.5 in der mehrfach wiederholten PCR keinerlei Produkte gebildet wurden.

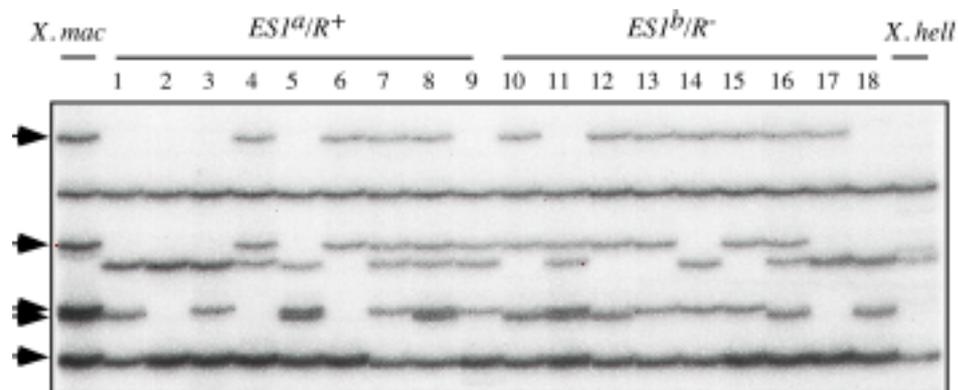


Abb. 6: AFLP-Analyse von Hybriden der ersten Rückkreuzungsgeneration und den beiden Elternarten mit der Primerkombination Eco+AGG/Mse+GCA. *ESI^a/R⁺*: Genotyp der Fische 1-9; *ESI^b/R⁻*: Genotyp der Fische 10-18. Polymorphe, für *X. maculatus* spezifische Banden, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

4.1.2.3 Untersuchung der Kandidatengene *CDKN2X* und *XDNMT-1* auf Kopplung zu *R*

Die Arbeitsgruppe um D. C. Morizot konnte in einem PCR-Ansatz das p16-Homolog des Menschen aus *Xiphophorus* amplifizieren und klonieren (Nairn et al., 1996). Kopplungsanalysen zeigten, daß das Gen in Kopplungsgruppe V lokalisiert ist und in einer

bestimmten Kreuzung eine deutliche Korrelation der Anwesenheit des *X. maculatus* Allels zur Ausbildung exophytisch wachsender Melanome besteht. Es könnte sich somit um ein Kandidatengen für den regulatorischen Locus *R* handeln. Diese Hypothese sollte im klassischen Kreuzungssystem überprüft werden. Dazu wurde eine PCR mit DNAs der BC₁-Generation mit den Primern P16F8 und P16R16 durchgeführt, die eine aufgrund einer in der Promotorregion des Gens vorhandenen variablen GT-Wiederholung polymorphe Sequenz umspannen. Daraus ergibt sich für das *X. maculatus* Allel eine Bande von 1220 bp Länge, während das *X. helleri* Allel nur etwa 1000 bp groß ist. Unter 94 getesteten Fischen fanden sich 19 mit einer Rekombination zwischen dem *CDKN2X*-Gen und dem *ESI*-Enzymlocus. Dies entspricht einer Rekombinationshäufigkeit von 20,2% (lod score=7,7). Von 55 zur Verfügung stehenden Fischen, die einen gut- oder bösartigen Tumor aufwiesen, waren 21 rekombinant, daraus ergibt sich eine Rekombinationshäufigkeit von 38,2% (lod score: 0,7).

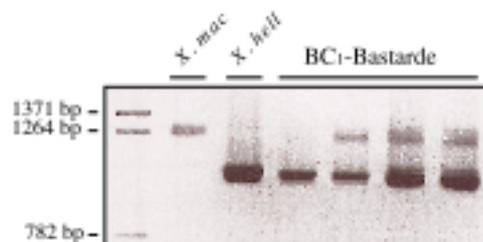


Abb. 7: PCR mit den Primern P16F8 und P16R16 von Parental- und BC₁-Fischen, durchgeführt mit einer "Annealingtemperatur" von 55°C und einer Extensionszeit von 90 sec.

Ein in unserer Arbeitsgruppe kloniertes Gen von *Xiphophorus* (Altschmied et al., zur Veröffentlichung eingereicht), das für eine Methyltransferase kodiert (*XDNMT-1*), wurde ebenfalls in einer RFLP-Analyse auf eine Kosegregation mit dem Tumorphänotyp getestet. Es war nämlich gezeigt worden, daß der Promotor von *ONC-Xmrk* in der Melanomzelllinie PSM hypomethyliert vorliegt (Altschmied et al., 1997). Dies könnte für die beobachtete Überexpression des Onkogens in diesen Zellen verantwortlich sein. Es erschien deshalb denkbar, daß *R* durch Methylierung die Expression des *Xmrk* Onkogens entscheidend beeinflussen könnte. Die korrekte Methylierung im WT würde die Überexpression von *Xmrk* und damit die Entstehung von Tumoren verhindern. Eine Inkompatibilität zwischen der Methyltransferase von *X. helleri* und den von *X. maculatus* geerbten Genen bei Verlust der *X. maculatus* Methyltransferase wäre dann für eine Überexpression in den Hybriden verantwortlich.

Mit einem 900 bp großen Fragment aus dem Methyltransferasegen, das für einen Teil der hochkonservierten katalytischen Domäne des Proteins kodiert, konnte ein RFLP bei mit *Hind*III

gespaltener genomischer DNA zwischen *X. maculatus* und *X. helleri* detektiert werden. Die Untersuchung von 15 Bastarden der ersten Rückkreuzungsgeneration ergab eine Rekombinationshäufigkeit zum Tumorphänotyp von mehr als 50% (12 rekombinante Fische), womit die Methyltransferase als Kandidat für *R* nicht in Frage zu kommen scheint.

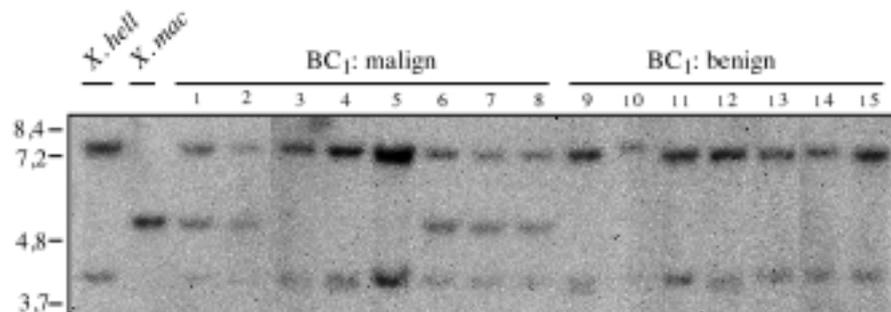


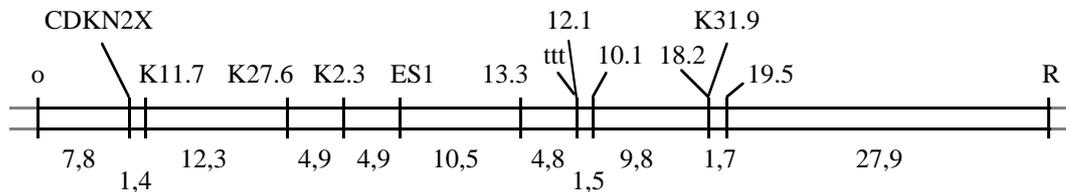
Abb. 8: RFLP-Analyse von *HindIII* gespaltener genomischer DNA von Bastarden der ersten Rückkreuzungsgeneration mit einer 900 bp großen Sonde aus dem Methyltransferasegen von *Xiphophorus*

4.1.3 Erstellen einer Genkarte

Zur Erstellung einer Genkarte von Kopplungsgruppe V im Bereich um den *Esterase1*-Enzymlocus wurden die Daten der AP-PCR- und AFLP-Marker analysiert (siehe Anhang Tab. 13-15), zwei während der Diplomarbeit dieser Kopplungsgruppe zugeordnete RFLP-Marker wurden ebenfalls in die Analyse einbezogen. Diese wurde mit Hilfe zweier Computer-Programme durchgeführt. Map Manager (Manly 1993) erlaubt eine Ordnung der Marker unter Minimierung der Zahl der Doppel-Crossover, deren Auftreten als ein seltenes Ereignis angenommen wird. Unter Verwendung von Mapmaker (Lander et al., 1987) wurde eine Drei-Punkt-Kopplungsanalyse durchgeführt, dabei galten ein lod score von mindestens 3 und ein genetischer Abstand von weniger als 50 cM als Kriterien für die Kopplung der Marker zueinander.

Die resultierende Genkarte weist einige Diskrepanzen auf. So läßt sich der AP-PCR Marker 13.3 nur schwer positionieren, wobei das Auftreten von fünf Doppel-Crossovers nicht vermieden werden kann (siehe Anhang Tab. 16). Dadurch erhöht sich der Abstand benachbarter Marker zur Esterase, der nicht mehr mit den errechneten Rekombinations-häufigkeiten übereinstimmt. Ebenso zeigen die Marker K2.3 und K31.9 eine gleich große Rekombinationsrate zu *R*, liegen jedoch auf verschiedenen Seiten des Esterase-Enzymlocus.

Durch diese Unstimmigkeiten vergrößert sich auch der genetische Abstand zwischen *ES1^a* und *R* von 29,5 cM (siehe 4.1.1.1) auf mehr als 50 cM.



Chi-square Stats, P = 0.01

Abb. 9: Hypothetische Genkarte der Kopplungsgruppe V von *Xiphophorus maculatus*, erstellt durch Auswertung der Rohdaten von RFLP-, AP-PCR- und AFLP-Markern mit Hilfe der Programme Map Manager und Mapmaker. (Abstände sind in cM angegeben.)

4.2 Analyse von verschiedenen *Xmrk* Mutanten

Über die Jahre, in denen genetische Untersuchungen an der Gattung *Xiphophorus* durchgeführt wurden, traten zum einen in den Laboratorien Mutanten auf oder es konnten Mutanten aus dem Freiland isoliert werden. Sie zeichnen sich meist durch ein auffälliges, verändertes Muster an Makromelanophoren oder gar durch völliges Fehlen dieses Zelltyps aus. In vielen Fällen geht damit eine Veränderung der Fähigkeit einher, nach Kreuzungen Melanome zu bilden. In dieser Arbeit wurde das den Tumor auslösende *Xmrk* Onkogen einer Anzahl solcher Mutanten der Art *X. maculatus* analysiert.

4.2.1 Genomische Struktur des *Xmrk* Onkogens

Eine Untersuchung veränderter Allele des *Xmrk* Onkogens ist nur durchführbar, wenn die Struktur und Sequenzen der Wildtyp Allele ausreichend bekannt sind, so daß Mutationen durch direkten Vergleich nachgewiesen werden können. Zu Beginn dieser Arbeit war die genomische Struktur der für die intrazelluläre Domäne kodierenden Region von *ONC-Xmrk* ab Exon 21 (vormals t, Adam et al., 1991) aufgeklärt, die einen Teil der für die Kinase- und die carboxyterminale Domäne des Proteins kodierenden Region umfaßt. Vom restlichen Gen war nur die cDNA-Sequenz bekannt (Wittbrodt et al., 1989).

Tab. 10: Größe der Introns des *Xmrk* Onkogens

Intron	Größe	Intron	Größe
1	~10 kb (Y)/~12 kb (X)	14	237 bp
2	~550 bp	15	80 bp
3	~700 bp	16	~400 bp
4	79 bp	17	115 bp
5	87 bp	18	90 bp
6	~1100 bp	19	~1350 bp
7	236 bp	20	~300 bp
8	75 bp#	21*	88 bp
9	508 bp	22*	925 bp (Y)/930 bp (X)
10	84 bp	23*	82 bp
11	70 bp	24*	211 bp
12	--	25*	1518 bp(Y)/375 bp (X)
13	109 bp	26*	157 bp (Y)/- (X)

Intron8 enthält eine Dinukleotidwiederholung (CA) von variierender Länge, dadurch kommt es zu Differenzen in der Größe dieses Introns.

* Adam et al., 1991

Es galt zunächst, in einem PCR-Ansatz die fehlenden Intronsequenzen zu amplifizieren und zur Überprüfung auf Konservierung deren Position von den Enden anzusequenzieren. Die Lage der Introns war zuvor von Barbara Schulz (persönliche Mitteilung) vom nahe verwandten EGF-Rezeptorgen des Hühnchens abgeleitet worden (Callaghan et al., 1993). Ca.30-60 nt vor den vermuteten Exon/Intronübergängen wurden Primerpaare zur Vervielfältigung der dazwischenliegenden Sequenzen abgeleitet. Als Matrize wurde der Phage Sac1-3-1 ausgewählt, der neben einem 10 kb *SacI*-Fragment unbekannter Herkunft ein 13 kb großes *SacI*-Fragment des Y-Allels des *Xmrk* Onkogens besitzt (Adam, 1990). Bei Spaltung mit *EcoRI* treten ein 8,4 kb und ein 2,3 kb Fragment auf, somit sind, wie aus Southern Analysen bekannt, ein Großteil der extrazellulären Region, die Transmembran- und Juxtamembrandomäne des Gens enthalten. Die Amplifizierung der Introns erfolgte mit einem "Annealing" bei 0-4°C unterhalb der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer mit einer Extensionszeit von 2 min, um auch die Amplifizierung größerer Introns zu gewährleisten. Die vollständige oder teilweise Sequenzierung der Introns wurde durch Cycle Sequencing oder nach Klonierung der PCR-Fragmente durchgeführt. Intron 1 und 2 waren bereits zuvor von Joachim Altschmid und Jutta Duschl kloniert worden, die Sequenzierung dieser Intronenden erfolgte aus zur Verfügung gestellten Plasmiden (pBSSrEco56, pBSSdEco106, pBSSdSac/Eco4, pBSSrSac/Eco7). Die Introngrößen sind in Tab. 10 angegeben.

4.2.2 Vergleich mit dem EGF-Rezeptorgen des Hühnchens (*Gallus gallus*)

Mit der Aufklärung der Exon/Intronstruktur des *Xmrk* Onkogens war es von Interesse zu überprüfen, inwieweit die genomische Struktur von *Xmrk* zu der eines nahen Verwandten, des EGF-Rezeptorgens des Hühnchens (*CER*), konserviert ist. Die Sequenzierung des Phagen Sac1-3-1 im Bereich des vermuteten Übergangs von Exon 12 zu Exon 13 erbrachte das Fehlen einer intervenierenden Sequenz. Um dies zu bestätigen, wurden PCRs über diesen Bereich mit genomischen DNAs mehrerer *X. maculatus* Fische aus dem Rio Jamapa und dem Rio Usumacinta durchgeführt. Eine Bande übereinstimmender Größe mit dem PCR-Produkt aus dem Phagen Sac1-3-1 ließ auf das Fehlen eines Introns 12 in allen *Xmrk* Allelen schließen. Zur Bestätigung dieses Befundes wurde mit dem Oligonukleotid Hg61, das am 3'-Ende von Intron 11 bindet, über die Exongrenze 12/13 von Cosmiden sequenziert, die jeweils das X-, Y- oder INV1-Allel von *Xmrk* enthalten (X: 036K05, 091L11, Y: 036M08, 133G08, INV: 008G01, 106M20). Interessanterweise enthält Intron 12 von *CER* ein Polyadenylierungssignal, das zur Expression eines verkürzten Transkripts in Leberzellen des Hühnchens führt (Flickinger et al., 1992). In diesem Zusammenhang stellte sich auch die Frage, ob dem *EGF-R* von Xiphophorus (*XER*), der inzwischen kloniert worden war (A. Gomez, unveröffentlicht), dieses Intron ebenfalls fehlt. Durch Sequenzvergleich von *Xmrk* mit *XER* konnte die zu Exon 12 und 13 homologe Sequenz identifiziert und ein geeignetes Primerpaar abgeleitet werden. Die Sequenzierung des klonierten PCR-Produkts von *X. maculatus* zeigte ein kleines Intron von 108 bp Länge, das ein mutiertes Polyadenylierungssignal enthält (AACAAA). Das 'fusionierte' Exon in *Xmrk* wurde mit 12/13 benannt, um den Vergleich mit anderen Rezeptortyrosinkinasen zu erleichtern. Während sich *CER* aus 28 Exons zusammensetzt, besteht das *Xmrk*-Gen aus 27 (INV, Y-ONC) bzw. aufgrund einer großen Deletion in X-ONC, die Exon 26 einschließt, aus 26 Exons. Ein Vergleich der Intronpositionen zeigte weitgehende Konservierung mit Ausnahme der Übergänge von Exon 11/12 und 16/17, die um je drei Nukleotide verschoben sind (siehe Abb. 10).

Exon 11/12

Xmrk	AGA GGA AGA ACT ACG TTT TCC AGgt - agA GGG CTC AGC TTT GTG GTG GTT
	R G R T T F S R G L S F V V V
CER	R G R T K Q H G Q Y S L A V V
	CGA GGC CGA ACC AAG CAG CAgt - agC GGC CAG TAT TCC CTT GCT GTT GTT

Exon 16/17

Xmrk	CCT GGA CTG TCT GGC TGC AGA CGgt - agC GAT ATC GTT TCC CAC TCC TCT CTG GCA
	P G L S G C R R D I V S H S S L A
CER	P G L E G C P N G S K T . P S I A
	CCA GGT CTT GAA GGA TGT CCA AAT GGgt - agC TCT AAA ACT CCA TCT ATC GCG

Abb. 10: Exongrenzen in der Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz von *Xmrk* und *CER* (Lax et al., 1988; Callaghan et al., 1993); die Aminosäuren, die den Intronübergang enthalten, sind fettgedruckt hervorgehoben, Intronengrenzen sind mit kleinen Buchstaben angegeben.

4.2.3 Unterschiede zwischen X- und Y-Kopie des *Xmrk* Onkogens

Bereits zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß sich X-ONC und Y-ONC in drei Bereichen durch größere Deletionen bzw. Insertionen unterscheiden ließen (Adam et al., 1991; M. Schartl, J. Altschmied, persönliche Mitteilung). Y-ONC besitzt in der 5'-Promotorregion zwischen Nukleotid -309/-305 eine ca. 1,5 kb große Insertion, die mit dem Primerpaar Prom3/Prom2 in einer PCR mit ausreichend langer Extensionszeit nachgewiesen werden kann. Im ersten sehr großen Intron weist X-ONC zwei 5,3 kb große *EcoRI*-Fragmente auf, bei Y-ONC ist das erste der beiden auf 5,1 kb (INV: 7/10 kb), das zweite auf 3,4 kb (INV: 4,1 kb) reduziert (siehe Abb. 12). Dies ist jeweils im Southern Blot von *EcoRI* gespaltener genomischer DNA bei Hybridisierung mit einem 0,7 kb *BamHI* bzw. mit dem 5,3 kb *EcoRI*-Fragment nachweisbar. Der Fragmentlängenunterschied 5,3/3,4 kb läßt sich auch in einer PCR mit dem Primerpaar Hg93/Hg96 feststellen. Die bereits oben erwähnte Deletion in X-ONC von ca. 1,5 kb am 3'-Ende des Gens wird in einer PCR mit den Primern Ins4/Ins5 oder auch im Southern Blot deutlich, wo ein 6,5 bzw. 5 kb *EcoRI*-Fragment (INV: 7 kb) detektiert werden. Da diese Punkte, an denen eine Unterscheidung zwischen den Allelen möglich war, sehr weit auseinander liegen, wurde nach weiteren dazwischenliegenden Polymorphismen gesucht. Eine Methode zum Auffinden von kleinen Unterschieden bis hin zum Austausch einzelner

Nukleotide ist die SSCP-Analyse (siehe 3.19). Um alle Exons von *Xmrk* mit dieser Methode analysieren zu können, wurden Primerpaare konstruiert, die ca. 15-30 nt von den Exon/Intronübergängen entfernt in den Introns binden (siehe Anhang, Abb. 31). So war es möglich, die einzelnen Exons und ihre angrenzenden Spliceconsensus-Sequenzen auf polymorphe Nukleotide zu untersuchen. Ein Vergleich der Bandenmuster von *X. maculatus* mit *ONC-Xmrk* (Weibchen XX, Männchen XY) und von *X. maculatus* Fischen, die kein Onkogen besitzen, zeigte informative Banden bei Exons 1, 15, 17, 19, 23 und 25, die an einer bzw. zwei zusätzlichen (nur bei männlichen Fischen vorkommenden) Banden zu erkennen waren (siehe Abb. 11). Aufgrund der Leucin Wiederholung im Signalpeptid von *Xmrk*, das von Exon 1 kodiert wird, wurde der Primer Hg91 so positioniert, daß er 3' dieses Repeats bindet, so daß zusammen mit Hg92 eine Sequenz aus 26 nt von Exon 1 und 82 nt aus Intron 1 flankiert wird. Der Einfachheit halber wird diese durch SSCP untersuchte Region aber als Exon 1 benannt. Das informative SSCP-Muster bei den Exons 23 und 25 erschien erwartungsgemäß, da ein Vergleich der bekannten Sequenzen (Adam et al., 1991) je zwei polymorphe Nukleotide zwischen X- und Y-ONC zeigt.

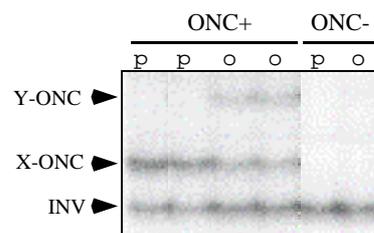


Abb. 11: Informativer SSCP in Exon 23, mit dem Primerpaar Hg81/Hg82 amplifiziert und mit *HpaI* gespalten. ONC+: p X^{SdDr}/X^{SdDr} , o X^{SdDr}/Y^{SrAr} , ONC-: p X^+/X^+ , o X^+/Y^+

Zur Absicherung der SSCP-Ergebnisse wurden die PCR-Produkte von Exon 1 und 17, die nicht immer übereinstimmende Bandenmuster generierten, aus *X. maculatus* Weibchen und Männchen kloniert und sequenziert. Während sich in Exon 1 die beiden INV-Allele, die aus einem Cosmid (INV2: 106M20) bzw. Plasmid (INV1: pBSINVBam46) sequenziert wurden, von den Onkogen-Allelen durch mehrere polymorphe Nukleotide unterscheiden, findet sich nur ein Austausch zwischen X- und Y-ONC (siehe Abb. 13).

X-ONC:	ATGGAGCAGC AGTCTGACCT GCCGGACTCT AGTTTCTAAC CGGACCGTCT	50
Y-ONC:	T C	
INV1:	T C	
INV2:	C A	
X-ONC:	TC <u>ATGG</u> GAGTT TCTGCGCGGA GGAGCGGCGC TGCTGCAGCT GCTGCTGCTG	100
Y-ONC:	T G	
INV1:	C C	
INV2:	C C	
X-ONC: CTCAG CATCAGCCGC TGCAGCAGCA CAGACCCGGA	150
Y-ONC: C A T	
INV1: G G T	
INV2:	CTGCTGCTGC TGCTG G G T	
X-ONC:	CAGAAAGG	
Y-ONC:		
INV1:		
INV2:		

Abb. 13: Sequenz von Exon 1 der verschiedenen *Xmrk* Allele, sequenziert mit Prom1; Sequenzen, die allen Allelen gemeinsam sind, sind nur für X-ONC angegeben; das ATG-Startcodon ist unterstrichen, das zwischen X-ONC und Y-ONC polymorphe Nukleotid ist fettgedruckt.

Auch in Exon 17 wurde nach Sequenzierung der verschiedenen Allele ein Nukleotid-Austausch zwischen X-ONC und Y-ONC detektiert. Eine weitere Differenzierung der Allele wird durch eine Multiplex-PCR mit den Primern Xfor/Xrev und Yfor/Yrev möglich, die eine Unterscheidung in Intron 22 bzw. 25 erlaubt (Coughlan et al., 1999). Beim Männchen entstehen in der PCR zwei Produkte von 323 und 466 bp Länge, während beim Weibchen nur das kürzere Fragment gebildet wird. Die genomische Organisation der beiden *Xmrk* Onkogen Allele und polymorphe Stellen sind in Abb.12 dargestellt.

4.2.4 Analyse zweier "loss of function" (Lof) Mutanten

4.2.4.1 Lof-2

Die Spontanmutante Lof-2, ein Bastard aus der dritten Rückkreuzungsgeneration von *X. maculatus* mit *X. helleri* wurde entdeckt, da sie nicht das charakteristische verstärkte Makromelanophorenmuster von *X. maculatus* zeigte. Es waren im Gegenteil keinerlei Zellen dieses Typs zu erkennen. Weder bei der Mutante noch bei deren Nachkommenschaft, die durch Kreuzung mit *X. helleri* entstand, konnte jemals die Ausbildung eines Melanoms festgestellt werden. Es lag daher nahe, das *Xmrk* Onkogen dieses Fisches näher zu charakterisieren.

Genomische DNA der Mutante wurde mit *EcoRI* gespalten und in Southern Blots durch Hybridisierung mit verschiedenen Fragmenten von *Xmrk* das erhaltene Bandenmuster mit dem des WT Allels aus einem parental *X. maculatus* und einem nicht mutanten Geschwistertier verglichen. Zunächst wurde die cDNA von *Xmrk* als Hybridisierungssonde eingesetzt (siehe Abb. 14). Gegenüber den wildtypischen DNAs schien das Signal von 8 kb Größe, das den extrazellulären Bereich des Gens enthält, in der Intensität um etwa die Hälfte reduziert, während das 5 kb *ONC-Xmrk* spezifische Fragment vollständig fehlte. Dafür erschienen zwei dem WT fehlende schwache Banden von ca 3,5 kb und 3,2 kb Größe (siehe Abb. 14, durch Pfeile markiert). Die Frage, ob es sich dabei aufgrund eines RFLPs um Teile des 5 kb Fragments handeln könnte, sollte durch Hybridisierung mit zwei Proben aus diesem Bereich geklärt werden. Die erste Probe war ein PCR-Produkt, das mit dem Primerpaar *Ins2/Hg80* amplifiziert wurde und die Exons 21 und 22 beinhaltet, die einen Teil der Kinasedomäne kodieren (Abb. 15, I). Die zweite Sonde wurde durch PCR mit *Sw2/Sw1* hergestellt und enthielt eine ca. 300 bp lange Sequenz aus dem letzten Exon des Gens. Diese Hybridisierungen lieferten identische Signale, die bei der Mutante aus nur einer Bande von 7 kb Größe bestanden und das *INV-Gen* repräsentierten. SSCP-Experimente von Exon 23 und 25 zeigten ebenfalls ein Fehlen der Onkogen-spezifischen Produkte in der Mutante *Lof-2*, womit es sich bei den 3,5 und 3,2 kb Banden um unspezifische Hybridisierungssignale handeln dürfte.

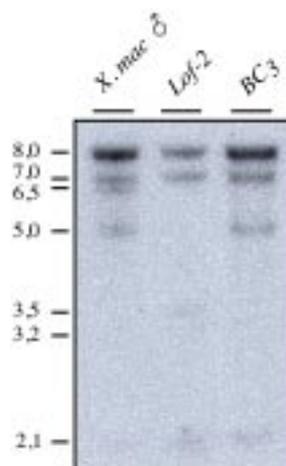


Abb. 14: Hybridisierung von *EcoRI*-gespaltener genomischer DNA der *Lof-2* Mutante, von WT *X. maculatus* und eines *BC₃*-Fisches mit der cDNA von *Xmrk*. Vom WT abweichende Fragmente sind durch Pfeile markiert.

Des Weiteren wurde der 5'-Bereich des Onkogens in *Lof-2* untersucht. Mit der 0,7 kb *BamHI* Probe aus dem ersten Intron konnten nur zwei Fragmente von 10 und 7,4 kb detektiert werden, die den *INV-Xmrk* Allelen von *X. maculatus* (7,4 und 10 kb) und *X. helleri* (10 und 13 kb)

zugeordnet werden konnten (siehe Abb. 15, II). Die 5,3 kb Hybridisierungssonde aus Intron 1 detektierte bei Lof-2 ein 4,1 und ein 4,4 kb großes Fragment, bei denen es sich um die INV-*Xmrk* Allele von *X. mac* und *X. hell* handeln dürfte (Abb. 15, III). Auch PCR Experimente über die Region des Bruchpunktes zwischen INV- und ONC-*Xmrk* führten nicht zum Erhalt der Onkogen spezifischen Produkte. Das übereinstimmende Fehlen aller ONC-*Xmrk*-spezifischen Banden und PCR Produkte ließ auf eine Deletion zumindest über den kodierenden Bereich des Gens schließen.

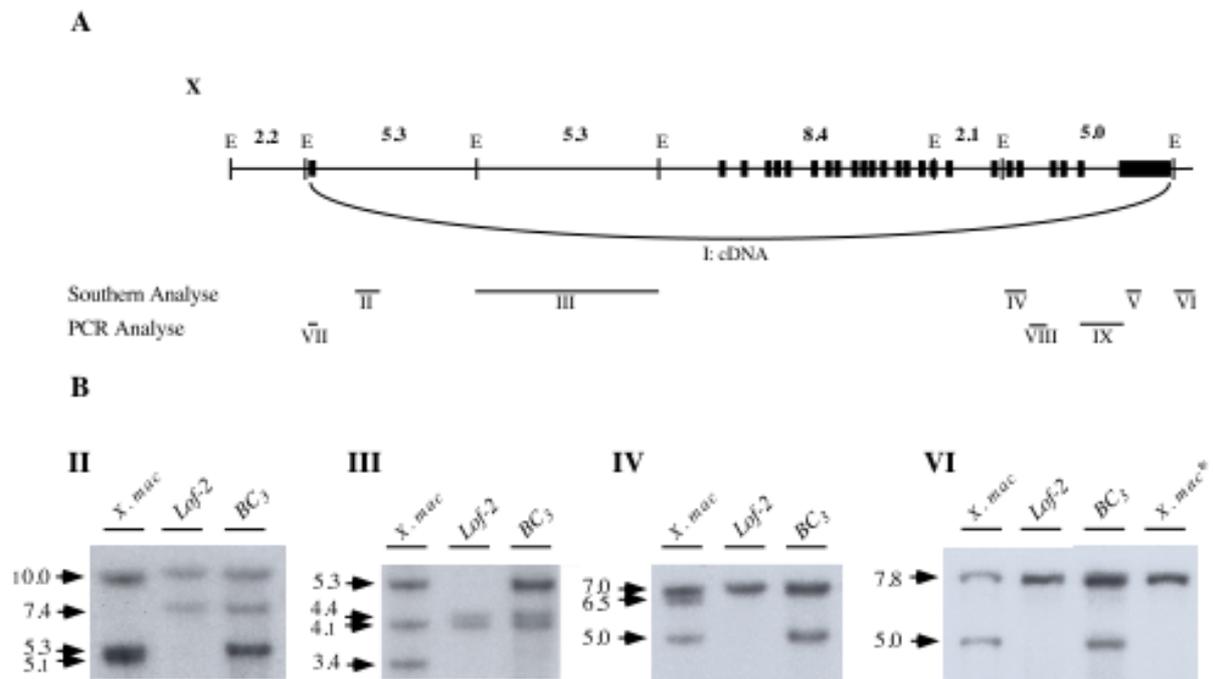


Abb. 15: Analyse der genomischen Struktur der ONC-*Xmrk* Region der Lof-2 Mutante. a) Genomische Organisation des WT X-Allels von ONC-*Xmrk*. Exons sind als schwarze Kästchen dargestellt; die Größe der *Eco*RI (E) Fragmente ist angegeben. Römische Zahlen bezeichnen Hybridisierungsproben bzw. Regionen, die durch PCR untersucht wurden. b) Southern Hybridisierungen von *Eco*RI (II, III, IV) bzw. *Bam*HI (VI) gespaltener genomischer DNA des WT Allels eines *X. mac* Männchens und eines nicht mutanten Geschwistertieres von Lof-2 (*BC₃*), sowie der Mutante Lof-2 und von *X. mac* ohne ONC-*Xmrk* (*X. mac**) mit den im Text beschriebenen Proben.

Hybridisierungsexperimente sollten klären, wieweit sich die Deletion in Lof-2 außerhalb des Onkogens ausdehnt. Dabei lag das Problem darin, daß viele der die Onkogen Allele flankierenden Sequenzen in repetitiver Form vorliegen und es sich daher als schwierig erwies, eine geeignete Hybridisierungssonde zu finden. Die 3'-Endprobe des INV2 Cosmids 008G01,

die durch Spaltung des Cosmids mit *PvuII* und Verwendung des Sp6-Primers generiert wurde, erwies sich als nicht repetitiv (siehe Abb. 15, IV). Diese Sonde, die das 3' an das 7 kb Fragment angrenzende 7,8 kb große *EcoRI* Fragment im INV-*Xmrk* Gen detektiert, führte im Onkogen tragenden WT zur Hybridisierung mit einer zusätzlichen ca. 5 kb großen Bande, die bei der Lof-2 Mutante nicht auftrat. Das Fehlen weiterer in 3'- sowie in 5'-Richtung gelegener Hybridisierungsproben, die ein aussagekräftiges Ergebnis liefern würden, verhinderte bislang eine weitere Eingrenzung der Deletion in der Lof-2 Mutante.

4.2.4.2 Lof-3

Lof-3 entstand durch eine Spontanmutation und wurde von Annerose und Fritz Anders in Gießen isoliert. Die Mutante entspricht phänotypisch Lof-2, in Rückkreuzungsexperimenten mit *X. helleri* traten bei den Bastarden in keinem Fall Melanome auf. Das mutante Chromosom war in den genetischen Hintergrund von *X. maculatus* Rio Jamapa wieder eingeführt worden. Lof-3 Fische sollten sich somit von wildtypischen *X. maculatus* Fischen des Sd-Stammes aus dem Rio Jamapa nur durch die Mutation, die den genannten Phänotyp verursacht, unterscheiden. Da es sich hier um eine Mutation des *Xmrk* Onkogens handeln könnte, sollte dieses näher untersucht werden.

Bei früheren Hybridisierungsexperimenten mit der *Xmrk* cDNA als Sonde war keine Veränderung in der Länge oder Intensität der Banden gegenüber dem WT zu erkennen gewesen. Ebenso hatten PCR-Experimente über die Bruchpunktregion zwischen ONC- und INV-*Xmrk* und im Bereich des im X-Allel deletierten Exons 26 (Primer Ins4/Ins5) keinerlei Auffälligkeiten ergeben. Um etwaige Punktmutationen in den Exons oder den angrenzenden Spliceconsensussequenzen aufzuspüren, die ein verändertes oder verkürztes Protein zur Folge haben könnten, wurden SSCP-Experimente mit den Exons 1-25 von Lof-3 durchgeführt. Bei keinem dieser Exons konnte jedoch eine Abweichung im SSCP-Muster gegenüber dem WT festgestellt werden, die auf eine Mutation in einem der *Xmrk* Gene hingewiesen hätte. Die Untersuchung des ersten, in X-ONC ca. 12 kb großen Introns schien ebenfalls lohnenswert, da diese Region möglicherweise genregulatorische Elemente enthält. Die Hybridisierung *EcoRI* gespaltener genomischer DNA von Lof-3 mit dem 0,7 kb *BamHI*-Fragment zeigt eine schwache Bande von ca. 5,3 kb, die der Onkogenbande des Wildtyps entspricht. Die dem Protoonkogen zuzuordnende Bande fehlt wahrscheinlich aufgrund der Schwäche des erhaltenen Signals (siehe Abb. 18). Die Hybridisierung desselben Filters mit dem angrenzenden 5,3 kb *EcoRI*-Fragment zeigt deutlich das genomische ONC-*Xmrk* spezifische Fragment derselben Größe, zusätzlich war die INV-*Xmrk* Bande von ca. 4 kb sichtbar (siehe Abb. 20). Die Allel-spezifische PCR, die bei X-ONC eine 323 nt lange Sequenz aus Intron 22 amplifiziert, lieferte ein Fragment derselben Größe aus Lof-3. Zuletzt wurde die Promotorregion des Onkogens der Mutante mit

den Primern Ja8/Prom2 vervielfältigt, kloniert und sequenziert, um Mutationen in diesem Bereich auszuschließen. Die erhaltene Sequenz, die sich von nt -625 bis +68 (2 nt 3' des ATG-Startcodons) erstreckt, ist mit der WT-Sequenz völlig identisch. Inzwischen war auch aus RT-PCR Experimenten mit den Primern Ins4/Ins5 (U. Hornung, M. Scharl) bekannt, daß das Onkogen zumindest in der dorsalen Rückenflosse in mit dem WT vergleichbarer Menge exprimiert wird. Eine den Phänotyp der Mutante erklärende Mutation konnte bislang nicht gefunden werden.

4.2.5 Untersuchung der Sr''-Mutante

Bei Sr'' handelt es sich um eine durch Röntgenstrahlung induzierte Mutation auf dem X. *maculatus* Y-Chromosom (Anders et al., 1973). Im Gegensatz zum WT Y-Chromosom mit dem Mdl-Muster Sr sind Makromelanophoren bei Sr'' schon von Geburt an in vermehrter Anzahl mit Verbreitung über den gesamten Körper ausgebildet. Während bei Mdl^{Sr} nach Kreuzung mit X. *helleri* nur eine schwache Verstärkung des Makromelanophoren-musters auftritt, kommt es bei Sr'' bereits frühzeitig zur Entstehung von malignen Melanomen. Auch bei dieser Mutante schien eine Mutation im *Xmrk* Onkogen wahrscheinlich, deshalb wurde dieses eingehender untersucht.

Die kodierende Region der Sr'' Mutante war schon zuvor auf korrekte Länge ihrer *EcoRI*-Fragmente im Southern Blot bei Hybridisierung mit der *Xmrk* cDNA überprüft worden. Dabei wurden keine Abweichungen vom WT Y-ONC festgestellt. Deshalb wurden zunächst die Exons auf Punktmutationen durch SSCP-Analyse getestet. Nur die Exons 15 und 17 zeigten Veränderungen des Bandenmusters gegenüber dem WT Y-ONC, worauf diese Bereiche kloniert und sequenziert wurden. Ein Sequenzvergleich von Exon 17 mit dem des WT zeigte weder einen Nukleotidaustausch im Onkogen noch im Protoonkogen der Mutante, der das abweichende SSCP-Muster erklären würde. Die Sequenzierung von Intron 13 bis einschließlich Exon 15 lieferte ein schwer zu interpretierendes Ergebnis, da es mehrere polymorphe Regionen gibt, die sich keinem der Allele mit Sicherheit zuordnen lassen (siehe Abb. 23). So zeigt Sr'' zwei Nukleotide in Exon 14, die durch Sequenzierung verschiedener Cosmide nur X-ONC zugeordnet werden konnten, wobei die Sequenz des INV1-Allels an dieser Stelle aufgrund des Fehlens eines geeigneten Cosmids nicht geklärt werden konnte. Die Untersuchung von Intron 1 durch Southern Hybridisierungen mit a) der 0,7 kb *BamHI*- und b) der 5,3 kb *EcoRI*-Probe (Abb. 18 und 20) zeigt neben den für INV-*Xmrk* spezifischen Banden noch *EcoRI*-Fragmente von a) 3,4 und b) ca 5 kb, die in der Größe mit denen von Y-ONC übereinstimmen. Die Allel-spezifische Multiplex-PCR mit den Primerpaaren Xfor/Xrev und Yfor/Yrev detektierte das in der Größe der WT Y-ONC Bande entsprechende längere Fragment aus Intron 25. Auch ein Längenvergleich der Promotorregion des Onkogens und der Introns 2-14 lieferte keine

Abweichungen bei Sr^{''} gegenüber dem WT. Bei all diesen bislang durchgeführten Untersuchungen wurde keine Veränderung gefunden, die den Phänotyp der Mutante erklären könnte.

4.2.6 Analyse von Crossover Mutanten des *Xmrk* Onkogens

Geschlechtsbestimmung, RFLP-Analysen und PCR-Tests hatten die im folgenden beschriebenen Mutanten als Crossover-Mutanten des *Xmrk* Onkogens identifiziert. Eine Einengung der jeweiligen Crossover-Region könnte dabei zur Aufklärung der Tumorauslösenden Mechanismen beitragen.

Die Mutanten Sp4 und N1 wurden aus Freilandpopulationen isoliert. Das Makromelanophorenmuster von Sp4 zeigt einen ausgeprägten Gendosis-Effekt. Heterozygote weibliche Tiere (WY) weisen über die Körperseite verteilte kleine Flecken auf, während der hintere Körperbereich homozygoter Fische (YY) zusammenhängend schwarz ist. Sowohl bei Sp4 als auch bei N1 kommt es nach Kreuzung mit *X. helleri* zur Tumorbildung. Ein PCR-Test im 5'-Promotorbereich des *Xmrk* Onkogens beider Mutanten hatte ein Fragment ergeben, das diese Region als von X-ONC stammend charakterisierte. Das *EcoRI*-Fragment am 3'-Ende wies im Southern Blot die für Y-ONC typische Größe von 6,5 kb auf. SSCP-Experimente zeigten Übereinstimmungen mit Y-ONC in den Exons 17, 23 und 25. Mit diesem Befund in Einklang steht das in der Allel-spezifischen PCR erhaltene Fragment von 466 bp. Exons 15 und 19 zeigten abweichende SSCP-Muster, die möglicherweise auf für diese Stämme typische Polymorphismen im INV- oder ONC-*Xmrk* Gen zurückzuführen sind. Hybridisierungen mit den Proben, die Intron 1 abdecken, auf *EcoRI* gespaltene DNA von Sp4 und N1 detektierten weder die erwarteten Fragmente der Größe von Y-ONC noch der von X-ONC. Mit beiden Sonden konnte nur jeweils ein Signal erhalten werden, das mit dem 0,7 kb Fragment in etwa auf Höhe der INV-*Xmrk* Bande (Abb. 18), mit der 5,3 kb Probe etwas darüber lag (Abb. 20). Die Sequenzierung von Exon 1 mit Prom1 bzw. Hg92 zeigte an der einzigen zwischen den Onkogen-Allelen unterschiedlichen Stelle das für Y-ONC spezifische Nukleotid. Etwas weiter 5' jedoch, 12 nt 3' des ATG Startcodons, trat ein Nukleotid auf, das an dieser Stelle in keinem der WT *Xmrk* Allele vorkommt (C-->T), aber zu keiner AS-Änderung führt. Hierbei könnte es sich um einen Polymorphismus handeln, der spezifisch für die beiden Stämme ist. Die Crossover-Region dieser beiden Mutanten müßte folglich in der Region um den Transkriptionsstartpunkt liegen, die Herkunft des ersten Introns konnte jedoch nicht geklärt werden.



Abb. 16: Pigmentierungsphänotypen von WT und mutanten *X. mac* Fischen (links) und Tumorphänotypen der jeweiligen Rückkreuzungsbastarde mit *X. hell* (rechts). Von oben nach unten: WT *X. mac* mit dem Makromelanophorenmuster Sd (φ), N1, Sb, Sr", DrLi, N2.

Mit N2 lag eine Mutante vor, die sich durch eine Spontanmutation von N1 ableitet. Während das Makromelanophorenmuster von N1 aus großen Flecken zusammengesetzt ist, ist dieses in N2 auf eine völlige Bedeckung der Körperseitenflächen ausgedehnt. Kreuzungsbedingt kommt es auch hier zur Entstehung von Melanomen. Wie bei N1 finden sich Y-spezifische Marker am 3'-Ende des *Xmrk* Onkogens ab Exon 23, Intron 1 lässt sich ebenfalls weder Y-ONC noch X-ONC zuordnen. Die Sequenz von Exon 1 war mit der von N1 identisch, d. h. auch hier trat das vom WT abweichende Nukleotid auf. PCR Experimente über die Promotorregion mit verschiedenen Primerpaaren erbrachten eine Homologie mit dem WT X- und Y-ONC-*Xmrk* nur bis nt -44 (9 nt oberhalb der TATA-Box). Das Primerpaar Hg39/Prom2, das die Stelle der Insertion im Y-Allel umspannt, blieb ohne Amplifikationsprodukt. Eine weitere Mutante, N2orn genannt, die an den polymorphen Markerpunkten mit N2 übereinstimmt, zeigte bei dieser PCR jedoch eine schwache Bande auf gleicher Höhe mit der von X-ONC (Abb. 17). Eine veränderte Primerbindungssequenz, die auch für das Fehlen eines Produkts bei N2 verantwortlich sein könnte, würde das schwache Produkt erklären. Ob bei N2 und N2orn tatsächlich ein Crossover zwischen den beiden

Onkogen-Allelen stattgefunden hat, konnte mit den zur Verfügung stehenden Proben nicht geklärt werden. Dazu müßten die 5'-Regionen der Mutanten kloniert und mit den beiden WT *ONC-Xmrk* Allelen verglichen werden.

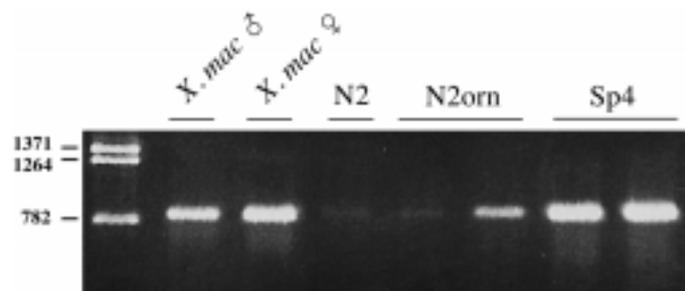


Abb. 17: PCR mit den Primern Hg39/Prom2 in der Promotorregion von WT (\circ X^{SdDr}/Y^{SrAr} , p X^{SdDr}/X^{SdDr}), N2-, N2orn- und Sp4-Mutante. Beim männlichen WT wurde aufgrund der Bevorzugung kürzerer Fragmente in der PCR nur das für das X-Allel spezifische Produkt amplifiziert.

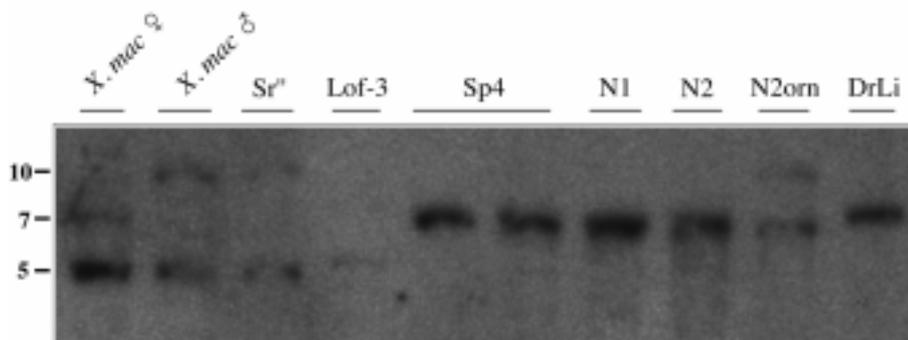


Abb. 18: Southern Hybridisierung *EcoRI* gespaltener genomischer DNA von *X. mac* WT (\circ X^{SdDr}/Y^{SrAr} , p X^{SdDr}/X^{SdDr}) und Mutanten mit dem 0,7 kb *BamHI*-Fragment aus dem ersten Intron.

Die X/Y Crossover Mutante Sr crossover 30⁸⁴B wurde entdeckt, da weibliche Tiere das im Wildtyp nur auf dem Y-Chromosom vorkommende Makromelanophorenmuster Sr ausprägten. Übereinstimmend mit dem Pigmentierungsphänotyp des WT Y-Chromosoms kommt es nach Kreuzung nicht zur Tumorentwicklung. Die Promotorregion von *ONC-Xmrk* dieser Mutante, Exon 1 und das angrenzende erste Intron zeigten Identität in Größe bzw. Sequenz mit dem Y-*ONC* Allel. Ab der nächstgelegenen polymorphen Markerposition, dem Exon 15, bis zum Ende des Gens stimmten alle durch SSCP oder PCR getesteten Positionen

mit X-ONC überein. Das Crossover muß demzufolge in der Region zwischen dem 3'-Ende von Intron 1 und Exon 15 stattgefunden haben.

Eine weitere Mutante, Sb, wurde aus einer Freilandpopulation isoliert. Das mutante *Xmrk* Onkogen ist auf dem Y-Chromosom gelegen und führt nach Kreuzung z. T. bereits in der F₁-Generation zur Ausbildung bösartiger Tumoren, die vom Makromelanophorenmuster Sb ausgehen. Zur Y-Kopie des *Xmrk* Onkogens gehörende Sequenzen wurden in der Promotorregion und dem ersten Exon und Intron nachgewiesen (siehe Abb. 19), während alle weiteren polymorphen Marker von Exon 15 bis zum letzten Exon als von X-ONC stammend identifiziert wurden. Auch hier muß das Crossover-Ereignis zwischen dem Ende des ersten Introns und Exon 15 stattgefunden haben.

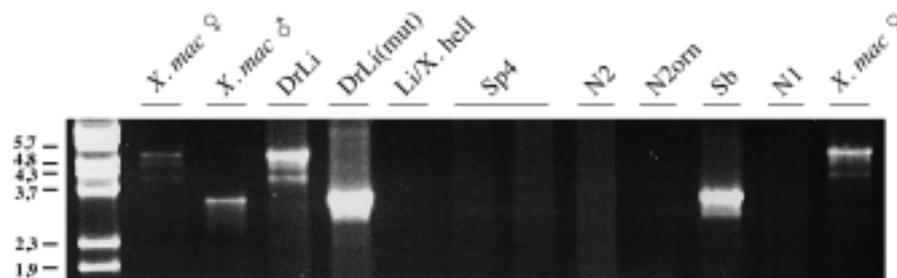


Abb. 19: PCR zum Nachweis des X-spezifischen 5,3 kb bzw. des Y-spezifischen 3,4 kb Fragments des ersten Introns von *Xmrk* mit dem Primerpaar Hg93/Hg96 mit 100 ng DNA von WT-Fischen und den Mutanten DrLi, DrLi (mut), Sp4, N2, N2orn, N1 und Sb. Der Bastard zwischen *X. var* und *X. hell* (*Li/X. hell*) wurde als Kontrolle für DrLi und DrLi (mut), bei dem es sich ebenfalls um einen Bastard mit *X. hell* handelt, mitgeführt.

Das mutante DrLi Chromosom war in einem Hybridgenotyp von *X. maculatus* und *X. variatus* wahrscheinlich durch ein Crossover zwischen den beiden X-Chromosomen von *X. mac* und *X. var* entstanden. Die Elternart *X. maculatus* zeigt das Makromelanophorenmuster Sd, das aus schwarzen Pigmentflecken in der dorsalen Rückenflosse besteht, während weibliche *X. variatus* Tiere das Muster Li aufweisen, an den Körperseiten längs verlaufende Linien aus Pigmentzellen. Die DrLi Mutante entwickelt ein von beiden Elternarten abweichendes Muster. Die schwarzen Pigmentzellen sind in großer Dichte über den gesamten Körper verteilt, wobei das Muster dem der Mutante Sr'' gleicht. Gleichzeitig zeigt DrLi das RY-Farbmuster Dr von *X. maculatus*, wohingegen das *X. variatus* typische Muster Or nicht auftritt. Eine Untersuchung aller 3' gelegenen polymorphen Regionen des *Xmrk* Onkogens der Mutante zeigte jeweils die für X-ONC spezifischen Bandenmuster und Sequenzen. Die Hybridisierung *Eco*RI gespaltener genomischer DNA mit der 5,3 kb Sonde aus dem ersten Intron zeigt ein 4,1 kb Signal neben dem der Probe entsprechenden 5,3 kb Fragment des X-ONC Allels von *X. maculatus* (siehe Abb. 20). Bei Rehybridisierung des Filters mit der 0,7 kb Sonde (siehe Abb.

18) fehlt bei DrLi ein 5,3 kb Fragment, das beim *X. maculatus* WT die Bande von X-ONC repräsentiert. Es wird nur ein Fragment von ca. 7,2 kb sichtbar, welches in der Größe mit einem Fragment übereinstimmt, das bei *X. variatus* mit dem Mdl^{Li} bei Hybridisierung mit einer Sonde erschien, die das erste Exon und den 5'-Teil von Intron 1 enthielt (Kazianis, 1995). Daneben wurde bei *X. variatus* noch ein ca. 10 kb Fragment detektiert, bei dem es sich möglicherweise um INV-*Xmrk* handelt, ein solches ist bei DrLi jedoch nicht nachzuweisen. Das SSCP Muster von Exon 1 der Mutante zeigte ebenfalls nicht die für X-ONC typischen Banden. Das Muster stimmte vielmehr mit dem von *X. variatus* und männlichen *X. maculatus* Tieren überein. Die Sequenzierung ergab eine mit Y-ONC von *X. maculatus* identische Sequenz, so daß angenommen werden kann, daß diese Region von *X. variatus* stammt, die in diesem Bereich mit der des Y-ONC Allels von *X. maculatus* übereinstimmt. Eine Amplifizierung der Promotorregion des Onkogens aus DrLi mit den Primerkombinationen Prom3/Prom2 bzw. Hg39/Hg40 blieb ohne Erfolg offensichtlich wegen Sequenzunterschieden zwischen ONC-*Xmrk* in der 5'-Region von beiden Spezies. Dies ist in Übereinstimmung mit den Versuchen, für das Onkogen spezifische Sequenzen aus *X. variatus* mit Primern zu amplifizieren, die von *X. maculatus* Sequenzen abgeleitet sind (Kazianis, 1995). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß das Crossover zwischen dem X-Chromosom von *X. maculatus* und *X. variatus* in der 5'-Region des ersten Introns stattgefunden haben mußte.

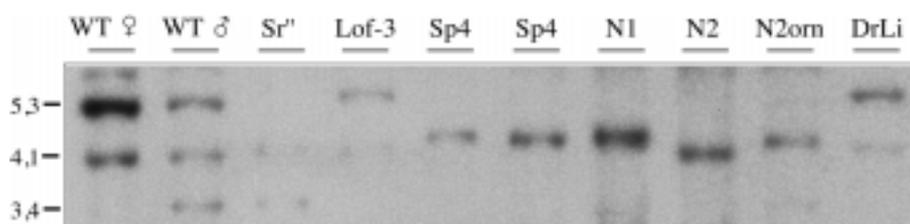


Abb. 20: RFLP-Analyse des ersten Introns von WT-Fischen und Mutanten bei Hybridisierung mit dem 5,3 kb *EcoRI*-Fragment.

In einem Nachkommen eines Männchens von DrLi, der die Chromosomenkonstitution $X^{DrLi}/Y^{Sr''}$ besaß und mit *X. helleri* gekreuzt wurde, kam es zur Entstehung einer weiteren Mutation, die DrLi (mut) genannt wurde. Diese äußerte sich darin, daß sein Träger weder das sowohl für DrLi noch das für Sr'' typische verstärkte Makromelanophorenmuster ausprägte, stattdessen phänotypisch einem F₁-Nachkommen mit dem wildtypischen Muster Sr glich. Während DrLi und Sr'' nach Kreuzung hochmaligne Tumoren ausbilden, prägt ein Teil der DrLi (mut) Individuen nur in den ersten zwei Lebensmonaten Tumoren aus, die sich im Verlauf der folgenden Monate allmählich vollständig zurückbilden. Eine Untersuchung des Onkogens

dieser Mutante zeigte eine Übereinstimmung mit dem parentalen DrLi-Chromosom im 3'-Bereich von *Xmrk*. Weist DrLi in Southern Blot Analysen sowie im PCR Experiment mit den Primern Hg93/Hg96 im ersten Intron jedoch noch das für X-ONC typische *EcoRI* Fragment von 5,3 kb auf, zeigt dieses in DrLi (mut) die für Y-ONC-spezifische Größe von 3,4 kb (siehe Abb. 19). Eine PCR mit dem Primer SrIns1, der spezifisch nur an die Insertion im Promotorbereich von Y-ONC bindet, zeigte in Kombination mit Hg40 bei DrLi (mut) das für Y-ONC von *X. maculatus* erwartete PCR-Produkt (siehe Abb. 21). Dieser Befund wird durch ein zweites Crossover erklärbar, wobei der 5'-Bereich des *Xmrk* Onkogens des DrLi-Chromosoms durch die homologe Region des Sr"-Chromosoms ersetzt wurde, die bislang nicht vom Onkogen des WT unterschieden werden kann. Der Austausch muß in einem Bereich erfolgt sein, der sich über das 3'-Ende des ersten Introns bis zu Exon 15 erstreckt, da die für X-ONC-spezifischen Marker ab diesem Exon detektiert wurden. Die in der PCR mit SrIns1/Hg40 bei DrLi auftretende schwächere Bande (siehe Abb. 21) gibt einen Hinweis darauf, daß Promotorsequenzen von *X. variatus* zumindest teilweise dem Y-ONC Allel von *X. maculatus* ähnlich sein müssen, da der Primer auch an die *X. variatus* Sequenz binden konnte. Die Primerbindesequenz scheint jedoch, erkennbar an der nur schwachen Bande, Basenaustausche zu enthalten.

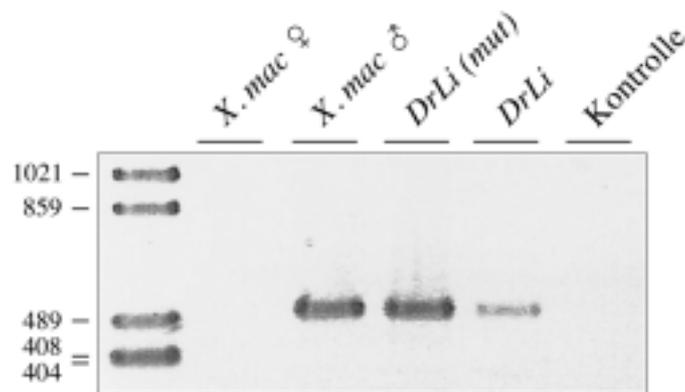


Abb. 21: PCR mit den Primern SrIns1/Hg40 mit DNAs von männlichem und weiblichem *X. maculatus* WT, der Mutanten DrLi (mut) und DrLi



Abb. 22: Pigmentierungsmuster der Rückkreuzungsbastarde (BC_n) von *X. mac* mit dem Mdl Sr und von DrLi (mut) jeweils mit *X. hell*. Das Makromelanophorenmuster von DrLi (mut) gleicht dem wildtypischen Sr-Muster. Eine Melanombildung ist bei DrLi (mut) Rückkreuzungsbastarden im Gegensatz zu DrLi-Hybriden (vergleiche Abb. 16, rechte Seite, zweiter Fisch von unten) nicht zu beobachten.

Da das Crossover sowohl bei Sr crossover 30⁸⁴B und Sb als auch bei DrLi (mut) in derselben etwa 7,5 kb umfassenden Region stattgefunden haben muß, wurden stichprobenartig Bereiche für eine Sequenzierung ausgewählt. Diese könnten möglicherweise die Identifizierung der individuellen Bruchpunkte erlauben. Die erste Sequenz wurde durch PCR mit den Primern Hg49/54 amplifiziert und umfaßte eine ca. 1800 bp Region, die vom Ende des Introns 5 bis zum Beginn von Intron 8 reichte. Die PCR-Produkte verschiedener Genotypen (*X. maculatus* WT, Sb, Sr") wurden von beiden Seiten sequenziert, eine Überlappung der Sequenzen kam jedoch aufgrund der Größe von Intron 6 nicht zustande. Da die erhaltenen Sequenzen mit Ausnahme einer CA-Dinukleotidwiederholung in Intron 8, deren Anzahl bereits zwischen verschiedenen Klonen desselben Individuums variierte, nicht informativ schien, wurde auf eine weitere Sequenzierung dieses Bereichs verzichtet. Eine zweite, durch PCR mit den Primern Hg23/Hg26 amplifizierte Region erstreckte sich vom Ende des Exons 12/13 bis zum Anfang von Exon 15. Trotz fünf verschiedener polymorpher Bereiche (siehe Abb. 23) war eine gesicherte Zuordnung zu den einzelnen Allelen mit Ausnahme von Y-ONC nicht durchführbar. Die Sequenz mit der 4 nt langen Insertion könnte eines der beiden INV-Allele darstellen, wobei auch Sr" diese Sequenz aufweist. Die Mutante DrLi stimmt in einem Klon in vier (a-d) der fünf polymorphen Bereiche mit Y-ONC überein. Dies läßt sich nur dadurch erklären, daß auch eines der INV-Allele eine ähnliche Sequenz aufweist. Ein Durchspielen aller Möglichkeiten konnte jedoch die Situation nicht befriedigend klären. Möglicherweise kommt es gelegentlich in der PCR zum vorzeitigen Abbruch der Synthese, das unvollständige Fragment könnte in den

darauffolgenden Zyklen vervollständigt werden, wobei auch ein zweites der *Xmrk*-Allele als Matrize genutzt werden könnte (Jansen & Ledley, 1990). Dadurch würden Fragmente gemischter Sequenzen entstehen, deren Zuordnung zu einzelnen Allelen nicht möglich wäre.

Die Ergebnisse, die von den Crossover Mutanten erhalten wurden, sind in Abb. 24 zusammengefaßt.

	a	b	c
Y (Sac1-3-1)	TTACTATTCTTTACGCACTTT	TTTTGCATGAATTTAGTTGTTTT
X (2)	T	T	TTTG
X (1)	C	C
Sb (2)	C	C
Sb (1)	C	T
DrLi (2)	T	T	TTTG
DrLi (1)	C	C
DrLi (mut) (3)	T	T	TTTG
Sr crossover (3)	T	T	TTTG
Sr crossover (1)	C	T
Sr" (3)	T	T	TTTG

	Intron 12/13 > < Exon 14	d
Y (Sac1-3-1)	GTTTTGTTTCTTGGTGCACTGAACCCAGAGAGGCCAGGTGAACG	
X (2)		G T
X (1)		G T
Sb (2)		A C
Sb (1)		A C
DrLi (2)		G T
DrLi (1)		A C
DrLi (mut) (3)		G T
Sr crossover (3)		G T
Sr crossover (1)		A C
Sr" (3)		G T

	e	Intron 14 >
Y (Sac1-3-1)	GTAGTAAACCCTTTTTTGTGCAG	
X (2)	T	
X (1)	T	
Sb (2)	G	
Sb (1)	G	
DrLi (2)	T	
DrLi (1)	T	
DrLi (mut) (3)	T	
Sr crossover (3)	T	
Sr crossover (1)	T	
Sr" (3)	T	

Abb. 23: Sequenzen von *X. maculatus* WT und Mutanten im 3'-Bereich von Intron 12/13, 5'-Bereich von Exon 14 und vom 3'-Ende von Intron 14 (durch gepunktete Linie getrennt). Übereinstimmende Sequenzen sind nur für Y-ONC angegeben. Polymorphe Stellen sind mit den Buchstaben a-e benannt.

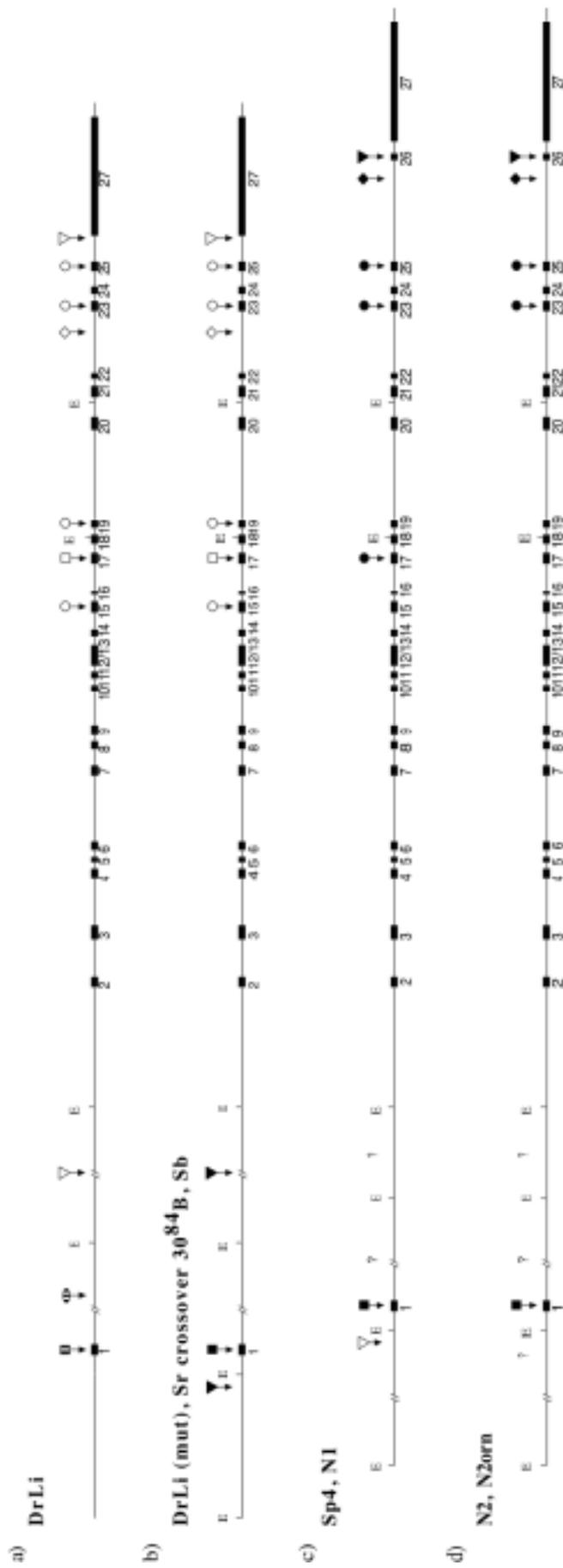


Abb. 24: Karte der *Xmrk* Onkogene der geschlechtschromosomalen Crossover Mutanten DrLi (a), DrLi (mut), Sr crossover 30⁸⁴B, Sb (b), Sp4, N1 (c), N2 und N2orn (d). Die Symbole sind in Abb. 12 erklärt; gestreifte Symbole stellen *X. variatus* spezifische Marker dar.

4.2.7 Lokalisierung des *Xmrk* Protoonkogens

Über die Lage des *Xmrk* Protoonkogens war bislang nur bekannt, daß es in enger Kopplung mit den Onkogen-Allelen auf den Geschlechtschromosomen lokalisiert ist (Schartl 1990, Gutbrod et al., 1999). Mit der Mutante DrLi, deren Onkogen Sequenzen zweier unterschiedlicher Arten vereint, bestand erstmalig die Gelegenheit, das Protoonkogen relativ zum Onkogen zu positionieren. Dies wäre möglich, wenn es gelänge, einen RFLP zwischen INV-*Xmrk* und ONC-*Xmrk* sowohl von *X. maculatus* als auch von *X. variatus* zu finden.

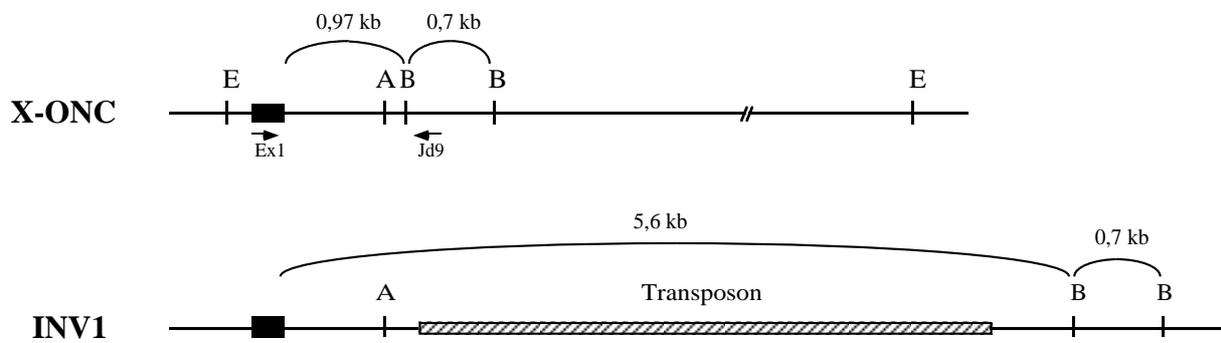


Abb. 25: Lage des Transposons im ersten Intron von INV1. Das erste Exon ist als schwarzes Kästchen dargestellt. Die Pfeile markieren die Position der Primer Ex1 und Jd9, die zur Herstellung der Hybridisierungssonde verwendet wurden. E: *EcoRI*, A: *AvaII*, B: *BamHI*

Da keine genomische DNA von *X. variatus* zur Verfügung stand, wurde die DNA von Bastarden dieser Art mit *X. helleri*, die das X-Chromosom von *X. var* im genetischen Hintergrund von *X. hell* tragen, sowie von *X. maculatus* und *X. helleri* mit verschiedenen Enzymen gespalten und der Filter nach dem Blotting mit verschiedenen Proben hybridisiert. Als geeignet erwies sich die *BglIII*-Spaltung bei Verwendung des 0,7 kb *BamHI* Fragments aus dem ersten Intron als Hybridisierungssonde. Die DrLi-Mutante wies dabei zwei Banden auf, die sie mit je einer der Elternarten teilte. Es konnte jedoch nicht unterschieden werden, welche der Banden INV- bzw. ONC-*Xmrk* repräsentierte. Das Auftreten einer Transposon-ähnlichen Sequenz in dieser Region, die sich auf das INV1-Allel beschränkt (Altschmied und Volf, unveröffentlicht), wurde für das Designen einer zweiten Hybridisierungsprobe genutzt (siehe Abb. 25). So war zu erwarten, daß eine Probe, die von einer 5' des 0,7 kb *BamHI* Fragments von X-ONC gelegen Sequenz abgeleitet ist, in INV1 ein Fragment abweichender Größe detektiert. Da in der bekannten Region 5' von Exon 1 bis zur ersten *BamHI* Schnittstelle keine solche für *BglIII* zu finden war, bestand die Chance, mit dieser Probe dasselbe Fragment für X-ONC wie bei Hybridisierung mit der 0,7 kb Probe zu detektieren und die Onkogen Bande

dadurch zu identifizieren. Eine solche 5'-Probe wurde durch PCR mit den Primern Ex1/Jd9 aus X-ONC amplifiziert. Das Produkt wurde mit *Ava*II gespalten, um mögliche zur 3'-Seite des Transposons gelegene homologe Sequenzen zu INV1 zu eliminieren.

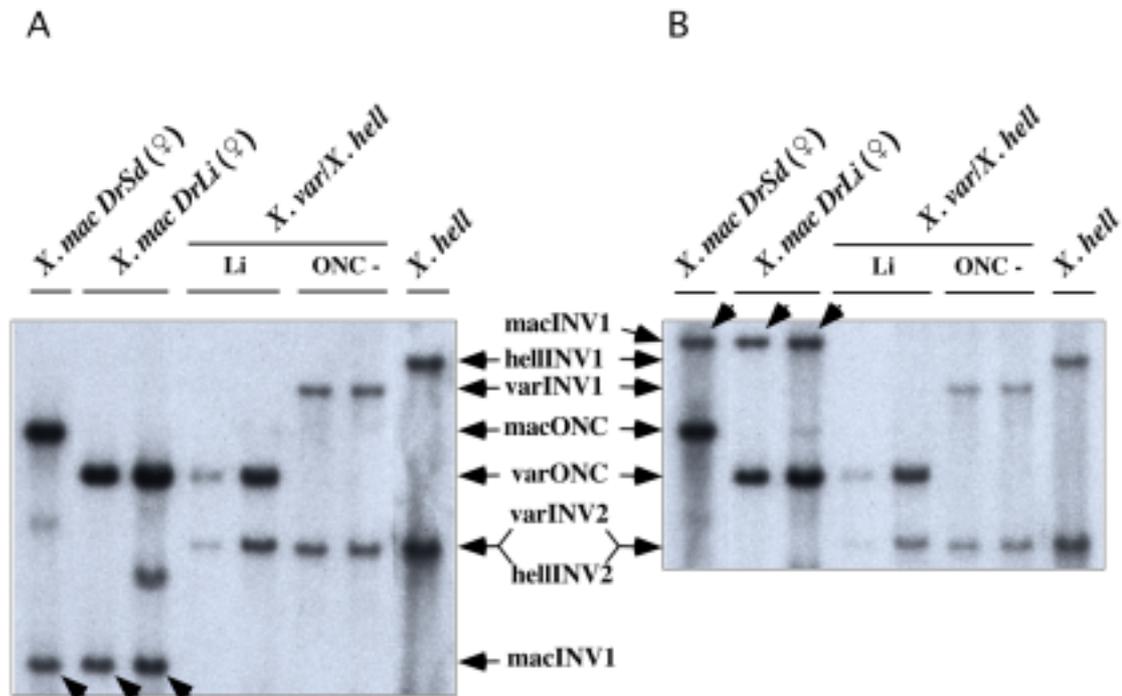


Abb. 26: Southern Experiment mit *Bgl*II gespaltenen DNA von *X. maculatus* WT, DrLi-Mutante, *X. variatus* Bastarden mit und ohne *Xmrk* Onkogen und *X. helleri*. A: Der Filter wurde mit der 0,7 kb Sonde hybridisiert. B: Rehybridisierung desselben Filters mit dem Ex1/Jd9 PCR-Produkt nach Spaltung mit *Ava*II. Beide Proben detektieren das identische Fragment für X-ONC, während für INV1 von *X. maculatus* Banden unterschiedlicher Größe sichtbar werden (diese sind durch Pfeile markiert).

Die Rehybridisierung des Filters mit diesem Fragment ermöglichte die Zuordnung der Banden zu INV- und ONC-*Xmrk* (siehe Abb. 26). Demzufolge besitzt ONC-*Xmrk* von DrLi in diesem Bereich zu *X. variatus* homologe Sequenzen, was in Einklang mit den unter 4.2.6 beschriebenen Ergebnissen steht. Die INV Banden zeigen die für *X. maculatus* spezifische Länge, so daß das Protoonkogen in einen Bereich auf dem DrLi-Chromosom anzusiedeln ist, der von *X. maculatus* stammt. Somit muß INV-*Xmrk* 3' von ONC-*Xmrk* gelegen sein.

4.3 Untersuchung der Chromatinstruktur im *Xmrk* Onkogen

Die Lage der Bruchpunkte bei den Mutanten DrLi (mut), Sb und Sr crossover 30⁸⁴B läßt, betrachtet man deren Tumorphänotyp, die Anwesenheit eines regulatorischen Elements in der Region zwischen dem Ende des ersten Introns und Exon 15 vermuten. Dieses könnte für die X-ONC-spezifische Überexpression von *ONC-Xmrk* verantwortlich sein. Da genregulatorische Elemente aktiv transkribierter Gene in Regionen mit aufgelockerter Chromatinstruktur lokalisiert sind, sollte diese Vermutung anhand der Kartierung von DNaseI hypersensitiven Stellen im *Xmrk*-Gen überprüft werden.

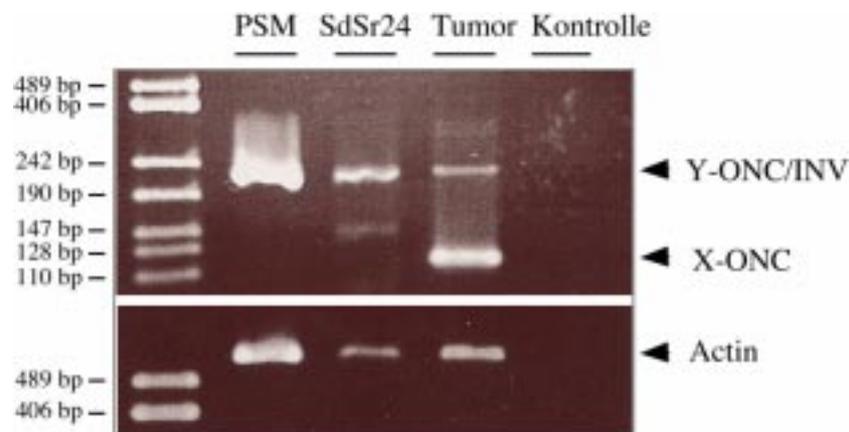


Abb. 27: Untersuchung der Expression der *Xmrk* Gene in PSM- und SdSr24-Zellen und einem malignen Melanom eines Rückkreuzungsbastards zwischen *X. mac* und *X. hell* durch RT-PCR mit den Primern Ins4/Ins5. Eine Unterscheidung zwischen X-ONC und Y-ONC/INV ist aufgrund einer Deletion in X-ONC in der für den Carboxyterminus des Proteins kodierenden Region möglich. Diese Deletion erstreckt sich auch über kodierende Sequenzen. Bei der im Tumorgewebe sichtbaren längeren Bande handelt es sich um das INV-Genprodukt. Die in SdSr24-Zellen weniger intensive Bande der Aktinkontrolle ist auf einen Verlust von cDNA beim Verdünnen vor Einsatz in die PCR zurückzuführen. Bei der ebenfalls bei diesen Zellen aufgetretenen schwachen Bande von ca. 150 bp Länge dürfte es sich um ein PCR Artefakt handeln.

Die Untersuchung sollte zunächst an PSM-Zellen erfolgen, da dort zum einen eine starke Expression von *ONC-Xmrk* vorliegt, zum anderen weil Zelllinien eine für diese Methode ausreichende Menge an benötigter DNA liefern. Als Kontrollzelllinie wurden Zellen gesucht, die das Onkogen besitzen, es jedoch nicht exprimieren. Es stand die embryonale Zelllinie SdSr24 zur Verfügung, die von *X. maculatus* abgeleitet ist (X^{SdDr}/Y^{SrAr}) und nur die X-chromosomale Kopie von *ONC-Xmrk* trägt (M. Pagany, 1999). Deren Eignung wurde zunächst durch Untersuchung der Expression von *Xmrk* durch RT-PCR überprüft. Während in PSM-Zellen das Y-Allel von *ONC-Xmrk* stark überexprimiert wird, ist das Onkogen in SdSr24-Zellen nicht aktiv. Hier ist nur die Expression von *INV-Xmrk* zu beobachten (siehe Abb. 27). Da keine Zelllinie mit Y-ONC zur Verfügung stand, die das Onkogen nicht

exprimiert, wurden SdSr24-Zellen eingesetzt. Eine Untersuchung des Promotorbereichs von *ONC-Xmrk*, der identifizierte Bindungsbereiche für Transkriptionsfaktoren beinhaltet (Baudler et al., 1997), diente dazu, die geeigneten DNaseI-Konzentrationen zu ermitteln (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde das 8,4 kb *EcoRI*-Fragment von *Xmrk*, welches vom 3'-Bereich des ersten Introns bis zum 5'-Bereich von Exon 18 reicht, auf hypersensitive Stellen getestet.

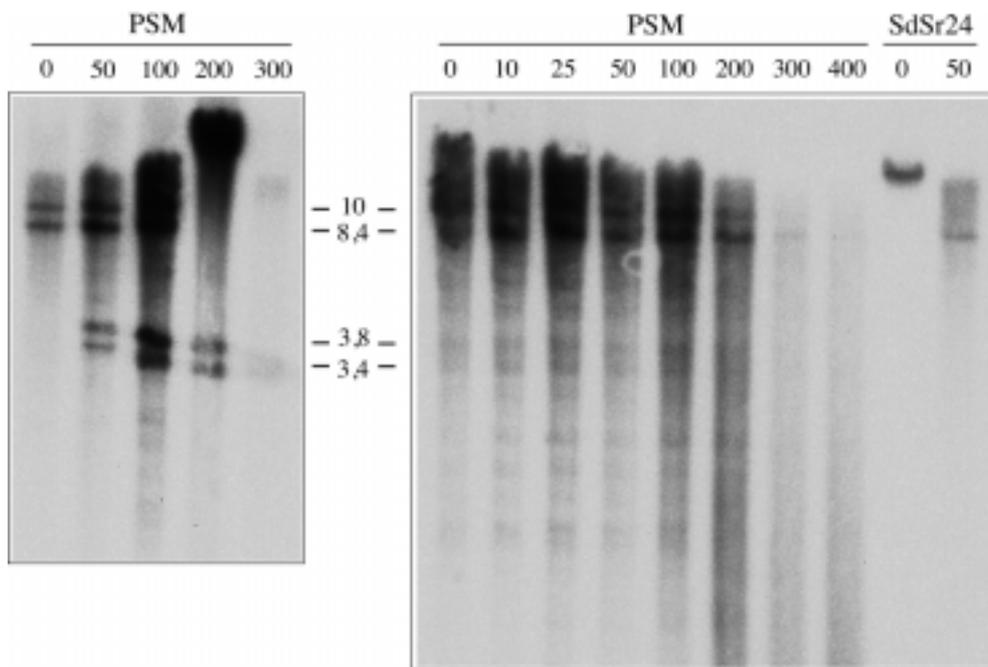


Abb. 28: Untersuchung des 8,4 kb *EcoRI*-Fragments des *Xmrk* Onkogens von PSM- und SdSr24-Zellen in zwei unabhängigen Experimenten auf DNaseI-hypersensitive Regionen. Als Hybridisierungsprobe wurde ein PCR-Produkt verwendet, das mit den Primern Hg51/Hg70 amplifiziert wurde und genomische *Xmrk* Sequenzen von Exon 7 einschließlich Exon 17 enthält. Die Zahlen geben die Konzentration an eingesetzter DNaseI in U/ml an. Die bei der SdSr24 Kontrollprobe (0 U/ml) aufgetretene hochmolekulare Bande ist wahrscheinlich auf Versagen der Spaltung durch *EcoRI* zurückzuführen.

In einem ersten Experiment wurde mit einer Sonde, die Exon 7 bis Exon 17 beinhaltete, neben der 8,4 kb und einer größeren Bande von ca. 10 kb zwei weitere Fragmente von 3,8 und 3,4 kb detektiert, die im Kontrollaliquot, das nicht mit DNaseI inkubiert wurde, fehlten. Bei zwei weiteren Experimenten war dieses Ergebnis in derselben Form nicht reproduzierbar. Es konnten zwar wieder Fragmente von 3,8 und 3,4 kb detektiert werden, die jedoch nicht mehr dieselbe Intensität der Signale aufwiesen und zudem auch in der Kontrolle ohne DNaseI sichtbar waren. Daneben traten noch eine Reihe weiterer Banden auf, die wiederum auch in der Kontrolle zu sehen waren (siehe Abb. 28). Mit der Kontrollzelllinie SdSr24 bestand das Problem, genügend DNA für die Southern Analyse nach DNaseI-Verdau zu gewinnen. Im Gegensatz zu den polyploiden PSM-Zellen waren die DNA-Mengen, die aus den di- bis tetraploiden embryonalen

Zellen gewonnen werden konnte, deutlich geringer. Anhand dieser Zellen war zumindest erkennbar, daß das längere ca. 10 kb Fragment spezifisch für PSM-Zellen sein muß. Auf dem Autoradiogramm einer längeren Filterexposition war zudem bei einer DNaseI-Konzentration von 50 U/ml, einer Enzymmenge, die in PSM-Zellen deutliche DNaseI-Spaltprodukte lieferte, keine Anzeichen eines Abbaus zu erkennen. Dies könnte einen ersten Hinweis dafür liefern, daß im *Xmrk*-Gen von PSM-Zellen spezielle Regionen auftreten, die in einer für DNaseI zugänglichen Chromosomenkonformation vorliegen. Das Ziel zukünftiger Experimente wird darin liegen, diese Anzeichen durch Optimierung der Versuchsbedingungen zu bestätigen.