

**Aus dem Institut für Physiologische Chemie I
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. Manfred Scharl**

**Untersuchungen zur Rolle der Mikrosatelliteninstabilität in hereditären
Melanomen von *Xiphophorus* sowie zur Integrität von Elementen der
Zellzykluskontrolle/DNA-Reparatur**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Katrin Zunker
aus Bremen**

Würzburg, Juni 2006

Referentenblatt:

Referent: Prof. Dr. Manfred Scharl

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. German Ott

Dekan: Prof. Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung : 14.02.2007

Die Promovendin ist Ärztin.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Veränderungen des Genoms als Grundlage der Tumorevolution	1
1.1.1.	Tumorevolution	1
1.1.2.	Genomische Instabilität	2
1.1.2.1.	CIN und MIN	2
1.1.2.2.	Loss of Heterozygosity	4
1.2.	Genomische Instabilität in humanen melanocytischen Läsionen - pathogenetischer Mechanismus oder Begleiterscheinung?	5
1.3.	Das Xiphophorus-Melanom-Modell System	6
1.4.	Regulation des Zellzyklus	10
1.4.1.	Kontrollmechanismen	10
1.4.2.	Die Funktion des Zellzyklusinhibitors CDKN2A	11
1.4.3.	Eine Vielzahl von "Wächtern des Genoms"	12
1.5.	Spezielle Fragestellung dieser Arbeit	13
2.	MATERIAL	15
2.1.	Fische	15
2.1.1.	Mikrosatellitenanalysen und MLFPs	15
2.1.2.	Reverse-Transkriptase-Analysen	17
2.2.	Oligonukleotide	17
2.2.1.	Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide	17
2.2.2.	Oligonukleotide für die Reverse-Transkriptase-PCR	18
2.3.	Enzyme und Enzymkits	19
2.4.	Zelllinien	20
2.5.	Gele und Filterpapier	20

2.6.	Geräte	20
2.7.	Chemikalien und Sonstiges	20
2.8.	Software	21
3.	METHODEN	22

3.1.	Isolierung hochmolekularer DNA (Methode nach Blin & Stafford, 1976)	22
3.2.	Isolierung von Gesamt-RNA und Umschreiben in cDNA	23
3.2.1.	Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe	23
3.2.2.	Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	25
3.2.3.	Reverse Transkription	25
3.3.	Amplifizierung von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
3.3.1.	Amplifizierung genomischer DNA	25
3.3.2.	Amplifizierung von cDNA	26
3.3.3.	Amplifizierung von DNA mittels Fluoreszenz-markierter Primer	26
3.4.	DNA-Gelelektrophorese und –Konzentrationsbestimmung	27
3.4.1.	Agarose-Gelelektrophorese	27
3.4.2.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
3.4.3.	Vergleichende DNA-Konzentrationsbestimmung	29
3.5.	Exakte Größenbestimmung von DNA-Fragmenten mittels des ALFexpress DNA Analysis Systems	29
3.6.	Multilocus DNA-Fingerprint-Analysen	30
3.6.1.	Enzymatischer Verdau genomischer DNA	30
3.6.2.	Gelelektrophorese	30
3.6.3.	Denaturierung/Neutralisierung des Gels	30
3.6.4.	Direkte In-Gel-Hybridisierung	31
3.6.4.1.	Radioaktive Markierung der Proben	31
3.6.4.2.	Hybridisierung der Gele	31

3.6.4.3.	Entfernung der Radioaktivität zur Rehybridisierung	32
3.7.	Zellkultur	33
3.7.1.	Zellansaat	33
3.7.2.	Kultivierung von Zellen	33
3.7.3.	Bestimmung der Zellzahl	34
3.7.4.	Ernte der Zellen (unsteril)	34

4.	ERGEBNISSE	35
-----------	-------------------	-----------

4.1.	Analyse der genomischen Instabilität in hereditären Melanomen von Xiphophorus	35
4.1.1.	Mikrosatelliteninstabilität	35
4.1.1.1.	Analyse der Prävalenz der genomischen Instabilität pro Genlocus	37
4.1.1.2.	Analyse der Frequenz der genomischen Instabilität pro Melanom	37
4.1.1.3.	Einordnung der MIN nach dem "pattern" der veränderten Allele	39
4.2.	Analyse der genomischen Instabilität im Multilocus DNA-Fingerprint	42
4.3.	Analyse der Expression von Zellzyklusinhibitoren und von einer Komponente des MMR-Systems	45

5.	DISKUSSION	49
-----------	-------------------	-----------

6.	ZUSAMMENFASSUNG	57
-----------	------------------------	-----------

7.	LITERATURVERZEICHNIS	59
-----------	-----------------------------	-----------

DANKE!

LEBENS LAUF

1. EINLEITUNG

"If you want to understand cancer, you need to know the answers to the many questions about the role genome instability plays."

- Bert Vogelstein

1.1. Veränderungen des Genoms als Grundlage der Tumorevolution

1.1.1. Tumorevolution

Das Wort *Tumor* entstammt dem Lateinischen und bedeutet *Anschwellung, Geschwulst*.

In der Medizin bezeichnet dieser Begriff im eigentlichen Sinn eine „gewebliche Neubildung in Form eines spontanen, verschiedengradig enthemmten, autonomen und irreversiblen Überschußwachstums von körpereigenem Gewebe, das in der Regel mit unterschiedlich ausgeprägtem Verlust spezifischer Zell- und Gewebefunktionen verbunden ist“ (Psyhyrembel, 1998 [1]).

Jede neoplastische Transformation einer Zelle repräsentiert einen pathologischen Prozeß, der sich auf molekularer Ebene manifestiert und durch die Akkumulation einer oder mehrerer somatischer Mutationen in einem oder mehreren Genen charakterisiert ist. Deshalb ist Krebs eine Erkrankung des Genoms bzw. der Gene, die mit einer Vielfalt an Möglichkeiten das feine molekulare Gleichgewicht zwischen Proliferation und Inhibition stört bzw. zu Gunsten der Proliferation verschiebt.

Der Ursprung einer Neoplasie findet sich in der molekularen Entgleisung einer einzelnen Zelle innerhalb eines intakten Organismus. Die erste erworbene Mutation wird im Zuge der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben, und jede nachfolgende Mutation führt zu einem neuen Klon genetisch veränderter Zellen mit zunehmend abnormal-proliferativem Potential. Die positive Selektion genetisch veränderter Zellklone ist proportional zu deren Fähigkeit, invasiv und expansiv zu wachsen. So führt dieser sich selbst tragende und beschleunigende Prozeß letztendlich zur Entstehung eines malignen Zellklons, der den Beginn eines Tumorwachstums darstellt.

Tumorzellen proliferieren ohne kontinuierliche Einwirkung eines externen Wachstumsstimulus. Sie sind innerhalb ihres ursprünglichen Zellverbandes autonom und

befinden sich, sofern sie maligne sind, in einem Zustand unkontrollierter Ausdehnung mit der Fähigkeit zur Verdrängung von angrenzendem Gewebe. Diese Befreiung einer transformierten Zelle von den Mechanismen der regulären Wachstumskontrolle ist meistens die Folge einer oder mehrerer Mutationen in zwei bestimmten Genklassen: den *Onkogenen* und *Tumorsuppressorgenen*.

Onkogene stellen in Form sogenannter Protoonkogene einen physiologischen Bestandteil des zellulären Genoms dar. Ihre Genprodukte umfassen eine Vielzahl verschiedener Proteine, darunter Transmembranproteine, im allgemeinen Wachstumsfaktorrezeptoren, oder Transkriptionsfaktoren, und sind unerlässlich für Zellfunktionen wie Zellwachstum, -teilung, -differenzierung und Apoptose (programmierter Zelltod) (Kopnin 2000 [2]). Der Übergang von einem Protoonkogen in ein Onkogen mit tumorigenem Potential kann durch die konstitutive Aktivierung oder Überexpression seines Genprodukts erfolgen, demnach resultiert die Tumorgenese hier aus einem zusätzlichen Funktionserwerb (*gain of function*).

Tumorsuppressorgene kodieren für Proteine, die den Zellzyklus bremsen, d. h. als Wachstumsinhibitoren fungieren oder Apoptose induzieren. Sie sind ebenfalls ein physiologischer Bestandteil des Genoms. Inaktivierende Mutationen oder Deletionen innerhalb dieser Gene entsprechen einem Funktionsverlust (*loss of function*) und stellen einen ersten Schritt in Richtung Tumorgenese dar.

1.1.2. Genomische Instabilität

1.1.2.1. CIN und MIN

Ein signifikantes Charakteristikum neoplastischer Zellen ist die Akkumulation zahlreicher genomischer Läsionen, durch welche die Tumorgenese initialisiert und die weitere Tumorprogression getragen wird. Aufgrund dieser Häufung genetischer Alterationen werden maligne Zellen als genetisch oder genomisch *instabil* bezeichnet.

Generell werden zwei Formen der genomischen Instabilität unterschieden: *Chromosomale Instabilität (CIN)* und *Mikrosatelliten-Instabilität (MIN)*.

Chromosomale Instabilität bezeichnet grobe strukturelle Veränderungen an mindestens einem Chromosom des Karyotyps, z. B. in Form numerischer Veränderungen (Aneuploidie) oder umfassender Genamplifikationen bzw. -deletionen.

Die *Mikrosatelliten-Instabilität* hingegen beinhaltet genetische Veränderungen auf der Ebene von DNA-Sequenzen (sog. Mikrosatelliten; s.u.), die entweder einzelne Nukleotidpaare oder kurze DNA-Abschnitte betreffen. Bei diesen Alterationen handelt es sich entweder um eine Insertion (Verlängerung der Sequenz) oder Deletion (Verkürzung der Sequenz). Sie ist Ausdruck einer verminderten DNA-Reparaturkapazität (Strand et al. 1993 [3]), und betroffene Gewebe oder Individuen werden als *MIN+* (*mikrosatelliteninstabil*) bezeichnet.

Das menschliche Genom enthält neben kodierenden Abschnitten u.a. mehrere hunderttausend hochrepetitive DNA-Sequenzen, deren Grundeinheiten, sogenannte „repeats“, aus einer Abfolge von ein bis zu sechs Basen bestehen. 30 bis 50 dieser uniformen „repeats“ folgen tandemartig aufeinander und bilden eine Sequenz, die als *Mikrosatellit* bezeichnet wird (Karran 1996 [4]). Die häufigste Repeat-Einheit ist das $(CA)_n$ -Motiv.

Mikrosatelliten sind bis auf wenige Ausnahmen gleichmäßig und randomisiert über das gesamte Genom verstreut und stellen weitgehend nicht-kodierende DNA-Abschnitte dar.

Sie unterliegen keinem Selektionsdruck, sind deswegen prädestiniert zur Ansammlung persistierender Mutationen und weisen interindividuelle Polymorphismen auf. Die Länge seiner Mikrosatelliten, festgelegt durch die Anzahl aufeinander folgender Repeat-Einheiten, ist in ihrer Gesamtheit für ein Individuum einzigartig und in allen somatischen Geweben fixiert.

Dieses individuelle Charakteristikum wird „genetischer Fingerabdruck“ genannt.

Tumore, die ihre Entstehung auf eine Vielzahl von Mutationen gründen, können hinsichtlich der Länge ihrer Mikrosatelliten Unterschiede zum normalen, gesunden Gewebe ihres „Wirts“ (desselben Individuums) aufweisen.

1993 wurde erstmalig das Phänomen abnormaler Mikrosatelliten-Sequenzen bei der Analyse der erblichen kolorektalen Krebsform *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC)* bzw. seines Syndroms, auch *Lynch-Syndrom* genannt, beobachtet (Peltomaki et al. 1993 [5]). Versuche, das prädisponierende Gen mittels genetischer Kopplungsanalysen anhand von Mikrosatelliten zu ermitteln, offenbarten einen ungewöhnlichen Phänotyp dieser Tumoren. Im Vergleich zu Proben von gesundem Gewebe fanden sich verlängerte und verkürzte Mikrosatelliten-Allele, denen Insertionen

bzw. Deletionen von Repeat-Einheiten zu Grunde lagen. Dieses Phänomen, das sich genomweit, d.h. unabhängig von bestimmten Genorten zeigte, führte zu der Annahme, daß eine generelle Beeinträchtigung des DNA-Metabolismus für die Tumorentstehung verantwortlich sein müsse. Folgende Untersuchungen deckten Defekte im DNA Mismatch-Repair (MMR)-System auf, durch die Ungenauigkeiten in der DNA-Replikation nicht mehr korrigiert werden konnten und sich bevorzugt an repetitiven Sequenzen offenbarten (Strand et al. 1993; Aaltonen et al. 1994 [6]).

In über 90% HNPCC-assoziiierter Tumoren sowie in 15% sporadischer kolorektaler Karzinome wurden Instabilitäten in Mikrosatelliten-Sequenzen nachgewiesen (Lawes et al. 2003 [7]).

Karzinome, die aufgrund einer defekten DNA-Reparaturkapazität eine über das normale Maß hinausgehende Mikrosatelliteninstabilität aufweisen, werden als RER⁺ (Replication Error positive)-Phänotyp bezeichnet (Jass et al. 2002 [8]).

In der experimentellen Tumorforschung werden instabile Mikrosatelliten generell einer der drei folgenden Kategorien zugeordnet: *High-Level MSI* (MSI-H), *Low-Level MSI* (MSI-L) oder keine MSI (MSS; *microsatellite stable*). MSI-H bedeutet Alterationen an >30-40% aller untersuchten Loci, Tumoren mit niedrigeren Instabilitätsraten werden als MSI-L klassifiziert. MSS-Tumoren sind an allen analysierten Mikrosatellitenmarkern stabil (Boland et al. 1998 [9]).

Die molekulare Ursache der MSI-H Tumoren liegt in Defekten des DNA Mismatch Repair-Systems, die der MSI-L instabilen Läsionen ist bisher ungeklärt.

1.1.2.2. Loss of Heterozygosity (LOH)

LOH als chromosomale Alteration bezeichnet den Allelverlust eines Gens. Dieses Phänomen ist häufig in genomisch instabilen Zellen anzutreffen, wird im Rahmen einer Mikrosatellitenanalyse mitdetektiert und allgemein als Zeichen für den Verlust eines innerhalb des Chromosomenabschnitts nahe gelegenen Tumorsuppressorgenes angesehen (Birindelli et al. 2000 [10]).

1.2 Genomische Instabilität in humanen melanocytischen Läsionen - pathogenetischer Mechanismus oder Begleiterscheinung?

Über 90% der HNPCC-assoziierten Tumoren weisen Instabilitäten an >30-40% der analysierten Mikrosatelliten-Loci auf (Lawes et al. 2003) und gehören damit der Klasse der MSI-H Tumoren an. Für diese Subklasse kolorektaler Tumoren stellt diese Form der genetischen Alteration einen obligaten Schritt in der Tumorgenese dar.

Nach der Entdeckung dieses Zusammenhanges (Strand et al. 1993) wurde eine Vielzahl verschiedener humaner Tumoren auf Mikrosatelliten-Instabilitäten getestet. Die Resultate dieser Studien weisen jedoch, anders als bei den HNPCC-assoziierten Tumoren, nicht immer eindeutig in eine Richtung. Für viele Tumorarten wurde bestätigt, daß sie genetische Alterationen aufweisen, allerdings in unterschiedlichem Maße (Lawes et al. 2003); und häufig bleibt unklar, ob die Mikrosatelliten-Instabilität als ein determinierendes Ereignis in der Tumorevolution angesehen werden kann. Unterstützt wird diese Unsicherheit durch das Fehlen eindeutiger Korrelationen bezüglich der Frequenz der genomischen Instabilität und den korrespondierenden klinisch-pathologischen Verläufen der Patienten (Lawes et al. 2003; Peris et al. 1995 [11]; Talwalkar et al. 1998 [12]; Brueckl et al. 2000 [13]).

Besonders unübersichtlich stellt sich die Situation für humane maligne Hautläsionen dar. Über die letzten Jahre wurden viele Studien durchgeführt, die sowohl den Mikrosatelliten- als auch den LOH-Status über das gesamte Spektrum melanocytischer tumoröser Veränderungen analysierten. Die Ergebnisse dieser Studien sind diskordant. Sie zeigen für kutane maligne Melanome Instabilitäts-Frequenzen von weniger als 5% (Quinn et al. 1995 [14]) über 20-25% (Peris et al. 1995; Talwalkar et al. 1998) bis zu 32% (Hussein et al. 2001 [15]). Dieses breite Spektrum verschiedengradig instabiler Tumoren konnte keine Korrelation mit den klinischen Verläufen der jeweiligen Probanden oder ihrer Pathologie aufzeigen (Peris et al. 1995; Talwalkar et al. 1998).

Studienergebnisse bezüglich des MIN+ Status von dysplastischen Nävi, die als Vorläufer-Läsion der malignen Melanome diskutiert werden, und benignen herkömmlichen Nävi sind ebenfalls widersprüchlich. Einerseits sollen Mikrosatelliten-Alterationen die molekulare Grenzlinie zwischen dysplastischen (MIN+) und herkömmlichen (MSS) Nävi

darstellen (Hussein et al. 2001), andererseits sind sie aber ein gemeinsames Merkmal dieser beiden Strukturen (Birindelli et al. 2000).

Weiterhin erschwerend kommt hinzu, daß humane Hautläsionen sowohl in-vivo als auch histopathologisch schwer zu differenzieren sind. Diverse Hautveränderungen können entweder auseinander hervorgehen, vgl. z. B. die Sequenz: herkömmlicher Nävus - dysplastischer Nävus - malignes Melanom, oder direkt de novo, d. h. aus dem Gesunden heraus, entstehen. Im Falle der sequentiellen Progression sind die Übergänge fließend. Die Zuverlässigkeit der diagnostischen Reproduzierbarkeit von dysplastischen Nävi muß in Frage gestellt werden, seit histopathologische Merkmale, die bis dahin diesen Nävi vorbehalten waren, in verschiedenen Ausprägungen auch in anderen melanocytischen Läsionen und sogar in Melanomen gefunden worden sind (Farmer et al. 1996 [16]).

1.3. Das Xiphophorus-Melanom-Modell System

Die Komplexität der Tumorentstehung und die Tatsache, daß meistens nur das Endstadium eines Tumors der Analyse zugänglich ist, machen es in der Regel unmöglich, zwischen tumorinduzierenden (auslösenden) und für die Tumorprogression notwendigen Mutationen zu unterscheiden. Tiermodelle ermöglichen eine detaillierte Untersuchung der molekularen Vorgänge, die zur Zelltransformation führen, sofern das tumorinduzierende Gen durch klassische Genetik definiert ist. Die Melanomentstehung bei *Xiphophorus* ist Vertreter eines solchen Modells.

Die zur Familie der lebendgebärenden Zahnkarpfen (Poeciliidae) zählenden Fische der Gattung *Xiphophorus* sind in den Flüssen und Flußdeltas Zentralamerikas beheimatet (Kallmann 1975 [17]). Bislang konnten über 20 Arten identifiziert werden (Rosen 1979 [18]; Meyer et al. 1994 [19]), die jedoch miteinander gekreuzt werden können und fertile Nachkommen produzieren. Bereits in den 20er Jahren wurden einige Arten aufgrund ihrer auffälligen Pigmentierungsmuster als beliebte Aquarienfische gezüchtet.

Nachkommen aus bestimmten Kreuzungen zwischen dem Platy-Fisch (*Xiphophorus maculatus*) und einem Schwertträger (*Xiphophorus hellerii*) entwickeln eine Verstärkung der Pigmentierung bis hin zu bösartigen Wucherungen, die als Melanome diagnostiziert wurden (Gordon 1927 [20]; Häussler 1928 [21]; Kosswig 1928 [22]). Ursprung dieser Wucherungen waren stets bestimmte Pigmentierungsmuster. Ihr Aufbau aus sogenannten Makromelanophoren, einem besonderen Zelltypen, unterscheidet sie von den kleinen Anhäufungen melaninhaltiger normalgroßer Pigmentzellen (Durchmesser 30-100µm),

welche ubiquitär vorhanden sind, die einheitliche Körperfärbung der Fische ausmachen und als Mikromelanophoren bezeichnet werden.

Makromelanophoren weisen einige Besonderheiten auf. Ihre Größe (300-1000µm) entspricht ca. dem 10-fachen der der Mikromelanophoren. Sie sind tiefschwarz gefärbt, also von wesentlich dunklerem Colorit, und ihre intrazelluläre Melaninverteilung ist unveränderlich, d.h. unabhängig von sympathisch bzw. parasymphatisch beeinflussten Wechselspielen von Ausdehnung und Konzentrierung der Zellen. Makromelanophoren folgen auch nicht im regulären Maß dem Prinzip der Kontaktinhibition, ihre dendritischen Zellausläufer wachsen *physiologischerweise* in- und übereinander (Anders et al. 1994 [23]). Zusätzlich weist ihr phänotypisches Wachstumsverhalten Variabilitäten auf in der Form, als daß Makromelanophoren nicht von allen *Xiphophorus*-Arten gebildet werden und das Auftreten dieses Zelltyps innerhalb der makromelanophorentragenden Populationen zwischen einem einzigen und mehr als 50% der Individuen variieren kann (Gordon et al. 1957 [24]).

In dem klassischen Kreuzungsexperiment wird ein *X. maculatus*-Weibchen mit dem Makromelanophorenmuster *Sd* („Spotted dorsal“) mit einem *X. hellerii*-Männchen gekreuzt. *X. hellerii*-Individuen besitzen keine Makromelanophoren. Die aus dieser Kreuzung resultierenden F₁-Hybriden zeigen eine Verstärkung des Pigmentmusters an der Rückenflosse. Nach Rückkreuzung (Backcross, BC) dieser F₁-Hybriden mit parentalen *X. hellerii* teilt sich die BC₁-Generation folgendermaßen auf: 50% dieser Fische zeigen keine Pigmentierung, 25% tragen ein Pigmentmuster, das dem der F₁-Hybriden gleichzusetzen ist und als „benignes“ Melanom charakterisiert werden kann (Vielkind et al. 1977 [25]), und die restlichen 25% entwickeln ein malignes Melanom, das die Wachstumskriterien bösartiger Tumoren erfüllt.

Die Histologie weist eine Korrelation bezüglich Tumor-Staging und Differenzierungsgrad der Pigmentzellen auf. Das „benigne“ Melanom weist überwiegend terminal differenzierte Melanophoren auf, während die malignen Melanome sich vorwiegend aus relativ entdifferenzierten, rasch proliferierenden Melanoblasten und Melanozyten zusammensetzen (Anders et al. 1984 [26]). Die Ergebnisse zahlreicher Kreuzungsexperimente ließen eine Modellerklärung zur Tumorgenese zu (Ahuja et al. 1976 [27]).

Die genetisch fixierte Empfänglichkeit zur Melanomentwicklung einiger *Xiphophorus*-Arten ist auf die unbeschränkte Überexpression eines geschlechtschromosomalen Genlocus zurückzuführen. Dieser ist *X. maculatus* inhärent, wird dem für die Entwicklung von Makromelanophoren verantwortlichen Locus gleichgesetzt und als Tumorlocus (*Tu*) bezeichnet. Im WT (Wildtyp; parentale *X. maculatus*) wird die kanzerogene Wirkung des *Tu*-Locus durch einen autosomal lokalisierten, unabhängig segregierenden Repressor, *R*, in Schach gehalten. Parentale tumorfreie *X. hellerii*-Individuen besitzen weder *Tu*- noch *R*-Locus. Die wiederholte Rückkreuzung von *X. maculatus*/*X. hellerii*-Bastarden mit parentalen *X. hellerii* führt zur schrittweisen Elimination des *R*-Locus, ein Prozess, der eine graduelle Entfaltung der onkogenen Wirkung des *Tu*-Locus erlaubt: Der Verbleib nur eines Repressor-Locus im Genom eines Fisches führt zur Entwicklung einer gutartigen Pigmentzellläsion („benignes Melanom“), wohingegen die Elimination beider *R*-tragender Allele der Entwicklung eines malignen Melanoms den Weg ebnet.

Die Lokalisation der Melanome ist immer jenes Kompartiment, welches im *Tu*- und *R*-tragenden, tumorfreien Parentalfisch die gutartigen Pigmentflecken trägt.

Natürlich ist eine alternative Interpretation der Kreuzungsdaten denkbar. An die Stelle des repressierenden *R*-Locus der Platyfische könnten sogenannte „Intensifier“-Faktoren aus dem Genom der Schwerträger treten, die, durch die selektiven Kreuzungen einmal in das Genom der Hybriden eingeführt, dort eine Gendosis-abhängige Aktivierung der Expression von *Tu* und damit die Entwicklung von Malignomen verschiedener Dignität bewirken.

Durch experimentelle Rückkreuzungen melanomtragender Hybriden mit parentalem Platyfisch konnte eine schrittweise Revision des malignen Phänotypen bis hin zum tumorfreien Fisch erzeugt werden. Unter der Vorstellung der Wiedereinführung des repressierenden *R*-Locus bzw. der Abschwächung *Tu*-aktivierender Gene durch diese Kreuzungen und aufgrund der Reversibilität dieser Schritte wird gezeigt, daß 1. die Aktivierung des *Tu*-Locus zu keiner genetischen Alteration desselben führt und 2. keine zusätzlichen Keimbahnmutationen stattfinden, die Einfluß auf die Melanomentstehung nehmen könnten (Anders et al. 1984).

Mit Hilfe von „positional cloning“-Ansätzen konnte ein Kandidatengen isoliert werden, das in der vermuteten Schlüsselregion des *Tu*-Locus lag (Schartl 1988 [28]; Wittbrodt et al. 1989 [29]). Ein Sequenzvergleich mit Gendatenbanken ergab, daß das

Produkt dieses Gens für eine Rezeptortyrosinkinase codiert und ein neues Mitglied der Familie der EGF-Rezeptoren (EGFR-Familie) darstellen könnte. Dieses Gen wurde *Xmrk* (vormals *ONC-Xmrk*) für *Xiphophorus-Melanom-Rezeptor-Kinase* genannt und besitzt als onkogene Version von *INV-Xmrk* (jetzt umbenannt in XEGFRb) tumorigenes Potential (s. unten).

Durch die Isolierung und Charakterisierung eines weiteren EGFR-Gens in *Xiphophorus*, *egfra*, konnte gezeigt werden, daß es sich bei EGFRa und EGFRb (vormals *INV-Xmrk*) um Co-Orthologe des Säuger-EGFR handelt (Gomez et al. 2004 [30]). Beide Gene sind aus einer Fisch-spezifischen Duplikation eines älteren EGFR-Gens hervorgegangen.

Der Beweis, daß *Xmrk* tatsächlich das tumorinduzierende Gen und damit essentieller Bestandteil des *Tu-Locus* ist, konnte durch die Analyse zweier spontaner „loss-of-function“-Mutanten erbracht werden, denen die Fähigkeit zur Melanominduktion fehlte. Beide Mutanten zeigten genetische Alterationen im *Xmrk-Locus*, als deren Folge entweder ein funktionsloses oder kein Genprodukt gebildet wurde (Schartl et al. 1999 [31]).

Der Entdeckung der tumorigenen Version des *Xmrk*-Gens (vormals *ONC-Xmrk*) war allerdings die Entdeckung seines Proto-Onkogens, *Xegfrb*, vormals *INV-Xmrk* (*INV* für „invariant“), vorausgegangen. Dieses Gen zeigte eine von der Präsenz des *Tu-Locus* gänzlich unabhängige, ubiquitär vorhandene Expression auf niedrigem Niveau, die in allen bisher analysierten Fischen der Familie der Poeciliidae nachgewiesen werden konnte (Schartl 1990 [32]). Weiterhin wurde maternelle RNA von *Xegfrb* in großen Mengen in Oozyten gezeigt. Während der Embryonalentwicklung ließ sich eine differentielle Expression dieses Gens verfolgen, die in der späten Organogenese ihr Maximum erreichte. Im adulten Fisch fanden sich schwache Expressionen des Proto-Onkogens in Kiemen, Haut, Flossen, anderen epithelialen Geweben sowie im Gehirn. Die physiologische Bedeutung seines Genprodukts ist bislang noch ungeklärt.

Dagegen zeigte sich *Xmrk*-spezifische mRNA gewebe- bzw. neoplasiegebunden. Sie ließ sich nur in malignen Melanomen, hier in großen Mengen, und in präkanzerösen melanozytischen Läsionen, hier auf einem deutlich niedrigeren Expressionsniveau, nachweisen. Dieses Expressionsmuster folgt dem Konstrukt der „gendosis-abhängigen Tumorentwicklung“ (Wittbrodt et al. 1989), bei der das Expressionsniveau des Gens mit dem Malignitätsgrad der Tumoren korreliert.

Die Entstehung von *Xmrk* läßt sich anhand eines nicht-homologen Rekombinationsereignisses erklären, in welchem das oben beschriebene Proto-Onkogen

dupliziert und mit einer neuen 5'-Promoterregion versehen wurde, welches es unter die transkriptionelle Kontrolle des *D*-Locus brachte (*D* für „Donor“). In malignen Melanomen wird diese mutierte Form des Proto-Onkogens (*Xmrk*) aufgrund des D-Promoters und des kreuzungsbedingten Verlustes des Repressorlocus übermäßig abgelesen. Die Folge ist eine äußerst hohe Konzentration autophosphorylierter, d.h. konstitutiv aktivierter Rezeptoren.

Anschließende Experimente an transgenen Fischen zeigten allerdings, daß die alleinige Überexpression der Rezeptortyrosinkinase kein ausreichendes Kriterium für eine Tumorinduktion darstellt (Dimitrijevic et al. 1998 [33]). Vergleichende Aminosäuresequenzanalysen von *Egfrb* und *Xmrk* zeigten, daß der onkogene Rezeptor 14 Punktmutationen enthält. Zwei Mutationen befinden sich in der extrazellulären Domäne des transmembranen Rezeptors und zeigen sich in *in-vitro*-Experimenten verantwortlich für die konstitutive, ligandenunabhängige Aktivierung von *Xmrk*. Es handelt sich um 1. einen Serin-Cystein-Ersatz in Position 578 (C578S) und 2. eine Substitution von Glycin durch Arginin in Position 359 (G359R) (Gomez et al. 2001 [34]).

In weiteren Experimenten wurde der Frage nachgegangen, inwiefern diese zwei Mutationen auch *in vivo* für die onkogene Aktivierung des Rezeptors verantwortlich seien. Es zeigte sich, daß in beiden Fällen die einzelne Mutation ausreichend war, um dem Rezeptor onkogenes Potential zu verleihen. Die G359R-Mutation induzierte allerdings eine signifikant höhere Tumorraten als die C578S-Mutation (Winnemöller et al. 2005 [35]).

1.4. Regulation des Zellzyklus

1.4.1. Kontrollmechanismen

Eine jede Zelle hat zu jedem Zeitpunkt drei verschiedene Möglichkeiten. Sie kann sich ruhig verhalten (Stase), sie kann sich teilen (Mitose) oder sie kann sterben (Apoptose). Einige Zellen haben noch die Möglichkeit, sich zu differenzieren. Die Entscheidung der Zelle für eine der Verhaltensweisen hängt von einer Vielzahl von inneren und äußeren Signalen ab. Onkogene und Tumorsuppressorgene besitzen Schlüsselrollen in der Erzeugung und Interpretation dieser Stimuli.

Der Zellzyklus besteht aus vier Phasen, der G1-, S-, G2- und M-Phase. In der G1- und G2-Phase bereitet sich die Zelle durch Wachstum und vermehrte Proteinsynthese auf die

Zellteilung vor, in der S-Phase erfolgt die DNA-Replikation, und in der M-Phase teilt sich die Zelle schließlich.

Drei Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle dieses Systems. pRB, TP53 und CDKN2A sind „Wächter der Zelle“, ihre Funktion ist es, zu entscheiden, ob eine Zelle in die Mitose geht oder nicht. Die Gene, die für diese Proteine codieren, spielen eine zentrale Rolle in der Entstehung von Tumoren. Sie gehören zu den am häufigsten alterierten, defekten Genen in malignen Zellen (Strachan et al. 1999 [36]).

1.4.2. Die Funktion des Zellzyklusinhibitors CDKN2A

CDKN2A (p16, p16^{INK4a}, MTS1) ist entscheidend in die Kontrolle des G₁-S-Restriktionspunkts des Zellzyklus involviert. An diesem Punkt entscheidet sich für eine Zelle unwiderruflich, ob sie in die Zellteilung eintreten wird oder nicht. CDKN2A kontrolliert pRB, einem der wichtigsten Zellzyklusinhibitoren. Es verhindert die Inaktivierung von pRB und trägt damit wesentlich zur Stase der Zelle bei. Ein Funktionsverlust von CDKN2A führt zu einem Funktionsverlust von pRB und ermöglicht unkontrolliertes Zellwachstum (Strachan et al. 1999).

Die Bedeutung der Integrität des Tumorsuppressorgens CDKN2A für die Genese von Malignomen, bzw. im engeren Sinne für sporadische/familiäre maligne Melanome, wurde in verschiedenen Studien eingehend untersucht.

cdkn2a ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9p21) lokalisiert. Es hat sich gezeigt, daß dieses Tumorsuppressorgen in diversen Tumorzelllinien, Melanomzelllinien eingeschlossen, in hoher Frequenz deletiert oder mutiert ist (Tang et al. 1999 [37]; Kamb et al. 1994 [38]). Analysen des Mikrosatellitenstatus von Melanomen sporadischer Genese ergaben ebenfalls, daß Deletionen beider Allele von 9p21 (LOH) in diesen Tumoren gehäuft auftraten (Kumar et al. 1999 [39]; Peris et al. 1995). In Zusammenschau aller Ergebnisse wird der chromosomale Locus 9p21 als „familial melanoma susceptibility locus“ bezeichnet (Newton Bishop JA et al. 2005 [40]) und das hier lokalisierte Gen *cdkn2a* für die Genese spontaner und familiärer Melanome zumindest mitverantwortlich gezeichnet (Puig S et al. 2005 [41]). Diese Ergebnisse werden durch übereinstimmende Daten an Experimenten mit Melanomzelllinien (Walker et al. 1998 [42]) und Mäusen (Krimpenfort et al. 2001 [43]) bestätigt.

Schon in früheren Studien wurde gesehen, daß das Homolog zu CDKN2A im *Xiphophorus* Melanom Modell, CDKN2X, in die chromosomale Region des vermuteten Tumorsuppressorlocus *R* (auch als *DIFF* bezeichnet) fällt (Kazianis et al. 1998 [44]). Weiterführende Experimente versuchten zu zeigen, dass *cdkn2x* der gesuchte Repressorlocus *R* des Modells sei, was bis heute aber nicht zu beweisen war. Ganz im Gegenteil wurde in malignen Melanomen von *Xiphophorus*-Hybriden eine signifikante Überexpression des Gens auf RNA-Niveau gefunden (Kazianis et al. 2000 [45]), ein Ergebnis, das im Gegensatz zu den Ergebnissen von humanen und murinen CDKN2A-Forschungen steht.

1.4.3. Eine Vielzahl von „Wächtern des Genoms“

Neben CDKN2A (p16) sind noch viele andere Gene bekannt, deren Produkte die Zelle vor schädlichen Einflüssen schützen und die Integrität des Genoms wahren sollen. Zu den klassischen Tumorsuppressorgenen gehören *RBI* und *TP53*.

pRB, das Genprodukt von *RBI*, ist einer der wichtigsten inhibierenden Faktoren des Zellzyklus und zusammen mit CDKN2A und anderen Proteinen verantwortlich für das Passieren einer Zelle des G₁-S-Restriktionspunkts (s. oben) und die nachfolgende Zellteilung (für Reviews über pRB siehe Korenjak et al. 2005 [46]; Seville LL et al. 2005 [47]; Hatakeyama et al. 1995 [48]; Weinberg 1996 [49]).

Der Verlust oder die Mutation von p53 repräsentiert wahrscheinlich den häufigsten einzelnen tumorigenen Zellschaden und ist eine der am weitesten verbreiteten genetischen Aberrationen in Tumorzellen. Die Funktionen von p53 sind vielfältig (Transkriptionsfaktor, Apoptose-Induktor, Zellzyklusinhibitor), tragen jedoch alle zur Wahrung der Integrität des Genoms bei und machen p53 zu einem unabkömmlichen „Wächter des Genoms“ und zu einem der wichtigsten Zellzyklusinhibitoren (Strachan et al. 1999).

Mutationen sind der Treibstoff der Evolution. Sie bedeuten bestenfalls eine stetige Adaptation von Organismen an die Umwelt und schlimmstenfalls ihre Vernichtung durch eine primär pathogene Wirkung. Zellen besitzen deswegen umfassende DNA Reparatur-Mechanismen, die schädliche Mutationen frühzeitig erkennen und korrigieren sollen (für einen Review siehe Melnick AM et al. 2005 [50]; Oktoberausgabe 1995 von *Trends in Biochemical Sciences* [51]).

Die Vielzahl der Mutationen tritt während der DNA-Replikation auf, da die DNA-Polymerase wie alle Enzyme zu Fehlern neigt.

Eines der zellulären DNA Reparatur-Systeme wird *Mismatch Repair (MMR) System* genannt. Dieser Reparaturmechanismus ist verantwortlich für die Korrektur falsch gepaarter Basenpaare, einer der häufigsten Fehler der DNA-Replikation. Defekte in diesem System führen zu 100-1000 Mal höheren Mutationsraten als normal und wirken tumorigen (s. z.B. *HNPCC*) (Strachan et al. 1999).

Das *Mismatch Repair System* besteht aus mehreren Proteinen, von denen besonders zwei, *MSH2* und *MLH1*, in engeren Zusammenhang mit MSI-H gebracht wurden (Strand et al. 1993) (für *Reviews* über das *MMR* System siehe Charames et al. 2003 [52]; Grady 2004 [53]; Schofield et al. 2003 [54]). Es wurde gezeigt, daß Defekte in den codierenden Regionen von *MMR*-Genen wahrscheinlich die Ursache für die genomische Aberration MSI-H in Tumoren darstellen (vgl. *HNPCC*) (für einen *Review* siehe Whitehouse et al. 1998 [55]). Am intensivsten wird dieses Phänomen derzeit am kolorektalen Karzinom untersucht (z.B. Lawes et al. 2005 [56]).

1.5. Spezielle Fragestellung dieser Arbeit

Das *Xiphophorus Melanom Modell System* bietet zwei große Vorteile. 1. Melanocytische Läsionen verschiedener Arten und mit variierenden Malignitätsgraden können leicht erzeugt werden. Der jeweilige Phänotyp ist dank seines genetisch kontrollierten Hintergrunds klar definiert und reproduzierbar. 2. Der einheitliche genetische Hintergrund des Modells läßt die Abgrenzung unentbehrlicher Schritte der Tumorgenese gegenüber zufälligen sekundären Ereignissen zu.

In dieser Arbeit sollte hauptsächlich der Frage nachgegangen werden, ob MIN+ ein obligates molekulares Ereignis für die Progression von Melanomen bis hin zum terminalen Stadium darstellt. Wäre dies der Fall, müßten alle (analysierten) fortgeschrittenen Tumorstadien dieses Phänomen aufweisen.

Dieser Fragestellung wurde unter Verwendung PCR-basierter Mikrosatelliten-Analysen sowie Multi-Locus Finger-Print Analysen nachgegangen.

Ebenso wurde mittels der Polymerasekettenreaktion eine erste abschätzende Expressionsanalyse von dreien der für die Integritätswahrung des Zellzyklus bedeutendsten Tumorsuppressorgen sowie einem MSI-H assoziierten DNA-

Reparaturen in verschiedenen melanocytischen Läsionen sowie Kontrollgeweben durchgeführt.

2. MATERIAL

2.1. Fische

2.1.1. Mikrosatellitenanalysen und MLFPs

Alle analysierten Fische wurden unter Standardbedingungen (Kallmann 1975) im Aquarium des Biozentrums der Universität Würzburg gekreuzt und gehalten. Für die Untersuchungen auf genomische Instabilität wurden entweder Tumoren von Hybriden der Gattung *Xiphophorus* (19 Tumoren) oder von Klonen der Art *Poecilia formosa* (4 Tumoren) verwendet.

Folgende Tumoren stammten von Hybriden der Gattung *Xiphophorus*:

(1) 10 Melanome einschließlich eines Rezidivs stammten von Hybriden aus Rückkreuzungslinien (Backcross Hybrids, BC Hybrids), wobei nur Fische, die das Produkt von bereits mehr als 20 Rückkreuzungen darstellten, verwendet wurden (>20 Rückkreuzungs-Generationen). Diese Fische tragen das X-Chromosom von *X. variatus* (Herkunft Rio Panuco), welches den Makromelanophoren-Locus „Lineatus“ (*Mdl^{Ll}-Xmrk*) enthält, im genetischen Hintergrund von *X. hellerii* (Zuchtlinie hIII, *Db-*, Herkunft Rio Lancetilla) und sind homozygot für die Mutation am Albino-Locus (*a/a*; Individuen des Stammbaums #917).

Fische mit diesem Genotypen entwickeln früh aus amelanotischen Makromelanophoren aufgebaute benigne Hyperplasien, die die Flanken lückenlos überziehen. Zum Zeitpunkt der sexuellen Reife entwickelt sich dann an der Schwanzwurzel ein überwiegend exophytisch wachsendes amelanotisches Melanom. Tumoren dieser Art zeigen ein breites Spektrum bezüglich Wachstumsgeschwindigkeit und terminaler Größe. In dieser Studie wurden nur die größten Tumoren mit hoher Wachstumsrate analysiert.

(2) 5 Tumore stammten von Rückkreuzungs-Hybriden (>20 Rückkreuzungs-Generationen), die das X-Chromosom von *X. maculatus* (Herkunft Rio Jamapa), welches den Makromelanophoren-Locus „Spotted dorsal“ (*Mdl^{Sd}-Xmrk*) enthält, im genetischen Hintergrund von *X. hellerii* (Zuchtlinie hIII, *Db-*, Herkunft Rio Lancetilla) trägt. Diese Fische sind heterozygot für die Mutation am Albino-Locus (*a/+*; Stammbaum #534).

In Abhängigkeit vom Verbleib des Tumorsuppressor-Locus *R* im Genom dieser Fische entwickeln sich einerseits benigne melanozytische Läsionen, so lange *R* noch präsent ist, andererseits jedoch maligne, invasiv und exophytisch wachsende melanotische Melanome, sobald *R* eliminiert worden ist. Nur die letztgenannten Tumoren wurden in dieser Studie verwendet.

Des Weiteren wurden Tumoren von zwei Fischen des gleichen Genotyps, die jedoch homozygot für die Mutation am Albino-Locus waren, untersucht (*a/a*; Stammbaum #563). Diese Neoplasien treten zu einem früheren Zeitpunkt in der Individualentwicklung auf als vergleichbare Tumore des Wildtyps, zeigen jedoch ein langsames, exophytisch betontes Wachstumsmuster.

(3) Die DNA eines weiteren Tumors wurde von einem Rückkreuzungshybriden (>20 Rückkreuzungs-Generationen) gewonnen, der das Y-Chromosom von *X. maculatus* (Herkunft Rio Jamapa) mit dem mutierten Makromelanophoren-Locus „Striped“ (*Mdl^{Sr-Mut}-Xmrk*) im genetischen Hintergrund von *X. hellerii* (Zuchtlinie hIII, Herkunft Rio Lancetilla) trägt. Dieser Fisch zeigt an den seitlichen Partien des Körpers nur eine leichte Hyperpigmentierung anstelle des sonst kräftiger entwickelten Musters.

Ungefähr ein Prozent dieser Fische entwickelt spontan hochmaligne Melanome, die wahrscheinlich auf somatische genetische oder epigenetische Veränderungen zurückzuführen sind.

(4) Ein weiterer Tumor entstammte einem Hybriden, dessen X-Chromosom den Locus „*Dorsal red*“ enthielt, dem aber der Makromelanophoren-Locus fehlte. Dieser Fisch gehörte der ersten Rückkreuzungsgeneration eines gezüchteten Stamms aus der Kreuzung *X. maculatus* mit *X. hellerii* an (Stammbaum #1437). Dieses Melanom hatte sich spontan an der Schwanzwurzel des Fisches gebildet und ein solides, langsames, exophytisch ebenso wie invasiv betontes Wachstum gezeigt.

Bei dem Amazonen Molly *Poecilia formosa* (Stammbäume #922 und #1064) handelt es sich um einen gynogenetischen Fisch, der zur Fortpflanzung das Spermium eines artverwandten Fisches, z. B. des *Black Mollies*, benötigt. Durch paternale Introgression können den Nachkommen Mikrochromosomen vererbt werden (Stammbaum #1064), die einen bisher nicht näher charakterisierten Makromelanophoren-Locus enthalten (Lamatsch et al. 2000 [57]). Ungefähr 5% der Mikrochromosom-tragenden Fische entwickeln exophytisch-nodulär oder -papillomatös, nicht-invasiv wachsende Pigmentzelltumoren an ihrer Schnauze (Schartl 1997 [58]).

2.1.2. Reverse-Transkriptase-Analysen

Für die Untersuchungen auf RNA-Ebene dienten als Referenzgewebe gepoolte Normalgewebe (Leber, Niere, Milz, Hirn, Haut, Kiemen, Augen, Muskel, Hoden und Herz) von tumorfreien Segreganten des Genotyps *Mdl^{Sd}-Xmrk*. Diesen Fischen fehlten die Mutationen am Albino-Locus (+/+; Stammbaum #407).

Gegenstand der Analysen stellten Unterschiede im Expressionsmuster verschiedener Gene von gepoolten malignen sowie benignen melanozytischen Läsionen, dem Lebergewebe der Fische mit malignen Melanomen sowie der PSM-Melanomzelllinie dar. Beide Melanomarten einschließlich der Lebergewebe entstammten Fischen des Genotyps *Mdl^{Sd}-Xmrk a/+* (534).

2.2. Oligonukleotide

2.2.1. Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden zur exakten Größenbestimmung von Mikrosatelliten DNA-Fragmenten mittels des ALFexpress DNA Analysis Systems von MWG BIOTECH, Ebersberg, Deutschland bezogen (Tabelle 2.1). Zur Detektion waren alle Forward-Primer (erstgenannt) 5' Cy5-markiert.

Tabelle 2.1: Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide

<i>Name</i>	<i>Sequenz 5' - 3'</i>	<i>Sequenz der repetitiven Einheit</i>	<i>T_m (°C)</i>	<i>Produktgröße (bp)</i>
Kon D6	CTTTAATACCCAATCAGTGG CAACTGGAAGAGGAGTTGTC	(CA) ₇	53°C	220-290 bp
Kon D8	CCAAGGATATTGCTGACTCC TTCAGTGGCTTAAAGGCAG	(CA) ₇	48°C	240-280 bp
Kon D10	CAGGACTTAGAATTAACAGG AGAACCAGTTGGACTGACAG	(CA) ₁₃	52°C	300-600 bp
Kon D15	CATCCAGCCTGCTTAGTGAG TGTTTCGTCATTAATTTGCAG	(CA) ₁₇	52°C	250-350 bp
Kon D21	TCATCTGGAGCAGGCACATG GCGTTTGGTTTCTACTGAC	(CA) ₁₅	57°C	270-350 bp
Kon D26	CTTCTCCAACCAAGAACTG TTGCAGACTGCTTTGTTCTG	(GT) ₁₃	54°C	300-350 bp
Kon D29	CAGAACGATGAAACAGAATC TGACCATGCTACAGAGTGG	(GT) ₁₂	52°C	280-350 bp
Kon T30	CCCAGTTTTATTATTATCAT GGAAGAGATTTTATTATTAT	(TAA) ₁₀	44°C	< 200 bp
Kon T38	CGACGTGTAGAACTGAGTA CTCTATTCTGGTTTGACAT	(ATT) ₆	48°C	130-200 bp
Sat1 a b	ACAGCAGCTGTTCACGGC TCGGAGGAAAAACAGATGAC	(CA) ₂₃ CGTA(CA) ₁₀	58°C	80-220 bp
Sat7 a b	TCGCAGCTGTCCAGTAA GATCAGTATGTGCACCG	CACCACACG(CA) ₁₀	52°C	60-100 bp
Sat2 c d	ACTTATTGCAGAAGTTTAGCGCA CAAATTCAGGACAGGTGAGGAC	CAGA(CA) ₉ CCA	58°C	100 bp

2.2.2. Oligonukleotide für die Reverse-Transkriptase-PCR

Folgende Oligonukleotide wurden zur Genexpressionanalyse bei MWG BIOTECH, Ebersberg, Deutschland bestellt (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Oligonukleotide für die Reverse-Transkriptase-PCR

<i>Name</i>	<i>Sequenz 5' - 3'</i>	<i>Produkt</i>	<i>T_m (°C)</i>	<i>Produktgröße (bp)</i>
RB- F1	AGCTTCATCAAGGCTGA(AG)CC	aus Sequenzvergleichen zwischen <i>rb.medaka.cDNA</i> (*AY008289) mit <i>rb.rainbow trout.cDNA</i> (*AF102861)	60°C	529
RB- R1	TGGC(AC)GACATCATCAACTGG			
p53- F1	GAAGCTGTTCTGCCAGCTGG	aus Sequenzvergleichen zwischen	60°C	561
p53- R1	CTCCACTAGAGGCAGACTTG	<i>X.maculatus.p53.mRNA</i> (*AF043947) mit <i>X.hellerii.p53.mRNA</i> (*AF043946)		
MSH2- F1	GCGGGCAAGTATCTCACTGATG	Oligonukleotide aus Exon 1 von MSH2, <i>X. maculatus</i> ;	62°C	328
MSH2- R1	GTGTGTGCGACCAGAGTTTGG	aus <i>Blastx</i> von MSH2 verschiedener Organismen: <i>Danio rerio</i> (*AF412833); <i>Xenopus</i> (*S53609); <i>Homo sapiens</i> (*XM_034901, *XM_034898); <i>Rattus norvegicus</i> (*NM_031058); <i>Mus musculus</i> (*NM_008628)		
CDKN2- F1	AGCTGTGAGTAGTTTATCGGC	Oligonukleotide aus Exon 1 und 2 von CDKN2X, <i>X. maculatus</i> (*U69273)	58°C	512
CDKN2- R2	GCCACATAGTTATAGAGTCTCC			

* Zugangsnummer der Genbank (Gene Bank Accession Number)

2.3. Enzyme und Enzymkits

DNase	GibcoBRL Life Technologies™, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Perfect Match®	PCR Enhancer, Stratagene, Deutschland
Proteinase K	Eurogentec, Belgien
Taq DNA Polymerase	Präparation von M. Gessler, Biozentrum, Universität Würzburg

2.4. Zelllinien

PSM (<i>Platy-Swordtail-Melanoma</i>)	abgeleitet von einem amelanotischen Melanom eines <i>Xiphophorus</i> F1-Hybriden (<i>maculatus/helleri</i>) nach Y. Wakamatsu (Wakamatsu 1981 [60])
---	---

2.5. Gele und Filterpapier

8% (w/v) Polyacrylamid	ReproGel High Resolution, Amersham Biosciences, Freiburg
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel

2.6. Geräte

Gewebehomogenisator für die RNA-Isolation	Ultra-Turrex T5, KIKA, Staufen
PCR-Maschinen	PCR Express, Hybaid, Heidelberg T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen
Geltrockner (MLFP)	Model 583 Gel Dryer, Bio-RAD, München
Zentrifugen	Biofuge 15, Heraeus, Sepatech Labofuge ^{GL} , Heraeus Christ Sorvall® RC-5B (Rotor: SS34)
UV Spektralphotometer	GeneQuant II, Pharmacia LKB, Freiburg
UV Transilluminator	HerolabUVT 2020 (254 nm)
Sequenzierer	ALFexpress/ALF DNA Analysis System; Amersham Biosciences, Freiburg

2.7. Chemikalien und Sonstiges

dNTPs life	100mM dNTP Set, PCR Grade, Invitrogen TM technologies, Karlsruhe)
ALFexpress Loading dye	Amersham Biosciences, Freiburg
ALFexpress Sizer	Amersham Biosciences, Freiburg
1 Kb DNA Ladder	GibcoBRL Life Technologies TM , Karlsruhe
Phenol	Roti®-Phenol, Carl Roth®, Karlsruhe

SST-Röhrchen	BD Vacutainer Systems, Preanalytical Solutions, Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK
SUPERSCRIPT™II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen™ life technologies, Karlsruhe
Trizol®Reagenz	GibcoBRL Life Technologies™, Karlsruhe
HAM'S F12-Medium	GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland

2.8. Software

Easy plus Rev 3.16	Herolab, Wiesloch
ALX2ALF-Programm, FM Programm (Fragment Manager)	Amersham Biosciences, Freiburg

3. METHODEN

3.1. Isolierung hochmolekularer DNA (Methode nach Blin & Stafford, 1976)

Nachdem die Fische auf Eis getötet worden waren, folgte die Entnahme der tumorfreien Gewebe (Gehirn, Kiemen, Augen, Leber, Herz, Milz) sowie die sorgfältige Exzision des Melanoms. Die Proben wurden nach der Methode von Blin & Stafford (Blin et al. 1976 [61]) entweder frisch oder nach Lagerung bei -80°C in 1ml Extraktionspuffer aufgenommen und mittels Glashomogenisator vorsichtig zerkleinert. Anschließend wurden die tumorfreien Kontrollgewebe für 3h bei 80°C in einem Wasserbad inkubiert, die Tumorproben wurden direkt der Phenolisierung unterzogen.

Tumorproben:

Nach Zugabe von 0.5 Volumen Phenol wurden die Proben für 10 min auf einem Taumelschüttler geschwenkt und zur Phasentrennung für weitere 10 min bei 2000 Umdrehungen pro Minute (rpm, rounds per minute) zentrifugiert (Biofuge 15, Heraeus). Der klare Überstand wurde in SST-Röhrchen umgefüllt, auf Eis gekühlt und mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde die Extraktion wahlweise wiederholt.

Zur Phasentrennung wurden die SST-Röhrchen 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert (Labofuge GL, Heraeus Christ); der Überstand in gekühlte Corex-Röhrchen umgefüllt und mit 2.5 Volumen kaltem Ethanol (EtOH) 100% gefällt. Nach 10-20minütiger Inkubation auf Eis wurde die hochmolekulare DNA auf Glasstäbchen gewickelt, kurz in kaltes EtOH 70% getaucht und bei 4°C in Tris-EDTA Puffer (TE), pH 8.0, gelöst.

Gewebeproben:

Nach der 3stündigen Inkubation im Wasserbad wurden die Proben ebenfalls in SST-Röhrchen umgefüllt, mit 0.5 Volumen Phenol versetzt und 10 min geschwenkt. Nach Hinzufügen von 0.5 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) zu jeder Probe wurden diese wieder für 10 min geschwenkt und für weitere 10 min bei 2800 rpm zentrifugiert (Labofuge GL; Heraeus Christ). Dieser Vorgang wurde mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol wiederholt, der Überstand in gekühlte Corex-Röhrchen gegeben und die weitere Extraktion der DNA wie bei den Tumorproben beschrieben durchgeführt.

<i>Extraktionspuffer:</i>	<i>TE:</i>
100 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) pH 8.0	10 mM Tris-Cl pH 8.0
200 mM NaCl	1 mM EDTA pH 8.0
0.2 % Natriumdodecylsulfat (SDS)	
200µg/ml Proteinase K (frisch zusetzen)	

3.2. Isolierung von Gesamt-RNA und Umschreiben in cDNA

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNase wurden ausschließlich autoklavierte, separat gelagerte Pipettenspitzen und Eppendorff-Caps sowie mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser (1:1000) angesetzte Lösungen verwendet, Glaswaren wurden 4h bei 180°C gebacken.

Die RNA-Präparation wurde mit TRIzol®Reagenz (GibcoBRL) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Alle Gewebeproben wurden bei -80°C gelagert. Je nach benötigtem Probenvolumen wurden bis zu 300 mg Gewebe einer Probe entweder in 1ml TRIzol (bis zu 100 mg Gewebe) oder in 2ml TRIzol (100 mg bis 300 mg Gewebe) homogenisiert.

Die Homogenisierung erfolgte für jede Probe in drei aufeinanderfolgenden, jeweils einminütigen Durchgängen mit zwei einminütigen Pausen. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde die Klinge vor jedem Probenwechsel zweimal mit DEPC-Wasser und anschließend kurz mit RNase-freiem EtOH abgespült.

Zur Reinigung der homogenisierten Proben von hochmolekularer DNA, Proteinen etc. wurden diese 10 min bei 10 000 rpm und 4°C (Labofuge^{GL}, Heraeus Christ; Kühlraum) zentrifugiert. Die klaren Überstände wurden in frische Eppendorff-Caps überführt, pro 1ml initialem TRIzol-Reagenz mit 200µl Chloroform versetzt und kurz mit der Hand geschüttelt. Nach einer 2-3minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde erneut für 15 min bei 10 000 rpm und 4°C zentrifugiert und der farblose, die RNA enthaltende Überstand anschließend in frische 1.5ml-Eppendorff-Caps überführt.

Nach Zugabe von 500µl Isopropanol pro 1ml initialem TRIzol-Reagenz und leichtem Schütteln der Proben per Hand präzipitierte die RNA, zur Pelletierung wurden die Proben 10 min bei 10 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets mit 1ml EtOH 75% pro 1ml initialem TRIzol-Reagenz gewaschen und für 10 min bei 10 000 rpm und 4°C abzentrifugiert, danach wurde der Überstand erneut verworfen und die Pellets in einem vorgeheizten Thermoblock bei 56°C für 30-60sec kurz angetrocknet (die RNA darf keinesfalls zu trocken werden). Jedes Pellet wurde anschließend in 175µl DEPC- oder sterilem Injektionswasser für 10 min bei 55-60°C gelöst.

DNase-Verdau:

Die in einem Volumen von 175µl gelösten RNAs wurden mit 20µl 10x DNase-Puffer sowie 3-4µl des Enzyms DNase (ca. 35 Units, Enzymeinheiten, U) versetzt. Nachdem die Proben kurz per Hand geschüttelt und abzentrifugiert worden waren, erfolgte eine 30minütige Inkubation bei 37°C in einem vorgeheizten Thermoblock.

Nach Zugabe von Phenol (einfaches Volumen = 200µl) wurden die Proben gut gemischt und 5 min bei 13 000 rpm und RT zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde vorsichtig in ein frisches Eppendorff-Cap überführt und mit dem einfachen Volumen Chloroform (200µl) versetzt; nach Durchmischung und Zentrifugation (5 min, 13 000 rpm, RT) wurde der Überstand erneut abgezogen, in ein frisches Eppendorff-Cap überführt und die RNA mit 0.1 Volumen 4M (Molarität in mol/l) Lithiumchlorid (LiCl) und dem 2.5-fachen Volumen EtOH 100% bei -80°C für mindestens 30 min, besser O/N (over night; über Nacht) gefällt.

Nach Zentrifugation (30 min, 13 000 rpm, 4°C) wurde die pelletierte RNA mit 200µl EtOH 70% gewaschen und 10 min bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die RNA kurz angetrocknet (vgl. oben), danach in einem geeigneten Volumen DEPC- oder sterilem Injektionswasser gelöst.

Als letzter Schritt erfolgte die spektralphotometrische Vermessung der RNA bei 320 nm.

10x DNase- Puffer:

500 mM Tris pH 7.5

100 mM MgCl₂

3.2.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Die RNA-Präparation aus Zellen glich im Wesentlichen der oben dargestellten Isolation von RNA aus Geweben.

8 x 10⁶ Zellen (pelletiert) wurden in 1ml TRIzol aufgenommen und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren lysiert. Mit den homogenisierten Gemischen wurde wie oben beschrieben verfahren. Die Proben wurden durch Zentrifugation (10 min, 10 000 rpm, 4°C) von Resten hochmolekularer DNA, Proteinen etc. gereinigt, die die RNA enthaltenden Überstände der Phasentrennung mit Chloroform zugeführt und dem Protokoll entsprechend prozessiert.

3.2.3. Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA (complementary = komplementäre DNA) wurde der Kit „SUPERSCRIPTMII RNase H⁻ Reverse Transcriptase“ (InvitrogenTM) verwendet. 2µg Gesamt-RNA wurden mit 10 pmol Hexanukleotiden zufälliger Sequenz sowie 1µl eines 10mM dNTP (Nukleotidtriphosphat)-Mixes versetzt und mit RNase-freiem, sterilen Wasser auf ein Volumen von 13µl aufgefüllt. Nach 5minütigem Erhitzen auf 65°C, kurzer Abkühlung auf Eis und Abzentrifugation wurden dem Ansatz 4µl 5x First-Strand Buffer und 2µl 0.1M 1,4-Dithiothreitol (DTT) hinzugefügt. Nach zweiminütiger Inkubation bei 42°C wurde das Reaktionsgemisch mit 1µl des Enzyms SUPERSCRIPTMII versetzt, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren sorgfältig gemischt und für 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch eine 15minütige Inkubation bei 70°C gestoppt und die fertige cDNA bei -20°C gelagert.

3.3. Amplifizierung von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al. 1988 [62])

Mittels spezieller DNA-Polymerasen, die *Taq*-Polymerasen des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus*, ist es möglich, ein von Startsequenzen flankiertes DNA-Fragment in einem automatisierten Verfahren selektiv zu vervielfältigen.

3.3.1. Amplifizierung genomischer DNA

Für die Amplifikation eines genomischen DNA-Fragments in einem Ansatzvolumen von 50µl wurden 100ng DNA als Matrize eingesetzt. Spezifische Primer in einer

Konzentration von 50mM, auf 1.25mM konzentrierte dNTPs und eine Einheit der Taq-Polymerase wurden hinzugefügt. Weiterhin wurden zur Verbesserung des Ergebnisses 2.5µl Dimethylsulfoxid (DMSO) oder 0.3µl des PCR Enhancers Perfect Match® hinzugefügt. Die Reaktion fand in 1x PCR-Puffer statt.

Zuerst wurde die DNA 3min bei 94°C denaturiert. Es folgten 35 Wiederholungszyklen à 3 Schritte: 1. Die Denaturierung der DNA benötigt 45sec bei 94°C. 2. Die Anlagerung der Primer an die komplementären DNA-Sequenzen (*Annealing*) erfolgte für 30sec bei einem primerspezifischen Temperaturoptimum, jeweils 2°C unterhalb ihrer Schmelztemperaturen. 3. Die DNA-Synthese erfolgte bei 72°C, die Dauer dieses Schritts wurde in Abhängigkeit von der Größe des zu erwartenden Produkts festgelegt (pro 1000 Nukleotide 1min).

Abschließend erfolgte ein finaler Elongationsschritt für 5min bei 72°C.

10x PCR-Puffer:

- 100 mM Tris-Cl pH 8.8
- 500 mM KCl
- 15 mM MgCl₂
- 1 % Triton X- 100

3.3.2. Amplifizierung von cDNA

Das Prinzip einer RT-PCR ist das gleiche wie das der PCR (s. 3.3.1.), der einzige Unterschied besteht in der Menge der benötigten cDNA bzw. ursprünglichen RNA: Für einen Gesamtansatz von 20µl wurden ca. 200ng der ursprünglichen RNA verwendet.

3.3.3. Amplifizierung von DNA mittels Fluoreszenz-markierter Primer

Amplifizierungen von DNA-Fragmenten mit Fluoreszenz-markierten Primern folgten dem unter 3.3.1. beschriebenen Prinzip einer PCR. 5' Cy5-markierte Primer wurden zu einer weitaus exakteren Größenbestimmung von DNA-Fragmenten als mit einer normalen PCR möglich herangezogen (vgl. 3.5.). Der lichtempfindliche Farbstoff sowie alle Produkte, die ihn enthielten, wurden in Aluminiumfolie verpackt gelagert.

3.4. DNA-Gelelektrophorese und -Konzentrationsbestimmung

3.4.1. Agarose-Gelelektrophorese

In der vorliegenden Arbeit wurden Agarosegele mit Konzentrationen zwischen 0.8% und 1.5% verwendet. Die benötigte Agarose-Menge wurde in 1x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer aufgenommen und im Mikrowellengerät geschmolzen. Nach Abkühlung unter 60°C wurde die flüssige Agarose in entsprechende Gelkammereinsätze gefüllt. Nach Erhärtung wurde das Gel in eine mit 1x TBE gefüllte Gelkammer eingesetzt, die Proben mit 0.1 Volumen eines 10x Probenpuffers versetzt und in die Geltaschen geladen. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde ein Längenstandard aufgetragen, der Fragmente bekannter Größe enthielt.

Genomische DNA wurde bei ca. 3 V/cm aufgetrennt, durch Restriktionsendonukleasen aufgespaltene DNA bei bis zu 5 V/cm. Anschließend wurde das Gel für 20-40min in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und auf dem UV-Transilluminator bei 254 nm photographiert.

10x TBE-Puffer:

900 mM Tris
900 mM Borsäure
10 mM EDTA, pH 8.0

10x Probenpuffer:

50% Glycerin
100 mM EDTA, pH 8.0
1% SDS
0.25% Bromphenolblau
0.25% Xylencyanol

3.4.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um eine höhere Auflösung von Nukleotidfragmenten zu erzielen als mit Agarosegelen möglich, wurden verschiedenprozentige vertikale PAA-Gelsysteme verwendet. Von besonderem Nutzen waren biphasische Polyacrylamidgele, deren obere Phase (Sammelgel) eine Konzentrierung der DNA-Fragmente bewirkte, bevor sie dann in der unteren Phase (Trenngel) akkurat aufgetrennt wurden.

Stammlösungen:

A	1N HCL	48 ml	B	1N HCL	48 ml
	Tris	36.6 g		Tris	5.98 g
	TEMED	0.46 ml		TEMED	0.46 ml
	H ₂ O	auf 100 ml auffüllen		H ₂ O	auf 100 ml auffüllen
C	Acrylamid	30 g	D	Acrylamid	10 g
	Bisacrylamid	0.8 g		Bisacrylamid	2.5 g
	H ₂ O	auf 100ml auffüllen		H ₂ O	auf 100ml auffüllen

Die Lösungen A und C wurden für die Herstellung des Trenngels, B und D für die des Sammelgels benötigt. Für ein 12%-iges Gel wurden 5ml der Lösung A, 12.5ml der Lösung C und 400µl APS (Ammoniumperoxodisulfat) 10%zusammenpipettiert und mit 22ml Millipore-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 40ml aufgefüllt. Durch die Zugabe des APS wurde die Polymerisationsreaktion gestartet, der Gelansatz nach Durchmischung deshalb zügig und luftblasenfrei in die vorbereitete Gelkammer umgefüllt und mit einer dünnen Schicht Millipore-Wasser überschichtet.

Nach Auspolymerisation wurde die dünne Wasserschicht abgossen und die zu ¾ gefüllte Gelkammer mit dem Sammelgel aufgefüllt. Für diese Phase wurden 1.25ml der Lösung B, 3.2ml der Lösung D, 60µl APS 10% und 11.3µl TEMED (N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin) zusammenpipettiert und mit 5.6ml Millipore-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10ml aufgefüllt. TEMED wurde als letztes hinzugefügt.

Zur Veränderung der Prozentigkeit des Trenngels wurde der Anteil an Polyacrylamid (Lösung C) proportional zur Prozentigkeit variiert und mittels des Wasservolumens an das Gesamtvolumen adjustiert.

Nach der vollständigen Erhärtung wurde das Gel in eine mit 0.25x Davis-Puffer gefüllte Gelkammer eingesetzt, die Proben mit 0.1 Volumen eines 10x Probenpuffers (s. 3.4.1) versetzt und in die Geltaschen geladen. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde ein Längenstandard aufgetragen, der Fragmente bekannter Größe enthielt.

Die Auftrennung erfolgte in Abhängigkeit von der Prozentigkeit des Gels bei ungefähr 10 V/cm. Das Färben und Photographieren der Gele erfolgte wie unter 3.4.1. beschrieben.

10x Davis-Puffer:

Tris 27.25 g

Glycin 129.7 g

mit Millipore-Wasser auf 0.9l auffüllen

3.4.3. Vergleichende DNA-Konzentrationsbestimmung

Genomische DNA unbekannter Konzentration wurde neben einer mit *SaII*-geschnittenen λ -Phagen-DNA bekannter Konzentration als Marker auf ein 0.8%-iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte wie unter 3.4.1. beschrieben. Die Konzentrationsbestimmung der DNA in Relation zum Standard wurde unter Verwendung der Software Easy plus Rev 3.16 von Herolab vorgenommen.

3.5. Exakte Größenbestimmung von DNA-Fragmenten mittels des ALFexpress DNA Analysis Systems

Das ALFexpress/ALF DNA Analysis System bietet die Möglichkeit einer exakten Längenbestimmung von DNA-Fragmenten mittels Laserdetektion von Fluoreszenzfarbstoffen (vgl. 3.3.3.).

Jeweils 0.4-0.8 μ l der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit 3 μ l eines Ladepuffers sowie mit 3 μ l eines individuellen, 2 μ molaren Längenstandards als interne Referenz versetzt. Als externer Größenstandard dienten 3 μ l des ALFexpress Sizers 50-500 nach Zugabe von 1 μ l TE und 3 μ l des Ladepuffers. Nach einer 2.5minütigen Inkubation bei 90°C wurden die Proben in 0.5x TBE in ein hochauflösendes, 8%-iges (w/v) Polyacrylamidgel geladen.

Die vom System als *.alx files* erstellten Rohdaten wurden mittels des ALX2ALF-Programms in *.alf files* konvertiert und via des *FM Programms* ausgewertet.

In dieser Arbeit wurden routinemäßig 38 Proben und zwei externe Standards pro Elektrophorese analysiert, ein Gel wurde ohne Qualitätsverluste bis zu dreimal nacheinander am selben Tag benutzt.

3.6. Multilocus DNA-Fingerprint-Analysen

3.6.1. Enzymatischer Verdau genomischer DNA

4µg genomische DNA wurden mit 40U des Restriktionsenzym *Hinfl* geschnitten (37°C, 16h) und durch Zugabe von 0.1 Volumen 3M NaAc (Natriumacetat), pH 5.5 sowie 2.5 Volumen eiskaltem EtOH 100% gefällt. Nach einer Inkubation O/N bei -20°C erfolgte eine 2stündige Zentrifugation (13 000 rpm, 4°C). Nach dem Verwerfen der Überstände wurden die Proben mit 500µl eiskaltem EtOH 70% versetzt und erneut 30 min bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Lösen der Pellets erfolgte nach restfreiem Abziehen des EtOHs in je 18µl TE bei 4°C.

3.6.2. Gelelektrophorese

Nach Zugabe von 2µl Probenpuffer (s. 3.4.1.) wurden die Proben auf einem 0.8%-igen Agarosegel in 1x TBE bei 1.5 V/cm für 45h bei RT aufgetrennt. Als Größenstandard wurde *BstEII*- bzw. *EcoRI/HindIII*-geschnittene λ-Phagen-DNA aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman-Filterpapier für ca. 4h bei 70°C unter Vakuum auf einem Geltrockner getrocknet.

Auf diese Weise in einen versandfertigen Zustand versetzt, wurden die folgenden Arbeitsschritte routinemäßig im Labor von Prof. J. T. Epplen am Institut für Molekulare Humangenetik in Bochum durchgeführt.

3.6.3. Denaturierung/Neutralisierung des Gels

Das getrocknete Gel wurde in destilliertem Wasser rehydriert, bis sich das Whatman-Papier leicht ablösen ließ. Anschließend wurde das Gel unter leichtem Schwenken für 30 min bei RT denaturiert, gefolgt von einer Neutralisation unter denselben Bedingungen. Nach 10minütigem Waschen in 6x SSC (Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer), pH 7.0, wurden die Gele gerollt und bis zur Hybridisierung in mit 6x SSC-gefüllten Gefäßen aufbewahrt.

<i>Denaturierungslösung:</i>	<i>Neutralisationslösung:</i>	<i>20x SSC:</i>
0.5 M NaOH	0.5 M Tris, pH 8.0	3 M NaCl
0.15 M NaCl	0.1 M NaCl	0.3 M Na-Citrat, pH 7.0

3.6.4. Direkte In-Gel-Hybridisierung

Die direkte Gelhybridisierung eignete sich ebenso wie der Southern Blot zur Darstellung von Banden spezifischer Sequenzen, besaß aber gegenüber des Blots mehrere Vorteile:

1. effizientere Hybridisierung
2. kein DNA- und Zeitverlust durch Membrantransfer-Prozesse
3. Vermeidung von Membranartefakten und
4. die Vorhybridisierung entfiel.

Die Zielbanden wurden mittels komplementärer, radioaktiv markierter „single repeat“-Oligonukleotide unter den elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmenten sichtbar gemacht. Hierbei entstand ein individuelles Bandenmuster, der sogenannte „genetische Fingerabdruck“.

3.6.4.1. Radioaktive Markierung der Proben

Die radioaktive Markierung der Hybridisierungssonden erfolgte in 1x Kinasepuffer in einem Gesamtansatz von 10µl unter Verwendung von 10pmol des gewünschten Oligonukleotids, 5µl (γ -³²P)ATP (5000 Curie/mM) und 1.5U T4 Polynukleotidkinase (Boehringer Mannheim) für 15 min bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl 0.5M EDTA, pH 8.0 beendet. Nach Auffüllen auf ein Gesamtvolumen von 100µl mittels TE-Puffer wurden die radioaktiven Sonden bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert.

Die Trennung markierter Oligonukleotide von nicht-inkorporiertem (γ -³²P)ATP erfolgte mittels Ionenaustausch-Chromatographie über eine Sephadex G-50 Spin Säule.

10x Kinasepuffer:

- 670 mM Tris/HCl, pH 8.0
- 100 mM MgCl₂
- 100 mM Dithiothreitol (DTT)

3.6.4.2. Hybridisierung der Gele

Die Hybridisierungstemperatur sowie die Temperatur der folgenden Waschschrte wurde nach der Basenzusammensetzung der Oligonukleotide errechnet, welche den Schmelzpunkt festlegten: $T_m = 4^\circ\text{C} \times (\text{G+C}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{A+T})$ (Thein et al. 1986 [63]).

Die optimale Hybridisierungstemperatur lag ca. 5°C unterhalb der Schmelztemperatur, so daß die aufgelisteten Oligonukleotide bei folgenden Temperaturen hybridisiert wurden:

(GATA)₄: T_{Hyb}: 35 °C

(GGAT)₄: T_{Hyb}: 43°C

(GT)₈: T_{Hyb}: 48°C

Die Hybridisierung erfolgte für 3-4h in 10ml Hybridisierungslösung (0.025 ml/cm² Gel), der 1x 10⁶ cpm/ml (cpm = counts per minute, Zählpulse pro Minute) des radioaktiv markierten Oligonukleotids zugegeben wurden. Anschließend wurde das Gel zweimal für 30 min bei RT in 500ml 6x SSC gewaschen, gefolgt von einem weiteren 1-1.5minütigem Waschgang in der gleichen, jedoch auf T_{Hyb} vorgewärmten Lösung. Danach wurde das Gel sofort für mindestens 3h bei RT in der gleichen Lösung ein letztes Mal gewaschen.

Nach luftblasenfreiem Umwickeln des Gels mit Frischhaltefolie wurde es bis zu 72h exponiert. Die Röntgenfilme (Kodak X-AR) wurden in einer Entwicklungsmaschine Compact 35 der Firma Protec entwickelt.

<i>Hybridisierungslösung:</i>			<i>100x Denhardt's Lösung:</i>	<i>20x SSPE:</i>
6	x	SSPE	2 g Polyvinylpyrrolidone	3 M NaCl
5	x	Denhardt's Lösung	2 g BSA	0.2 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
			2 g Ficoll	0.02 M Na ₂ EDTA x 2H ₂ O
0.1	%	SDS		
1x 10 ⁶	cpm/ml	radioaktive Oligonukleotide		

3.6.4.3. Entfernung der Radioaktivität zur Rehybridisierung

Die Agarosegele konnten 2-3 Mal rehybridisiert werden. Dazu wurde das radiographierte Gel für ca. 30 min in 5mM EDTA, pH 8.0, bei 65°C gewaschen und die erfolgreiche Entfernung der radioaktiven Sonden mittels eines Phosphoimagers überprüft. Nach 15minütiger Äquilibrium in 6x SSC bei RT konnte die nächste Hybridisierung erfolgen oder das Gel getrocknet und bei RT gelagert werden.

3.7. Zellkultur

Nachfolgende Schritte wurden, soweit nicht anders angegeben, unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.7.1. Zellansaat

Längerfristige Lagerung von Zellen erfolgte in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff.

5×10^6 Zellen wurden zügig bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut und in 5 ml HAM'S F12-Medium aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 1100 rpm, RT; Biofuge 15, Heraeus, Sepatech) wurden die Zellen vorsichtig in 10 ml Medium aufsuspendiert und auf 10 ml-Petrischalen ausgesät.

F12 Medium:

vor Gebrauch versetzen mit:

10	%	FCS (Fötale Kälberserum)
2	mM	L-Glutamin
100	U/ml	Penicillin
100	µg/ml	Streptomycin

3.7.2. Kultivierung von Zellen

PSM-Zellen wurden bei 28°C und 5% CO₂ in Kultur gehalten. Die adhärent wachsenden Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz auf den Kulturschalen umgesetzt. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen und durch die erneute Aufnahme in frisches Medium vorsichtig abgelöst. Nach vollständiger Resuspendierung wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 oder 1:3 auf frische Kulturschalen ausgesät.

Alle 2-3 Tage erfolgte unabhängig von der Zelldichte ein Mediumwechsel.

PBS:

140 mM NaCl

10 mM Na₂HPO₄

1.8 mM KH₂PO₄

2.7 mM KCl pH auf 7.4 einstellen

3.7.3. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt, in der zweimal vier, in 16 Felder unterteilte Quadrate der Grundfläche 1mm² eingraviert waren. Durch ein aufgelegtes Deckglas ergab sich ein Volumen von 0.1mm x 1mm² = 0.1mm³. Nach Gabe eines Tropfens der zu zählenden Zellsuspension in die Zählkammer konnte die Zellzahl anhand der 16 quadratischen Felder und mit Hilfe folgender Formel errechnet werden:

$$\text{Anzahl der Zellen in den 16 Feldern} \times 10^4$$

3.7.4. Ernte der Zellen (unsteril)

Nach dreimaligem Waschen der Zellen in PBS wurden diese mittels eines weichen Hartgummischabers abgelöst und nach Zugabe eines geringen Volumens PBS (die Zellen sollten eben bedeckt sein) zentrifugiert (5 min, 1300 rpm, RT). Nach Verwerfen des Überstandes wurden sie erneut in PBS aufgenommen, das Volumen ²/₃ zu ¹/₃ getrennt, sorgfältig abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets bei -80°C (RNA-Extraktion) weggefroren.

4. ERGEBNISSE

4.1. Analyse der genomischen Instabilität in hereditären Melanomen von Xiphophorus

4.1.1. Mikrosatelliteninstabilität

23 Tumoren unterschiedlicher Malignität wurden im Vergleich zum tumorfreien Normalgewebe desselben Fisches an 12 Genloci unbekannter chromosomaler Lokalisation auf Mikrosatelliteninstabilität untersucht.

Jedes Melanom wurde mit seinem entsprechenden Kontrollgewebe an 12 verschiedenen Genorten auf Instabilitäten untersucht; in Abhängigkeit von der Art der Läsion und Zustand des verwendeten Materials waren jedoch nicht alle Loci informativ (Tabelle 4.1).

Bei dieser Analyse konnte insgesamt eine Zahl von 263 informativen Loci erzielt werden, von denen sich nur 20 (= 7.6%) als instabil erwiesen. Mittels des ALFexpress DNA Analysis Systems erfolgte eine exakte Längenbestimmung in Basenpaaren der zu analysierenden DNA-Fragmente; dies war eine technisch verfeinerte Methode zur Darstellung von Polymorphismen als die vorher durchgeführten Auflösungen auf hochprozentigen Polyacrylamid-Gelen.

Tabelle 4.1: MIN-Frequenz aller untersuchten Tumoren mit Angabe der alterierten Mikrosatelliten

Genotyp	Malignität	Anzahl der betroffenen Genloci / Gesamtzahl analysierter Loci	Alterierte Mikrosatelliten-Loci
Mdl ^{Sd} – Xmrk a/+ (ped. 534)	++	1/12 (8.3 %)	Kon D29
Mdl ^{Sd} – Xmrk a/+ (ped. 534)	++	3/12 (25.0 %)	Kon D8, Kon T30, Sat 2
Mdl ^{Sd} – Xmrk a/+ (ped. 534)	++	2/12 (16.7 %)	Kon D15, Kon T30
Mdl ^{Sd} – Xmrk a/+ (ped. 534)	++	—	—
Mdl ^{Sd} – Xmrk a/+ (ped. 534)	++	—	—
Mdl ^{Sd} – Xmrk a/a (ped. 563)	+	1/10 (10 %)	Kon D10
Mdl ^{Sd} – Xmrk a/a (ped. 563)	+	—	—
Mdl ^{Li} – Xmrk a/a (ped. 917)	+++	1/12 (8.3 %)	Sat 2
Mdl ^{Li} – Xmrk a/a (ped. 917)	+++	3/12 (25.0 %)	Kon D8, Kon T30, Sat 1
Mdl ^{Li} – Xmrk a/a (ped. 917)	+++	—	—
relapse	+++	2/8 (25.0 %)	Kon D6, Kon D10
Mdl ^{Li} – Xmrk a/a (ped. 917)	+++	—	—
Mdl ^{Li} – Xmrk a/a (ped. 917)	+++	—	—
Mdl ^{Li} – Xmrk a/a (ped. 917)	+++	—	—
Mdl ^{Li} – Xmrk a/a (ped. 917)	+++	—	—
Mdl ^{Li} – Xmrk a/a (ped. 917)	+++	—	—
Mdl ^{Li} – Xmrk a/a (ped. 917)	+++	—	—
Dorsal red (ped. 1437)	+++	4/10 (40.0 %)	Kon D15, Kon D26, Kon T30, Sat 1
Mdl St -Mut – Xmrk (ped. 1345)	++++	2/8 (25.0 %)	Kon D10, Sat 2
Poecilia formosa BA (ped. 922)	+	1/12 (8.3 %)	Sat 2
Poecilia formosa BA (ped. 922)	+	—	—
Poecilia formosa BA (ped. 922)	+	—	—
Poecilia formosa BA (ped. 1064)	+	—	—

MSS-Tumoren sind durch ____ gekennzeichnet.

4.1.1.1. Analyse der Prävalenz der genomischen Instabilität pro Genlocus

Von 12 analysierten Genloci erwiesen sich neun als instabil (vgl. Tabelle 4.2). Die

Tabelle 4.2: Prävalenz der genomischen Instabilität, aufgelistet nach den einzelnen untersuchten Genloci

Genlocus	MIN+ - Prävalenz
Kon D21	0/23 (0 %)
Kon T38	0/23 (0 %)
Sat 7ab	0/19 (0 %)
Kon D6	1/23 (4.3 %)
Kon D26	1/21 (4.8 %)
Kon D29	1/23 (4.3 %)
Kon D8	2/22 (9.1 %)
Kon D15	2/22 (9.1 %)
Sat 1ab	2/19 (10.5 %)
Kon D10	3/23 (13.0 %)
Kon T30	4/22 (18.2 %)
Sat 2cd	4/22 (18.2 %)

Prävalenz der MIN+ variierte zwischen 4% (Kon D6, Kon D26, Kon D29) und 18% (Kon T30, Sat 2cd); dies bedeutete, daß das Verhältnis instabiler zu stabiler Tumoren pro analysiertem Genlocus zwischen 1 instabilen aus 23 untersuchten Tumoren bis zu 4 instabilen aus insgesamt 22 untersuchten Tumoren reichte.

Des Weiteren zeigten zwei der Genloci eine MIN+-Prävalenz von 9% (Kon D8, Kon D15), ein Locus zeigte 10% (Sat 1ab) und ein weiterer 13% (Kon D10). Drei Mikrosatelliten-Loci (Kon D21, Kon T38, Sat 7ab) zeigten sich über alle untersuchten Melanome hinweg Mikrosatelliten-stabil (MSS; microsatellite stable).

Die Analyse der einzelnen Genloci erbrachte in Hinblick auf das zu Grunde liegende Melanommodell den wichtigen Hinweis, daß eine Mikrosatelliten-Instabilität nicht als generelle Manifestation einer hohen

Mutationsrate, sondern, wenn überhaupt, fokal begrenzt vorliegt.

4.1.1.2. Analyse der Frequenz der genomischen Instabilität pro Melanom

Es stellte sich heraus, daß 10 von 23 (43.5%) untersuchten melanocytischen Läsionen in unterschiedlichem Ausmaß Mikrosatelliten-Instabilitäten aufwiesen (vgl. Tabelle 4.3).

Im Überblick variierte die Frequenz der MIN in den einzelnen Tumoren zwischen 8.3% und 40.0%.

Drei der oben erwähnten 10 MIN+-Tumoren waren jeweils an 1 von 12 (8.3%) untersuchten Loci instabil (*Mdl^{Sd}-Xmrk a/+* (534); *Mdl^{Li}- Xmrk a/a* (917); *Poecilia formosa 25, IV*), ein anderer Tumor erwies sich an 1 von 10 (10%) informativen Genloci als genetisch verändert (*Mdl^{Sd}- Xmrk a/a* (563)). Bei einem weiteren Tumor fanden sich Alterationen an 2 von 12 (16.7%) analysierten chromosomalen Loci (*Mdl^{Sd} - Xmrk a/+* (534)); vier Tumoren zeigten eine MIN+-Frequenz von 25% (*Mdl^{Sd} - Xmrk a/+* (534), *Mdl^{Li} - Xmrk a/a* (917)), allerdings erwiesen sich bei zweien dieser Tumoren vier Genloci als nicht informativ (*Mdl^{Li} - Xmrk a/a*; *Tu 2 (f)* (917); *Mdl^{Sr-Mut} - Xmrk*).

Die höchste MIN+-Rate wurde von einem Melanom mit 4 Instabilitäten aus 10 (40%) analysierten Loci gezeigt (h III/mac Dr^c/h III BC1 (1437)).

Tabelle 4.3: Frequenz der genetischen Alteration in den einzelnen Tumoren mit den betroffenen Genloci

Genotyp	Frequenz der MIN (Anzahl der betroffenen Genloci/ Gesamtzahl analysierter Loci)	MIN+ - Genlocus
<i>Mdl^{Sd} - Xmrk a/+</i> (534)	1/12 (8.3 %)	Kon D29
<i>Mdl^{Sd} - Xmrk a/+</i> (534)	3/12 (25.0 %)	Kon D8, Kon T30, Sat 2cd
<i>Mdl^{Sd} - Xmrk a/+</i> (534)	2/12 (16.7 %)	Kon D15, Kon T30
<i>Mdl^{Sd} - Xmrk a/a</i> (563)	1/10 (10 %)	Kon D10
<i>Mdl^{Li} - Xmrk a/a</i> (917)	1/12 (8.3 %)	Sat 2cd
<i>Mdl^{Li} - Xmrk a/a</i> (917)	3/12 (25.0 %)	Kon D8, Kon T30, Sat 1ab
<i>Mdl^{Li} - Xmrk a/a</i> ; <i>Tu 2 (f)</i> (917)	2/8 (25.0 %)	Kon D6, Kon D10
Dorsal red (1437)	4/10 (40.0 %)	Kon D15, Kon D26, Kon T30, Sat 1ab
<i>Mdl^{Sr-Mut} - Xmrk</i> (1345)	2/8 (25.0 %)	Kon D10, Sat 2cd
<i>Poecilia formosa 25, IV</i>	1/12 (8.3 %)	Sat 2cd

4.1.1.3. Einordnung der MIN nach dem „pattern“ der veränderten Allele

Von 263 analysierten Genloci erwiesen sich 20 (7.6%) als genetisch instabil. Sie konnten 4 verschiedenen Allel-Mustern von genomischer Instabilität zugeordnet werden. Eine dieser Kategorien war das in diesem Zusammenhang häufig beschriebene Phänomen LOH (Loss of Heterozygosity), das durch den totalen Verlust eines Allels durch z. B. Deletion, mitotische Rekombination etc. charakterisiert ist (Tabelle 4.4a).

Die verbleibenden drei Kategorien zeichneten sich im Gegensatz dazu durch ein oder mehrere „neue“, d.h. auf bp-Ebene veränderte Tumor-Allele (Baseninsertion oder -deletion) aus, die im Tumorgewebe entweder

1. neu zu den gesunden Allelen hinzugekommen waren (Tabelle 4.4b)
2. ebenfalls zusätzlich waren, dennoch quantitativen Einfluß auf die Gesamtkopienzahl der gesunden Allele genommen hatten (Tabelle 4.4c)
3. ein gesundes Allel verdrängten bzw. ersetzten (Tabelle 4.4d).

Tabelle 4.4a: Häufigkeit von LOH aus allen untersuchten MIN+-Tumoren

MS-Locus	Tumor	gefundene Allele (in bp) im	
		<i>Normalgewebe</i>	<i>Tumorgewebe</i>
Kon D8	Mdl ^{Sd} – Xmrk a/+ (534)	233bp, 258bp	233bp
Kon D8	Mdl ^{Li} – Xmrk a/a (917)	232bp, 257bp	232bp
Kon D26	X.h. III/ mac Dr ^o / h III BC ₁ (f)	346bp, 350bp	350bp
Kon D29	Mdl ^{Sd} – Xmrk a/+ (534)	285bp, 297bp, 304bp	297bp, 304bp

Nur die betroffenen Allele von Tumor- und Normalgewebe eines Fisches sind aufgeführt.

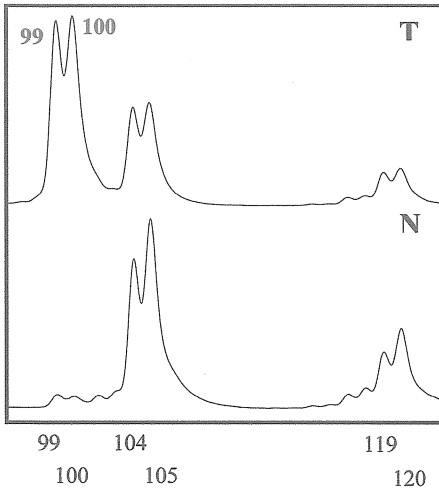


Abbildung 4.1:

Beispielhafte Demonstration eines MS-Locus (hier: Sat 2cd) mit genetischen Veränderungen. Das Individuum *P. formosa* 25/IV zeigte im Tumorgewebe zwei kürzere Allele (beide -5bp), die offensichtlich von den 104-/105bp-Allelen abstammten. Das originale Mikrosatelliten-Allel des Normalgewebes war noch zu erkennen. Diese Instabilität wurde der Kategorie "zusätzliche Allele im Tumorgewebe mit quantitativen Auswirkungen auf die korrespondierenden N-Allele" (s. Tabelle 4.4c) zugeordnet.

Tabelle 4.4b: Neues T-Allel im Tumor ohne quantitative Beeinflussung der korrespondierenden N-Allele

MS-Locus	Tumor	Allel/e (in bp) im		Art der Alteration im Tumor
		Normalgewebe	Tumorgewebe	
Kon D10	Mdl ^{Sr-Mut} – Xmrk	–, 282bp	280bp, 282bp	-1 repeat unit
Kon D15	Mdl ^{Sd} – Xmrk a/+ (534)	–, 324bp	238bp, 324bp	Deletion von 43 repeat units
Kon T30	Mdl ^{Sd} – Xmrk a/+ (534)	–, 177bp	153bp, 177bp	Deletion von 8 repeat units
Kon T30	Mdl ^{Sd} – Xmrk a/+ (534)	–, 153bp	123bp, 153bp	Deletion von 10 repeat units
Kon T30	Mdl ^{Li} – Xmrk a/a (917)	–, 154bp	153bp, 154bp	Deletion von 1bp
Sat 1ab	Mdl ^{Li} – Xmrk a/a (917)	–, 75bp	74bp, 75bp	Deletion von 1bp
Sat 1ab	Mdl ^{Sd} – Xmrk a/+ (534)	–, 75bp	74 bp, 75bp	Deletion von 1bp

Nur die betroffenen Allele von Tumor- und Normalgewebe eines Fisches sind aufgeführt.

Tabelle 4.4c: Neue/s oder fehlende/s T-Allel/e mit quantitativer Beeinflussung der korrespondierenden N-Allele

MS-Locus	Tumor	neue/s Allel/e (in bp) im	
		Normalgewebe	Tumorgewebe
Kon D10	Mdl ^{Sd} - Xmrk a/a (563)	—	288bp-Allel; Reduktion der Kopienanzahl des quantitativ in größter Anzahl vorliegenden Allels in N (286 bp)
Sat 2cd	Poecilia formosa 25/IV	104bp-, 105bp-Allele	99bp-, 100bp-Allele; die links genannten N-Allele sind in reduzierter Kopienanzahl vorhanden (vgl. <i>Abbildung 4.1</i>)

Nur die betroffenen Allele von Tumor- und Normalgewebe eines Fisches sind aufgeführt.

Tabelle 4.4d: Neue/s T-Allel/e mit Verlust des N-Allels

MS-Locus	Tumor	neues T-Allel mit (relativem) Verlust des N-Allels im Tumor		Art der Alteration im Tumor
		Normalgewebe	Tumorgewebe	
Kon D6	Mdl ^{Li} - Xmrk a/a; Tu 2 (f) (917)	237bp-Allel	238bp-Allel; 237bp-Allel fehlt	Insertion um 1bp
Kon D10	Mdl ^{Li} - Xmrk a/a; Tu 2 (f) (917)	287bp-Allel	289bp-Allel; 287bp-Allel fehlt	Insertion um 1 repeat unit
Kon D15	Dorsal red (1437)	256bp-Allel	272bp-Allel; 256bp-Allel fehlt	Insertion um 8 repeat units
Kon T30	h III/mac Dr ^c /h III BC ₁ (1437)	150bp-Allel	153bp-Allel; 150bp-Allel fehlt	Insertion um 1 repeat unit
Sat 2cd	Mdl ^{Sd} - Xmrk a/+ (534)	100bp-Allel: höchste Kopienanzahl	99bp-Allel; 100bp-Allel quantitativ reduziert	neuer Klon: -1bp
Sat 2cd	Mdl ^{Sd} - Xmrk a/a (917)	100bp-Allel: höchste Kopienanzahl	99bp-Allel; 100bp-Allel quantitativ reduziert	neuer Klon: -1bp
Sat 2cd	Mdl ^{Sr-Mut} - Xmrk	98bp-Allel: höchste Kopienanzahl	99bp-Allel; 98bp-Allel quantitativ deutlich reduziert	neuer Klon: +1bp

Nur die betroffenen Allele von Tumor- und Normalgewebe eines Fisches sind aufgeführt.

4.2. Analyse der genomischen Instabilität im Multilocus DNA-Fingerprint

8 Melanome und deren korrespondierende Normalgewebe wurden mit drei Sonden ((GT)₈, (GGAT)₄, (GATA)₈) hybridisiert (vgl. Tabelle 4.5a bis 4.5c). Nicht jede Hybridisierung war informativ, 12 von insgesamt 16 MLFP konnten ausgewertet werden.

Nur 1 von 8 Tumoren (8,3%) (*P. formosa* 25, 922; Fisch #2) zeigte eine genetische Instabilität in Form einer Differenz in seinem Bandenmuster zu dem des entsprechenden Kontrollgewebes. Es handelte sich um das Fehlen einer einzelnen Bande in der Hybridisierung mit (GT)₈, die als Manifestation einer den detektierten Locus beinhaltenden Deletion gesehen werden kann (Abbildung 4.2; Tabelle 4.5c). Weitere Hybridisierungen mit den Sonden (GGAT)₄ und (GATA)₄ ergaben bei demselben Tumor-/Normalgewebe-Paar identische Bandenmuster. Ebenso zeigte sich dieses Individuum in der MIN-Analyse als MSS (12/12).

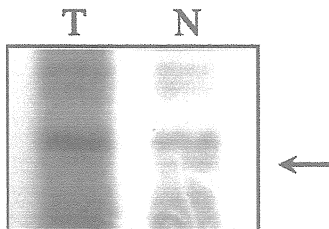


Abbildung 4.2:

Nur einer von 12 analysierbaren MLFPs zeigte eine genetische Aberration in Form einer Deletion einer einzelnen Bande im Tumorgewebe (s. Pfeil).

Individuum: *Poecilia formosa* 25, 922; Fisch 2;

Sonde: (GT)₈

Es zeigten sich bei einem weiteren Genotypen (*Mdr^{Sd}-Xmrk a/+* (534); Hybridisierung mit (GGAT)₄) mehrere Differenzen in dem Bandenmuster zwischen Tumor- und Normalgewebe; aufgrund ungleicher Mengen verwendeter DNA konnten sie jedoch nicht eindeutig einer genetischen Instabilität zugewiesen werden (vgl. Tabelle 4.5a; Abbildung 4.3). Dieser Tumor zeigte sich in der MIN-Analyse als MIN+ (3/12) (vgl. Tabelle 4.3).

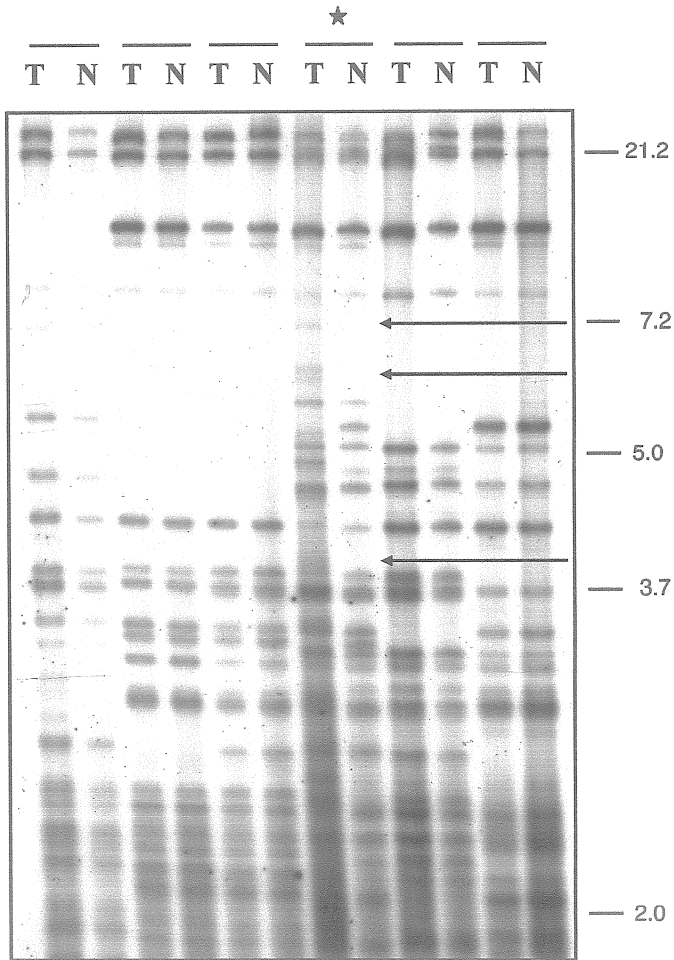


Abbildung 4.3: MLFP. Direkter Vergleich von Tumorgewebe (T) und Normalgewebe (N) durch radioaktive In-Gel-Hybridisierung mittels der Sonde (GGAT)₄. Bei den beiden mit einem ★ markierten Bahnen handelt es sich um die DNA des Individuums *Mdl^{Std}-Xmrk a/+* (534), die Pfeile deuten auf die oben beschriebenen Instabilitäten.

Von allen 8 im MLFP analysierten Tumoren erwies sich im Vergleich mit der MIN-Analyse neben dem letzten erwähnten Tumor nur ein weiteres Melanom als positiv (*Mdl^{Sd}-Xmrk a/+* (534); (MIN+ 1/12)), welches im MLFP allerdings als stabil zu werten war; die restlichen 6 hier untersuchten Tumore stellten sich einheitlich im MLFP wie auch in der Mikrosatelliten-Analyse als stabil dar.

Die Multilocus-Fingerprint-Untersuchungen bestätigten das in der Mikrosatelliten-Analyse erhaltene Resultat einer nicht signifikanten genomischen Instabilität im *Xiphophorus*-Melanom-Modell System.

Tabelle 4.5a: Hybridisierungen mit der Sonde (GGAT)₄ und deren Ergebnisse

Genotyp (DNA #)	Probe stabil	Probe instabil	Probe nicht-informativ
<i>Mdl^{Sd}-Xmrk a/+</i> (534)	+	—	—
<i>Mdl^{Sd}-Xmrk a/+</i> (534)	+	—	—
<i>Mdl^{Sd}-Xmrk a/+</i> (534)	—	(+)	—
<i>Mdl^{Sd}-Xmrk a/a</i> (563)	+	—	—
<i>Mdl^{Li}-Xmrk a/a</i> (917)	+	—	—
<i>Mdl^{Li}-Xmrk a/a</i> (917)	+	—	—
P. formosa 25, 922, Fisch 1	+	—	—
P. formosa 25, 922, Fisch 2	+	—	—

Tabelle 4.5b: Hybridisierungen mit der Sonde (GATA)₄ und deren Ergebnisse

Genotyp (DNA #)	Probe stabil	Probe instabil	Probe nicht-informativ
Mdl ^{Li} -Xmrk a/a (917)	+	—	—
Mdl ^{Sd} -Xmrk a/+ (534)	—	—	+
P. formosa 25, 922, Fisch 1	+	—	—
P. formosa 25, 922, Fisch 2	+	—	—

Tabelle 4.5c: Hybridisierungen mit der Sonde (GT)₈ und deren Ergebnisse

Genotyp (DNA #)	Probe stabil	Probe instabil	Probe nicht-informativ
Mdl ^{Li} -Xmrk a/a (917)	—	—	+
Mdl ^{Sd} -Xmrk a/+ (534)	—	—	+
P. formosa 25, 922, Fisch 1	+	—	—
P. formosa 25, 922, Fisch 2	—	+	—

4.3. Analyse der Expression von Zellzyklusinhibitoren und von einer Komponente des MMR-Systems

Die Analyse einiger, für einen kontrollierten Zellzyklus unerlässlicher Gene wurde mittels vergleichender Expressionsanalyse auf RNA-Ebene durchgeführt. Die Analysen beinhalteten maligne Melanome (MM) sowie das Lebergewebe der melanomtragenden Fische (Leber), benigne melanocytische Läsionen (BM), die PSM-Melanom-Zelllinie (PSM) und einige gepoolte Kontrollgewebe melanomfreier Fische.

Es wurde die Expression der beiden Zellzyklusinhibitoren p53 und pRB, des "Melanomgens" CDKN2X und des zum DNA-Reparatur-Komplex gehörigen Gens MSH2 mit folgenden Ergebnissen untersucht:

Die Gene *p53* und *MSH2* zeigten keinerlei Unterschiede hinsichtlich ihrer Expressionsstärke in malignen und benignen Melanomen sowie in Kontrollgeweben (vgl. Abbildung 4.4).

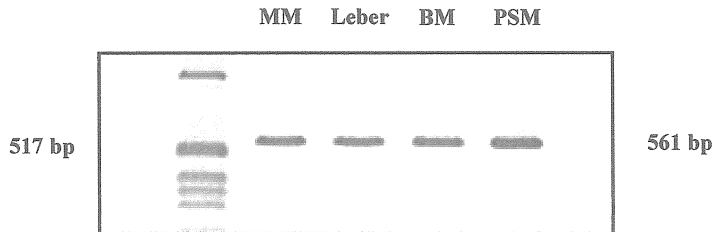


Abbildung 4.4: RT-PCR von p53 mit unauffälligem Expressionsmuster im Vergleich verschiedener Gewebeprobe. Alle untersuchten Gewebe zeigten keine Unterschiede in der Menge der exprimierten mRNA (Produktgröße 561 bp). Die Negativkontrolle der RT-PCR ist nicht dargestellt. *MM* = malignes Melanom; *Leber* = Lebergewebe des Fisches mit malignem Melanom (interne Kontrolle); *BM* = benigne melanocytische Läsion; *PSM* = Melanomzelllinie

Der Zellzyklusinhibitor *Rb* zeigte für die malignen Melanome wiederholt ein geringeres Expressionsniveau als für die benignen melanocytischen Läsionen und PSM-Zellen (vgl. Abbildung 4.5). In densitometrischen Vermessungen ergab sich eine um ca. 25% reduzierte Expression für die malignen Melanome (100% vs. 127% (benigne Läsionen) bzw. 123% (PSM-Zelllinie)). Die gleichermaßen reduzierte Expression der von den Melanomfischen stammenden Gewebe unterstrich die Signifikanz des Ergebnisses (Lebergewebe der tumortragenden Fische vs. Lebergewebe der tumorfreien Fische: 60% vs. 55%; nicht abgebildet).

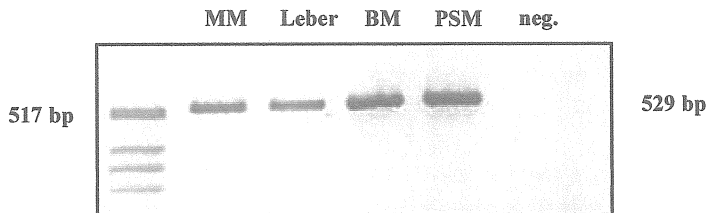


Abbildung 4.5: RT-PCR von RB mit deutlich unterschiedlicher Expressionsstärke der analysierten Gewebe. Maligne Melanome sowie das Lebergewebe der melanomtragenden Fische zeigten eine deutlich geringere Expression von RB-spezifischer mRNA (Produktgröße 529 bp) als die restlichen Gewebe. *MM = malignes Melanom; Leber = Lebergewebe des Fisches mit malignem Melanom (interne Kontrolle); BM = benigne melanocytische Läsion; PSM = Melanomzelllinie; neg. = Negativkontrolle*

Untersuchungen zur Genexpression von *CDKN2X* erbrachten das erwartete Resultat. *CDKN2X* zeigte sich in malignen Melanomen auf RNA-Ebene deutlich überexprimiert; den wichtigsten Referenzwert stellte die Expressionsstärke der benignen melanocytischen Läsionen dar (vgl. Abbildung 4.6). Konzentrationsbestimmungen mittels der oben genannten Methode zeigten eine um 35% gesteigerte (Über-)Expression für die malignen Melanome (100% vs. 65% (benigne Läsionen) bzw. 68% (PSM-Zelllinie)). Der Vergleich von internen Kontrollgeweben (Leber, Niere, Kiemen) ergab mit Ausnahme der Kiemen, deren Expression von *CDKN2X* physiologischerweise hoch ist, eine ähnliche, allerdings geringe Expression.

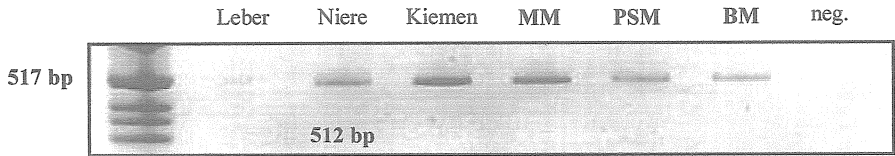


Abbildung 4.6: RT-PCR von CDKN2X mit deutlichen Unterschieden in der Expression der analysierten Gewebe. Das Kiemengewebe sowie die malignen Melanome zeigten gegenüber allen anderen Geweben eine deutlich erhöhte Expression von CDKN2X-spezifischer mRNA (Produktgröße 512 bp). *MM* = malignes Melanom; *Leber*, *Niere*, *Kiemen* = Kontrollgewebe von tumorfreien Segreganten; *BM* = benigne melanocytische Läsion; *PSM* = Melanomzelllinie; *neg.* = Negativkontrolle

Für alle genannten RT-PCRs diente als Referenz eine RT-PCR mit Aktin:

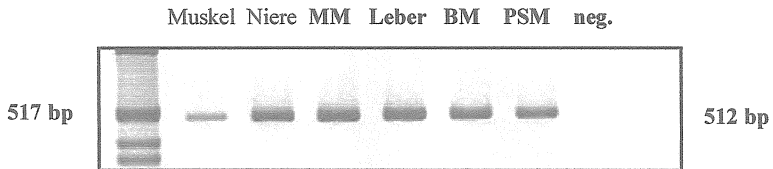


Abbildung 4.7: RT-PCR mit Aktin zur Referenz. *MM*, *Leber*, *BM* und *PSM* zeigen keine nennenswerten Expressionsunterschiede für Aktin (Produktgröße 512 bp). *MM* = malignes Melanom; *Leber*, *Niere* = Kontrollgewebe von tumorfreien Segreganten; *BM* = benigne melanocytische Läsion; *PSM* = Melanomzelllinie; *neg.* = Negativkontrolle

5. DISKUSSION

Das Innere einer Krebszelle gleicht einer Gallerie des Schreckens: Inaktivierte Gene, fehlende oder zusätzliche Chromosomen sowie eine Vielzahl anderer, kleiner und großer genetischer Abnormalitäten tummeln sich hier.

Viele Wissenschaftler sind sich einig, daß der Ursprung und auch der "Motor" der meisten Neoplasien in der Akkumulation mehrerer genetischer Veränderungen liegt; allerdings herrscht Uneinigkeit darüber, *wie* eine normale oder vielleicht schon dysplastische Zelle diese vielen Mutationen und chromosomalen Aberrationen erwirbt (Marx 2002 [64]).

Ein Ausdruck dieser genetischen Veränderungen ist der MIN-Status.

Die Analyse des MIN-Status von 23 Melanomen unterschiedlicher Malignität des *Xiphophorus* Melanom Modell Systems ergab insgesamt eine Prävalenz MIN+-Tumore von 7.6%. Eine Korrelation zwischen dem Genotypen des Fisches, der Aggressivität oder anderen pathophysiologischen Zügen der Melanome und den alterierten Mikrosatelliten ließ sich nicht feststellen. Ganz im Gegenteil wies der aggressivere Genotyp der untersuchten Melanome (*Li a/a*) eine geringere Rate an mutierten Mikrosatelliten als der weniger aggressive Genotyp (*Sd a/+*) auf. Im ersten Fall waren drei von zehn (30%) analysierten Melanomen MIN+ versus drei von fünf (60%) Tumoren im letzten.

Einige der Tumoren zeigten zusätzlich zu den zwei normalen Allelen des tumorfreien Kontrollgewebes neue Mikrosatelliten-Allele (7 von 20 Alterationen). Die Existenz dieser Allele könnte durch die Präsenz nicht-tumoröser Zellen im Tumorgewebe erklärt werden, z. B. Leukozyten, Lymphozyten, Bindegewebszellen etc. Eine alternative Erklärung wäre, daß jüngere klonale Zellverbände des Tumors die Mutation erworben haben und weiter vererben, während die älteren Anteile des Tumors diese Mutation nicht haben. Die letzte Erklärung steht in Einklang mit der Hypothese, daß - zumindest in kolorektalen Neoplasien - der Erwerb von MIN zu einem *späteren* Zeitpunkt in der Tumorgenese stattfindet und damit für die Tumorinitiation nicht ausschlaggebend ist (Haigis et al. [65]; Homfray et al. 1998 [66]).

Ebenso oft gab es den umgekehrten Fall: Mehrere Tumoren zeigten ein neues Mikrosatelliten-Allel, hatten dafür aber eines der ursprünglichen Wildtyp-Allele verloren.

Die einheitliche Präsenz eines mutierten WT-Allels in einem Tumor läßt u. a. folgende Interpretationen zu: 1. Die Mutation fand zu einem *frühen* Zeitpunkt in der Tumorgenese statt (vgl. auch Shih et al. 2001 [67]). Dieser Hypothese könnte eine gewisse Signifikanz von Mikrosatelliteninstabilitäten für die Tumorgenese zugesprochen werden. 2. Trotz eines späteren klonalen Ursprungs dieser Mutation hat der Klon durch rasches Wachstum und ein aggressiveres Potential den Rest des Tumors ersetzt.

Es ist natürlich denkbar, daß Mikrosatelliteninstabilitäten - aufgrund bisher unbekannter Impulse - in Tumoren variierend mal zu einem frühen Zeitpunkt, mal zu einem späteren oder auch im selben Malignom früh und spät auftreten können. Die Existenz von Tumoren mit spät erworbenen Mutationen wäre allerdings ein Hinweis darauf, daß der Erwerb von MIN keinen unabdingbaren Schritt in der Tumorgenese darstellt.

Interessanterweise zeigte auch das Tumorrezidiv eines Melanoms das Muster einer frühen Mutation. Im Gegensatz zu Primärtumor und tumorfreiem Kontrollgewebe, die beide das originale Allel demonstrierten, zeigte das Rezidiv ein mutiertes Allel mit einer Insertion von zwei Basenpaaren und einen vollständigen Verlust des Wildtyp-Allels. In einer Studie über Mikrosatelliteninstabilität in einem humanen primären Melanom und neun davon abgeleiteten Metastasen wurde in dem Primarius eine zu einem frühen Zeitpunkt einsetzende Abscheidung von genetisch heterogenen Tumorzellklonen entdeckt (Rubben et al. 2000 [68]). Analog zu diesem Fall könnte gefolgert werden, daß der Tumorzellklon, der für die Entwicklung des Rezidivs verantwortlich war, in kleinem Umfang bereits im Primärtumor existiert hatte. Aufgrund der Mutation war den klonalen Zellen ein aggressiveres Potential beschieden worden, welches ihnen u. a. eine geringe Migration ermöglicht haben könnte. Dadurch wurde die nachfolgende Exzision unvollständig und die verbliebenen Tumorzellen des besagten Klons konnten ungehindert proliferieren.

Die umfassende Interpretation der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten führt zu der Einsicht, daß der Erwerb des MIN+-Typs der genomischen Instabilität keinen entscheidenden Schritt in der Melanomgenese und -progression des analysierten Modellsystems darstellt.

Weiterhin läßt sich aus den Daten schließen, daß der Tumorrepressorlocus *R* keine Rolle in der Aufrechterhaltung der Integrität des Genoms von Pigmentzellen spielt, da die Elimination von *R* Voraussetzung für die Entwicklung spontaner maligner Melanome ist.

Die Analyse der Melanome, deren Initiation in unbekanntem spontanen, genetischen oder epigenetischen Ereignissen lag, zeigte ebenfalls, daß der Erwerb von Mikrosatelliteninstabilität kein wesentliches Charakteristikum der Tumorgenese darstellt.

Es ist allerdings erwiesen, daß die Mehrzahl der Fälle genomisch instabiler, solider Tumoren CIN, aber nicht MIN aufweist. Die experimentelle Fusion von CIN+- mit MIN+- Zellen führte zu CIN+, aber MSS Hybridzellen. Die dominanten Eigenschaften CIN+ Zellen können von MIN+ Zellen nicht kompensiert werden (wie vice versa) und lassen eher auf einen zusätzlichen Funktionserwerb (*gain of function*) eines exprimierten Proteins als auf Geninaktivierung als zugrunde liegenden Mechanismus schließen (Lengauer et al. 1998 [69]).

Es ist deshalb wichtig, in Zukunft den CIN-Status der analysierten Melanome zu untersuchen. Dieser Zweig der genomischen Instabilität stellt eine bisher noch unerforschte Option in der Melanomenese von *Xiphophorus* dar.

Die Kreuzungsexperimente, auf denen die Entwicklung spontaner maligner Melanome beruht, beinhalten die Kreuzung verschiedener Spezies. Bestimmte Hybridgenotypen zeigten nach Applikation von Karzinogenen (ultraviolettes Licht (UVB) und Methylnitrosourea (MNU)) eine erhöhte Anfälligkeit für die Entwicklung induzierter Tumoren (Kazianis et al. 2001 [70]; Setlow et al. 1989 [71]). Die Behandlung mit MNU induzierte die Entwicklung von Schwannomen, Fibrosarkomen und Retinoblastoma, UVB-Applikation führte zur Melanomenese. Dieser "Schwachpunkt" der Hybriden wurde zumindest teilweise auf ein defektes DNA-Reparatursystem zurückgeführt, und in weiteren Experimenten an Hybriden bestätigte sich eine reduzierte Aktivität für Basen- und Nukleotidexzisionen (BER und NER) als eines der DNA-Reparatursysteme.

Diese Daten wurden auch als weitere Untermauerung der Rolle der direkten DNA-Schädigung und defekter DNA-Reparatur in der Tumorentstehung in nativen *Xiphophorus*-Hybriden interpretiert (David et al. 2004 [72]).

Die offensichtliche Mikrosatelliten-**Stabilität** des Tumorzellgenoms dieser Fische weist allerdings darauf hin, daß der Defekt des oben genannten DNA-Reparatursystems nicht zur Melanomentstehung in diesen Hybriden beitragen kann.

Die eingangs erwähnte Diskussion, ob genomische Instabilität ein frühes, spätes bzw. überhaupt relevantes Ereignis in der Tumorgenese repräsentiert, findet sich auch in der Dermatologie. Diverse Studien über MIN in kutanen malignen Melanomen zeigten Instabilitäts-Frequenzen von weniger als 5% (Quinn et al. 1995) über 20-25% (Peris et al. 1995; Talwalkar et al. 1998) bis hin zu 32% (Hussein et al. 2001). Offensichtliche Korrelationen zwischen der MIN-Frequenz eines Melanoms und seiner Pathologie oder dem klinischen Verlauf des jeweiligen Patienten fehlten (Peris et al. 1995; Talwalkar et al. 1998). Ähnliche Studien an dysplastischen (atypischen) Nävi, die als Vorläuferläsion von malignen Melanomen diskutiert werden (Swerdlow et al. 1989 [73]), und benignen, herkömmlichen Nävi widersprachen sich dahingehend, daß MIN einerseits die molekulare Grenzlinie zwischen herkömmlichen und dysplastischen Nävi darstellen soll (Hussein et al. 2001), andererseits aber tatsächlich ein gemeinsames Merkmal der beiden Strukturen ist (Birindelli et al. 2000).

In der Zusammenschau dieser Studien sind Alterationen an Mikrosatelliten in variierender Frequenz den verschiedenen humanen melanocytären Läsionen gemeinsam. Dieses Resultat läßt sich insofern mit den Ergebnissen unserer Querschnittsstudie am *Xiphophorus* Melanom Modell System vereinbaren, als daß auch hier keine signifikante Korrelation zwischen den MIN-Typen und dem Malignitätsgrad bzw. Genotyp der Melanome gefunden wurde.

Ein anderer, die humane Melanomforschung deutlich erschwerender Faktor ist die diffizile Abgrenzung melanocytärer Läsionen voneinander, bzw. deren eindeutige und reproduzierbare Diagnostik.

Diverse Studien haben die klinische Beziehung zwischen der Anzahl erworbener benigner Nävi eines Individuums und der Wahrscheinlichkeit der späteren Entwicklung eines (kutanen) malignen Melanoms untersucht und eine positive Korrelation mit einem erhöhten relativen Risiko zwischen 3.2 (Bataille et al. 1996 [74]) und 19.6 (Grob et al. 1990 [75]) gefunden. Ähnliche Studien über die Beziehung zwischen dysplastischen Nävi und malignen Melanomen kamen zum gleichen Ergebnis. Die klinische Präsenz von vier oder mehr dysplastischen Nävi wurde gegenüber Kontrollpersonen mit einem um das

14.3-fach erhöhten Risiko assoziiert, ein malignes Melanom zu entwickeln (Bataille et al. 1996).

Diese Resultate stützen die Annahme einer sequentiellen Entwicklung melanocytärer Läsionen mit fließenden molekularen und histopathologischen Übergängen im Sinne des Modells *herkömmlicher Nävus - dysplastischer Nävus - malignes Melanom* (für Reviews siehe Kanzler et al. 2001 [76]; Hussein 2005 [77]).

Allerdings muß auf der anderen Seite die Zuverlässigkeit der diagnostischen Reproduzierbarkeit von dysplastischen Nävi und damit die Rolle der Nävi in der Melanomentstehung in Frage gestellt werden, seit klassische histopathologische Merkmale, die diesen Nävi vorbehalten waren, auch in anderen melanocytischen Läsionen und sogar Melanomen gefunden worden sind (Farmer et al. 1996; Roush et al. 1993 [78]; Klein et Barr 1990 [79]).

Das *Xiphophorus* Melanom Modell System ist aufgrund des genetisch kontrollierten Hintergrunds seiner melanocytären Läsionen über diese Unsicherheiten der humanen Melanomforschung erhaben. Dennoch läßt sich das Fehlen einer signifikanten Korrelation zwischen dem MIN+-Status (als eine Möglichkeit des molekularen Zugangs) und dem Genotyp eines Melanoms gut mit dem oben gezeichneten Bild vereinbaren, daß sichere molekulare Marker zur definitiven Charakterisierung und Identifizierung einer melanocytären Läsion Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten verbleiben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Abwesenheit eines MIN+-Phänotypen in den Melanomen von *Xiphophorus* darauf hinweist, daß der Erwerb von MIN weder ein notwendiges Kriterium für die Initiation eines Tumors noch für seine Progression darstellt.

Dieses Ergebnis bekräftigt jene Seite in der Diskussion über genomische Instabilität, die vertritt, daß MIN auch in höher entwickelten Vertebraten nicht notwendigerweise einen der unverzichtbaren Motoren in der Progression von Tumoren, oder hier speziell Melanomen, darstellt (Talwalkar et al. 1998; Cross et al. 2003 [80]; Massi et al. 2002 [81]; Palmieri et al. 2003 [82]).

Es ist naheliegend, der Untersuchung des Mikrosatellitenstatus von Tumoren eine Expressionsanalyse der in die *Mismatch Repair* involvierten Gene anzuschließen (Strand et al. 1993). Aufgrund unbekannter Gensequenzen war es nur möglich, die Expression eines dieser Gene, MSH2, zu untersuchen. MSH2 wurde in malignen Melanomen, benignen Läsionen, tumorfreien Kontrollgeweben und der *Xiphophorus*-Melanomzelllinie (PSM) auf gleichem Niveau exprimiert.

In einem größeren Bezug läßt sich das Fehlen eines quantitativen Defekts von MSH2 mit der geringgradigen Mikrosatelliteninstabilität (MSI-L) in den untersuchten Melanomen vereinbaren und unterstützt so weit die herrschende Meinung, daß genetische Aberrationen in MMR-Genen zur Ausprägung des "mutator phenotype" im Sinne der MSI-H führen.

Im Gegensatz zu aneuploiden CIN+-Tumoren, welche die große Mehrheit aller soliden Tumoren ausmachen, verbleibt der Chromosomensatz MIN+-Tumoren diploid (Cahill et al. 1999 [83]). Da diese beiden Formen der genomischen Instabilität selten in Tumoren koexistieren und wir den MIN-Phänotypen ausgeschlossen haben, wäre die Analyse des chromosomalen Status von *Xiphophorus*-Melanomen eine zunehmend interessante Möglichkeit als einer der Initiatoren der Tumorgenese.

Ein anderer Pfad der Tumorinitiation ist die direkte Schädigung bzw. der Verlust von Tumorsuppressorgenen bzw. die Transformation von Proto-Onkogenen zu Onkogenen. Es ist mittlerweile bekannt, daß in Melanomen von *Xiphophorus*-Hybriden das Proto-Onkogen *XEGFRb* durch nicht-homologe Rekombination sowie zwei Punktmutationen als *Xmrk*-Onkogen malignes Potential erworben hat. In Kombination mit dem homozygoten Verlust von *R* scheint *Xmrk* ein zur Melanominduktion ausreichendes Kriterium zu sein.

Um diese Hypothese weiterführend zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von drei Genen, die in der Regulation des Zellzyklus Schlüsselrollen spielen, auf RNA-Ebene untersucht: *rb*, *p53*, *cdkn2a*. Die folgenden Gewebe wurden in der Analyse miteinander verglichen: Maligne Melanome, benigne Läsionen, tumorfreie Kontrollgewebe und die *Xiphophorus*-Melanomzelllinie (PSM).

Die Expression von *p53* wies in den oben genannten Geweben keine Unterschiede auf. Die offensichtlich "normale" Expression eines Gens ist aber nicht ohne weiteres mit einem funktionierenden Genprodukt gleichzusetzen, Sequenzanalysen des Gens, Aminosäuresequenzanalysen des Proteins, Untersuchungen des Promoterstatus etc. müssen zur Bestätigung einer intakten Genfunktion durchgeführt werden.

Soweit ist dieses Resultat allerdings vereinbar mit Forschungsergebnissen von Nairns et al. Die Kartierung des *p53*-Locus von Rückkreuzungshybriden aus *X. hellerii* x *X. maculatus* *Jp 163A* ergab dessen Kopplung an einen nicht mit der Melanomgenese assoziierten Locus (Nairn et al. 1996 [84]). *p53* scheint demnach zumindest keine primäre Rolle in der Tumorevolution von *Xiphophorus* zuzukommen.

Weiterhin läßt sich aus den Daten schließen, daß *p53* im *Xiphophorus* Melanom Modell weder entscheidend zur Progression eines Melanoms von benignen zu malignen Stadien beiträgt noch der direkten transkriptionellen Kontrolle durch den Tumorsuppressorlocus *R* unterliegt.

Die Ergebnisse der humanen Melanomforschung zur Expression von *p53* in malignen Melanomen der Haut sind divergent. Einige Forschungsarbeiten beschreiben eine Überexpression des Gens bzw. Akkumulation seines Produkts in den genannten Läsionen (Staubano et al. 2001 [85]; Gwosdz et al. 2005 [86]), während andererseits eine eher selten gesehene Verstrickung direkter Mutationen des *p53*-Proteins in die Entwicklung humaner Melanome mit folgender Erklärung postuliert wird:

Überschneidungen von Leserastern eines wichtigen Tumorsuppressorgens, *INK4A/ARF*, führen zur Kodierung von zwei Tumorsuppressoren, dem in der Melanomgenese „berühmten“ $p16^{\text{INK4a}}$ sowie $p19\text{ARF}$. Letzterem wird in der Regulation der Aktivität von *p53* eine Rolle zugewiesen. Der häufig gesehene, teilweise zu einem frühen Zeitpunkt in der Melanomentwicklung auftretende Verlust des Tumorsuppressorgens *INK4a/ARF* soll den Bedarf einer Inaktivierung von *p53* z.B. durch Mutationen schmälern (Bardeesy et al. 2001 [87]).

Die vergleichende Expressionsanalyse des vermeintlichen „melanoma susceptibility gene“ im Melanom-Modell und der PSM-Zelllinie bestätigte die von Kazianis beschriebene Überexpression des Zellzyklusinhibitors in malignen Melanomen von *Xiphophorus*-Hybriden (Kazianis et al. 2000). Dieses zu entsprechenden Untersuchungen der humanen

Melanomforschung widersprüchliche Ergebnis wurde von Kazianis et al. als Konsequenz der Überexpression von *Xmrk-2* diskutiert. Erweiternd wurde hypothetisch vorgeschlagen, daß das *Xiphophorus*-Homolog zu *cdkn2a* der noch nicht genauer definierten *DIFF*-Locus des Modells sein könnte. Mit dieser Hypothese stellte sich Kazianis jedoch gegen die vorherrschende, empirisch aus den Kreuzungsschemata und resultierenden Phänotypen hervorgegangene Annahme, daß *DIFF* upstream von *Xmrk* liege und somit der *Tu*-Locus der transkriptionellen Kontrolle durch *DIFF* unterliegen müßte, und nicht vice versa.

Experimente, die zeigen, daß *cdkn2x* der regulatorischen Kontrolle von *Xmrk* untersteht und damit als *DIFF*-Locus auszuschließen ist, müssen zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Eine alternative Erklärung für die Überexpression von *cdkn2x* liefert die Beobachtung, daß in onkogenen Zellen eine anhaltende *ras*-Expression zur Induktion antiproliferativer Signale, wie z. B. der Hochregulation von p16^{INK4a} und p21CIP1, beitragen kann (Lloyd 1998 [88]). Die Ursachen für eine hohe Proliferationsrate in Anwesenheit von hochreguliertem p16^{INK4a} können vielfältiger Natur sein und sowohl in dem Tumorsuppressor als auch seinem Gen, upstream und / oder downstream von ihm liegen.

Eine der downstream-Wirkungen von aktiviertem p16^{INK4a} ist es, die Inaktivierung von pRb durch Zyklin-abhängige Kinasen (CDK4 und 6) zu verhindern. Eine erste Untersuchung des Expressionsmusters von pRb in *Xiphophorus*-Melanomen, benignen Läsionen und Kontrollgeweben zeigt eine verminderte Transkription dieses Gens in malignen Melanomen.

Eine mögliche Interpretation dieser Ergebnisse wäre es, einen Defekt in CDK4/6, *rb* oder pRb zu Grunde zu legen und die Hochregulation von p16^{INK4a} im Sinne einer negativen Rückkopplungsschleife als physiologische Konsequenz anzusehen. Allerdings wird diese Annahme der Vielfalt der Faktoren, die in einer Zelle zusammenwirken und die Entscheidung über Proliferation oder Zellarrest treffen, und ihren multiplen Interaktionen nicht gerecht.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bedeutung der genomischen Instabilität in humanen melanocytischen Läsionen ist Gegenstand vieler dermatologischer Studien und bis heute ungeklärt. Ist die Mikrosatelliteninstabilität bloße Begleiterscheinung der unkontrolliert proliferierenden Tumorzellen oder wird ihr ein pathogenetischer Mechanismus zuteil?

In Fischen der Gattung *Xiphophorus* können durch klassische Kreuzungsexperimente melanocytische Läsionen verschiedener Malignitätsgrade induziert werden. Diese Läsionen sind auf Grund ihres genetisch kontrollierten Hintergrundes eindeutig definiert und reproduzierbar - und damit im Vorteil gegenüber der unsicheren Klassifikation humaner Hautläsionen.

In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich der Frage nachgegangen, ob MIN+ ein obligates molekulares Ereignis für die Progression von Melanomen bis zum terminalen Stadium darstellt. Dieser Fragestellung wurde unter Verwendung PCR-basierter Mikrosatellitenanalysen sowie Multilocus DNA-Fingerprint Analysen nachgegangen.

23 Tumoren unterschiedlicher Malignität wurden im Vergleich zum tumorfreien Normalgewebe desselben Fisches an 12 Genloci unbekannter chromosomaler Lokalisation auf Mikrosatelliteninstabilität untersucht. Es wurde insgesamt eine Zahl von 263 informativen Loci erzielt, von denen sich nur 20 (= 7.6%) als instabil erwiesen.

Mittels der Multilocus-Fingerprint Analysen wurden 8 Melanome und deren korrespondierende Normalgewebe mit drei Sonden hybridisiert. Nur einer von 12 analysierbaren MLFPs zeigte eine genetische Aberration in Form einer Deletion einer einzelnen Bande im Tumorgewebe.

Mit diesem Ergebnis wurde das in der Mikrosatellitenanalyse erhaltene Resultat einer nicht signifikanten Mikrosatelliteninstabilität im *Xiphophorus*-Melanom-Modell System bestätigt. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Abwesenheit eines MIN+-Phänotypen in den Melanomen von *Xiphophorus* darauf hinweist, daß der Erwerb von MIN weder ein notwendiges Kriterium für die Initiation eines Tumors noch für seine Progression darstellt.

Ein anderer Pfad der Tumorentstehung ist die direkte Schädigung oder der Verlust von Tumorsuppressorgenen, von in *Mismatch Repair* involvierten Genen oder durch die Transformation von Proto-Onkogenen zu Onkogenen.

In dieser Arbeit wurde die Expression von drei Genen, die in der Regulation des Zellzyklus Schlüsselrollen spielen (*rb*, *p53*, *cdkn2a*), sowie einer Komponente des MMR-Systems (*MSH2*) auf RNA-Ebene untersucht. Ihre Expressionsstärke wurde in folgenden Geweben miteinander verglichen: Maligne Melanome, benigne Läsionen, tumorfreie Kontrollgewebe und die *Xiphophorus*-Melanomzelllinie (PSM).

MSH2 und *p53* wurden in allen untersuchten Geweben auf gleichem Niveau exprimiert.

Die vergleichende Expressionsanalyse des vermeintlichen "melanoma susceptibility gene" *cdkn2a* im Melanom-Modell und der PSM-Zelllinie bestätigte die bereits vorherbeschriebene Überexpression des Zellzyklusinhibitors in malignen Melanomen von *Xiphophorus*-Hybriden.

Die Untersuchung des Expressionsmusters von *Rb* in den oben genannten Geweben ergab eine verminderte Transkription dieses Gens in malignen Melanomen.

Eine mögliche Interpretation dieses Ergebnisses wäre, einen Defekt in *Rb* oder pRB zu Grunde zu legen und die Hochregulation von *cdkn2a* entsprechend einer negativen Rückkopplungsschleife als physiologische Konsequenz anzusehen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Pschyrembel 1998; **258**: 1612.
2. Kopnin BP. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry 2000*; **65**: 2-27. Review.
3. Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature 1993*; **365**: 274-6
4. Karran P. Microsatellite instability and DNA mismatch repair in human cancer. *Semin Cancer Biol. 1996*; **7**:15-24. Review.
5. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res. 1993*; **53**: 5853-5
6. Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen H, Jass JR, Green JS et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res. 1994*; **54**:1645-8
7. Lawes DA, SenGupta S, Boulos PB. The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. *Eur J Surg Oncol. 2003*; **29**:201-12. Review.
8. Jass JR, Walsh MD, Barker M, Simms LA, Young J, Leggett BA. Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing DNA microsatellite instability. *Eur J Cancer 2002*; **38**:858-66. Review.
9. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res. 1998*; **58**: 5248-57. Review.
10. Birindelli S, Tragni G, Bartoli C, Ranzani GN, Rilke F, Pierotti MA et al. Detection of microsatellite alterations in the spectrum of melanocytic nevi in patients with or without individual or family history of melanoma. *Int J Cancer 2000*; **86**: 255-61
11. Peris K, Keller G, Chimenti S, Amantea A, Kerl H, Hofler H. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in melanoma. *J Invest Dermatol 1995*; **105**: 625-628

12. Talwalkar VR, Scheiner M, Hedges LK, Butler MG, Schwartz HS. Microsatellite Instability in Malignant Melanoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1998; **104**: 111-114
13. Brueckl WM, Jung A, Wein A, Brabletz T, Guenther K, Nusko G et al. Microsatellite instability in colorectal adenomas: relevance and clinical importance. *Int J Colorectal Dis* 2000; **15**: 189-96. Review.
14. Quinn AG, Healy E, Rehman I, Sikkink S, Rees JL. Microsatellite instability in human non-melanoma and melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol* 1995; **104**: 309-12
15. Hussein MR, Sun M, Tuthill RJ, Roggero E, Monti JA, Sudilovsky EC et al. Comprehensive analysis of 112 melanocytic skin lesions demonstrates microsatellite instability in melanomas and dysplastic nevi, but not in benign nevi. *J Cutan Pathol* 2001; **28**: 343-350
16. Farmer ER, Goni R, Hanna MP. Discordance in the histopathologic diagnosis of melanoma and melanocytic nevi between expert pathologists. *Hum Pathol* 1996; **27**: 528-31
17. Kallmann KD. The platyfish, *Xiphophorus maculatus*. In: *Handbook of Genetics*. King RC (editor). New York and London: Plenum Press; 1975. pp. 81-132
18. Rosen D. Fishes form uplands and intermountain basins of Guatemala. Revisionary studies and comparative geography. *Bull Am Mus Natl Hist* 1979; **162**: 267-367
19. Meyer A, Morrissey JM, Schartl M. Recurrent origin of a sexually selected trait in *Xiphophorus* fishes inferred from a molecular phylogeny. *Nature* 1994; **368**: 539-42
20. Gordon M. The genetics of a viviparous top-minnow *Platypoecilus*; the inheritance of two kinds of melanophores. *Genetics* 1927; **12**: 253-83
21. Häussler G. Über Melanombildungen bei Bastarden von *Xiphophorus helleri* und *Platypoecilus maculatus* var. *rubra*. *Klin Wochenschr* 1928; **33**: 1561-62
22. Kosswig C. Über Kreuzungen zwischen den Teleostiern *Xiphophorus helleri* und *Platypoecilus maculatus*. *Indukt Abstammung-Vererbungsl* 1928; **47**: 150-158
23. Anders A, Petry H, Fleming C, Petry K, Brix P, Luke W et al. Increasing melanoma incidence: putatively explainable by retrotransposons. Experimental contributions of the xiphophorine Gordon-Kosswig melanoma system. *Pigment Cell Res.* 1994; **7**: 433-50
24. Gordon H, Gordon M. Maintenance of polymorphism by potentially injurious genes in eight natural populations of the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Genetics* 1957; **55**: 1-44

25. Vielkind U, Schlage W, Anders F. Melanogenesis in genetically determined pigment cell tumors of platyfish and platyfish-swordtail hybrids: correlation between tyrosinase activity and degree of malignancy. *Krebsforsch* 1977; **90**: 285-99
26. Anders F, Scharl M, Barnekow A, Anders A. Xiphophorus as an in vivo model for studies on normal and defective control of oncogenes. *Adv Cancer Res* 1984; **42**: 191-275. Review.
27. Ahuja MR, Anders F. A genetic concept of the origin of cancer, based in part upon studies of neoplasms in fishes. *Prog Exp Tumor Res* 1976; **20**: 380-97
28. Scharl M. A sex chromosomal restriction-fragment-length marker linked to melanoma-determining Tu loci in Xiphophorus. *Genetics* 1988; **119**: 679-85
29. Wittbrodt J, Adam D, Malitschek B, Mäueler W, Raulf F, Telling A et al. Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing Tu locus in Xiphophorus. *Nature* 1989; **341**: 415-21
30. Gomez A, Voff JN, Hornung U, Scharl M, Wellbrock C. Identification of a second egfr gene in Xiphophorus uncovers an expansion of the epidermal growth factor receptor family in fish. *Mol Biol Evol.* 2004; **21**: 266-75
31. Scharl M, Hornung U, Gutbrod H, Voff JN, Wittbrodt J. Melanoma loss-of-function mutants in Xiphophorus caused by Xmrk-oncogene deletion and gene disruption by a transposable element. *Genetics* 1999; **153**: 1385-94
32. Scharl M. Homology of melanoma-inducing loci in the genus Xiphophorus. *Genetics* 1990; **126**: 1083-91
33. Dimitrijevic N, Winkler C, Wellbrock C, Gomez A, Duschl J, Altschmied J et al. Activation of the Xmrk proto-oncogene of Xiphophorus by overexpression and mutational alterations. *Oncogene* 1998; **16**: 1681-90
34. Gomez A, Wellbrock C, Gutbrod H, Dimitrijevic N, Scharl M. Ligand-independent dimerization and activation of the oncogenic Xmrk receptor by two mutations in the extracellular domain. *J Biol Chem* 2001; **276**: 3333-40
35. Winnemöller D, Wellbrock C, Scharl M. Activating mutations in the extracellular domain of the melanoma inducing receptor Xmrk are tumorigenic in vivo. *Int J Cancer* 2005; **117**: 723-9
36. Strachan T and Read AP. *Human Molecular Genetics 2*. New York: John Wiley & Sons, 1999.

37. Tang KS, Guralnick BJ, Wang WK, Fersht AR, Itzhaki LS. Stability and folding of the tumour suppressor protein p16. *J Mol Biol* 1999; **285**: 1869-86
38. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Taytigan SV et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; **264**: 436-40
39. Kumar R, Smeds J, Lundh Rozell B, Hemminki K. Loss of heterozygosity at chromosome 9p21 (INK4-p14ARF locus): homozygous deletions and mutations in the p16 and p14ARF genes in sporadic primary melanomas. *Melanoma Res* 1999; **9**: 138-47
40. Newton Bishop JA, Bishop DT. The genetics of susceptibility to cutaneous melanoma. *Drugs Today (Barc)* 2005; **41**: 193-203. Review.
41. Puig S, Malvehy J, Badenas C, Ruiz A, Jimenez D, Cuellar F et al. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol*. 2005; **23**: 3043-51
42. Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Lin AH, Markl ID, Fountain JW. Virtually 100% of melanoma cell lines harbor alterations at the DNA level within CDKN2A, CDKN2B, or one of their downstream targets. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; **22**: 157-63. Review.
43. Krimpenfort P, Ouon KC, Mooi WJ, Loonstra A, Berns A. Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 2001; **413**: 83-6
44. Kazianis S, Gutbrod H, Nairn RS, McEntire BB, Della Coletta L, Walter RB et al. Localization of a CDKN2 gene in linkage group V of Xiphophorus fishes defines it as a candidate for the DIFF tumor suppressor. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; **22**: 210-20
45. Kazianis S, Coletta LD, Morizot DC, Johnston DA, Osterndorff EA, Nairn RS. Overexpression of a fish CDKN2 gene in a hereditary melanoma model. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 599-605
46. Korenjak M, Brehm A. E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. *Curr Opin Genet Dev* 2005; **15**: 520-27. Review.
47. Seville LL, Shah N, Westwell AD, Chan WC. Modulation of pRB/E2F functions in the regulation of cell cycle and in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; **5**: 159-70. Review.

48. Hatakeyama M, Weinberg RA. The role of RB in cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 1995; 1: 9-19. Review.
49. Weinberg RA. The molecular basis of carcinogenesis: understanding the cell cycle clock. *Cytokines Mol Ther* 1996; 2: 105-10. Review.
50. Melnick AM, Adelson K, Licht JD. The theoretical basis of transcriptional therapy of cancer: can it be put into practice? *J Clin Oncol* 2005; 23: 3957-70. Review.
51. *Trends Biochem Sci.* 1995 Oct; 20
52. Charames GS, Bapat B. Genomic instability and cancer. *Curr Mol Med* 2003; 3: 589-96. Review.
53. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 11-27. Review.
54. Schofield MJ, Hsieh P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol* 2003; 57:579-608. Review.
55. Whitehouse A, Meredith DM, Markham AF. DNA mismatch repair genes and their association with colorectal cancer (Review). *Int J Mol Med* 1998; 1: 469-74. Review.
56. Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulos PB. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. *Br J Cancer* 2005; 93: 472-7
57. Lamatsch DK, Nanda I, Epplen JT, Schmid M, Scharl M. Unusual triploid males in a microchromosome-carrying clone of the Amazon molly, *Poecilia formosa*. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 91: 148-56
58. Scharl A, Hornung U, Nanda I, Wacker R, Müller-Hermelink HK, Schlupp I et al. Susceptibility to the development of pigment cell tumors in a clone of the Amazon molly, *Poecilia formosa*, introduced through a microchromosome. *Cancer Res* 1997; 57: 2993-3000
60. Wakamatsu Y. Establishment of a cell line from platyfish-swordtail hybrid melanoma. *Cancer Res* 1981; 41: 679-80
61. Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 1976; 3: 2303-8
62. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-91
63. Thein SL, Lynch JR, Weatherall DJ, Wallace RB. Direct detection of haemoglobin E with synthetic oligonucleotides. *Lancet* 1986; 1: 93

64. Marx J. Debate surges over the origins of genomic defects in cancer. *Science* 2002; **297**: 544-46
65. Haigis KM, Caya JG, Reichelderfer M, Dove WF. Intestinal adenomas can develop with a stable karyotype and stable microsatellites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 8927-31
66. Homfray TF, Cottrell SE, Ilyas M, Rowan A, Talbot IC, Bodmer WF et al. Defects in mismatch repair occur after APC mutations in the pathogenesis of sporadic colorectal tumours. *Hum Mutat* 1998; **11**: 114-20
67. Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2001; **61**: 818-22
68. Rubben A, Babilas P, Baron JM, Hofheinz A, Neis M, Sels F et al. Analysis of tumor cell evolution in a melanoma: evidence of mutational and selective pressure for loss of p16ink4 and for microsatellite instability. *J Invest Dermatol* 2000; **114**: 14-20
69. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; **396**: 643-9. Review.
70. Kazianis S, Gimenez-Conti I, Setlow RB, Woodhead AD, Harshbarger JC, Trono D et al. MNU induction of neoplasia in a platyfish model. *Lab Invest* 2001; **81**: 1191-8
71. Setlow RB, Woodhead AD, Grist E. Animal model for ultraviolet radiation-induced melanoma: platyfish-swordtail hybrid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; **86**: 8922-6
72. David WM, Mitchell DL, Walter RB. DNA repair in hybrid fish of the genus *Xiphophorus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2004; **138**: 301-9. Review.
73. Swerdlow AJ, English J, MacKie RM, O'Doherty CJ, Hunter JA, Clark J et al. Melanocytic nevus counts and melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1989; **20**: 522-3
74. Bataille V, Bishop JA, Sasieni P, Swerdlow AJ, Pinney E, Griffiths K et al. Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. *Br J Cancer* 1996; **73**: 1605-11
75. Grob JJ, Gouvernet J, Aymar D, Mostaque A, Romano MH, Collet AM et al. Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma. *Cancer* 1990; **66**: 387-95
76. Kanzler MH, Mraz-Gernhard S. Primary cutaneous malignant melanoma and its precursor lesions: diagnostic and therapeutic overview. *J Am Acad Dermatol* 2001; **45**: 260-76. Review.

77. Hussein MR. Melanocytic dysplastic naevi occupy the middle ground between benign melanocytic naevi and cutaneous malignant melanomas: emerging clues. *J Clin Pathol* 2005; **58**: 453-6. Review.
78. Roush GC, Dubin N, Barnhill RL. Prediction of histologic melanocytic dysplasia from clinical observation. *J Am Acad Dermatol* 1993; **29**: 555-62
79. Klein LJ, Barr RJ. Histologic atypia in clinically benign nevi. A prospective study. *J Am Acad Dermatol* 1990; **22**: 275-82
80. Cross NA, Murray AK, Rennie IG, Ganesh A, Sisley K. Instability of microsatellites is an infrequent event in uveal melanoma. *Melanoma Res* 2003; **13**: 435-40
81. Massi D, Sardi I, Urso C, Franchi A, Borgognoni L, Salvadori A et al. Microsatellite analysis in cutaneous malignant melanoma. *Melanoma Res* 2002; **12**: 577-84
82. Palmieri G, Ascierio PA, Cossu A, Colombino M, Casula M, Botti G et al. Assessment of genetic instability in melanocytic skin lesions through microsatellite analysis of benign naevi, dysplastic naevi, and primary melanomas and their metastases. *Melanoma Res* 2004; **13**: 167-70
83. Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Science Millennium Issue* 1999; 57-60
84. Nairn RS, Coletta LD, McEntire BB, Walter RB, Morizot DC. Assignment of the TP53 orthologue to a new linkage group (LG XIV) in fish of the genus *Xiphophorus* (Teleostei: Poeciliidae). *Cancer Genet Cytogenet* 1996; **88**: 144-50
85. Staibano S, Lo Muzio L, Pannone G, Somma P, Farronato G, Franco R et al. P53 and hMSH2 expression in basal cell carcinomas and malignant melanomas from photoexposed areas of head and neck region. *Int J Oncol* 2001; **19**: 551-9
86. Gwosdz C, Scheckenbach K, Lieven O, Reifenberger J, Knopf A, Bier H et al. Comprehensive analysis of the p53 status in mucosal and cutaneous melanomas. *Int J Cancer* 2005; **118**: 577-82
87. Bardeesy N, Bastian BC, Hezel A, Pinkel D, DePinho RA, Chin L. Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 2144-53
88. Lloyd AC. Ras versus cyclin-dependent kinase inhibitors. *Curr Opin Genet Dev* 1998; **8**: 43-8. Review.

DANKE!

Zu allererst möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren großartige emotionale Unterstützung diese Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre, und speziell bei meinem Vater für lehrreiche Gespräche und viele aufmunternde Worte.

Meinem Doktorvater und Betreuer, Prof. Dr. Manfred Scharl, möchte ich für die über einen langen Zeitraum währende Betreuung dieser Arbeit und insbesondere für seine Anstöße, mich neuen Herausforderungen zu stellen, danken.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. German Ott möchte ich mich für die Übernahme des Amtes des Korreferenten bedanken.

Ebenso bedanke ich mich sehr herzlich bei Ute Hornung, die mich im Labor angeleitet hat und mir stets mit großer fachlicher Kompetenz und viel Geduld zur Seite stand.

Einen großen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit trägt auch Dr. Dunja Lamatsch, der ich für ihre aufbauenden Worte ebenso danken möchte wie für ihre tatkräftigen Einsätze, mir in letzter Minute aus der Patsche zu helfen, und ihre Freundschaft.

Auch Dr. Kathrin Lampert möchte ich für Ihre uneigennützigte Kenntnisvermittlung hinsichtlich raffinierter ALF-Methoden und für geteilte initiale Labor-Depressionen meinen Dank aussprechen.

Nicht zuletzt danke ich meinem Freund Dr. Sören Schramm für seinen wertvollen technischen Beistand und seine liebevolle Zuwendung, ohne welche diese Arbeit in ihrer Endphase wesentlich langsamer vorangeschritten wäre.

Das Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 639 "Molekulare und strukturelle Grundlagen der Tumorstabilität" gefördert.

Vielen Dank!!

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

- Name: Katrin Zunker
- Geburtsdatum: 24.03.1978
- Geburtsort: Bremen
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Eltern: Wilhelm und Madelaine Zunker, geb. Michels
- Geschwister: Anne Voß, geb. Zunker (*1975)
Eva Zunker (*1979)

SCHULISCHE AUSBILDUNG

- 1984 - 1986 Grundschule "Am Lutherpark", Duisburg
- 1986 - 1988 Adolf - Reichwein - Grundschule, Moers
- 1988 - 1997 Gymnasium in den Filder Benden, Moers
- 1997 Abitur
- 8/1994 - 1/1995 Teilnahme am Schüleraustausch mit der Juanita High School, Seattle, Washington, USA

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

- 1997 - 1999 Studium der Psychologie, Universität Konstanz
- 1999 - 2006 Studium der Medizin, Universität Würzburg
- 4/2001 Physikum
- 3/2003 Erstes Staatsexamen
- 4/2005 Zweites Staatsexamen
- 5/2006 Drittes Staatsexamen

DISSERTATION

- seit 10/2001 Titel: Untersuchungen zur Rolle der Mikrosatelliteninstabilität in hereditären Melanomen von *Xiphophorus* sowie zur Integrität von Elementen der Zellzykluskontrolle/DNA-Reparatur
Institut für Physiologische Chemie I der Universität Würzburg
Betreuer: Prof. Dr. M. Schartl
- 10/2001 - 10/2003 Doktoranden - Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs 639 "Molekulare und strukturelle Grundlagen der Tumorstabilität" der Universität Würzburg

Katrin Zunker

