

1. Einleitung

1.1 Genveränderungen als Ursache der Tumorentstehung

Krebs ist eine Erkrankung, die meist genetisch durch Mutationen von Genen bedingt ist (zusammengefaßt bei Bishop, 1987), daneben spielen jedoch auch epigenetische Effekte wie z. B. Änderungen des Methylierungsstatus bestimmter Gene eine Rolle. Bis es zur Entstehung eines malignen Tumors kommt, haben sich in der transformierten Zelle zahlreiche genetische Veränderungen angehäuft (Weinberg, 1989; Vogelstein & Kinzler, 1993). Diese ereignen sich in den meisten Fällen in somatischen Zellen. Beim Auftreten von Mutationen in den Keimzellen können diese aber auch an die Nachkommen weitergegeben werden, was zu einer erblichen Prädisposition für bestimmte Krebsarten führt (Ponder, 1990). Gene, die in Tumoren mutiert vorliegen, sind meist an der Proliferation und Differenzierung, aber auch an der Verankerung von Zellen im Zellverband beteiligt. Diese Gene werden je nach ihrer Funktionsweise als Onkogene oder Tumorsuppressorgene bezeichnet. Onkogene entstehen aus den wildtypischen, Protoonkogene genannten zellulären Genen durch Mutation. Dabei treten verschiedene Typen von Mutationen auf (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Beispiele für die Mutationstypen, die zur Entstehung eines Onkogens aus einem Protoonkogen führen

| Mutationstyp | Onkogen | Organismus | Tumor | Referenz |
|---------------|----------------------|------------|---------------------------------|------------------------|
| Insertion | <i>fgf-3 (int-2)</i> | Maus | Brusttumor | Morris et al., 1997 |
| Deletion | <i>myb</i> | Rind | T-Zell Lymphom | Shinagawa et al., 1997 |
| Punktmutation | <i>ras</i> | Mensch | Ovarialkarzinom | Varras et al., 1999 |
| Amplifikation | <i>myc</i> | Mensch | Kleinzell-Lungenkarzinom | Wong et al., 1986 |
| Inversion | <i>ret</i> | Mensch | Papilläres Schilddrüsenkarzinom | Pierotti et al., 1992 |
| Translokation | <i>abl</i> | Mensch | Chronische myeloische Leukämie | Konopka et al., 1984 |

Die Genprodukte der Protoonkogene sind meist in die Weiterleitung von Wachstumssignalen aus der Umgebung der Zelle in den Zellkern involviert. Dies erklärt, warum Mutationen in diesen Genen häufig zu verstärkter Proliferation der Zelle führen. Da bereits die Veränderung

eines Allels ausreicht, um einen Funktionsgewinn ("gain-of-function") zur Folge zu haben, was sich in einer gesteigerten Proliferation der Zelle äußert, wird die Wirkungsweise eines Onkogens als dominant bezeichnet. Demgegenüber stehen die Tumorsuppressorgene, die auch als rezessive Onkogene bezeichnet werden, da die Inaktivierung beider Allele zum Funktionsverlust ("loss-of-function") führt. Zu den Tumorsuppressorgenen zählen z. B. Gene, die für Inhibitoren von Faktoren kodieren, die den Zellzyklus vorantreiben (Kamb, 1995).

1.2 Chromosomale Rekombination

Für die Entstehung der überwiegenden Anzahl Tumor-verursachender Mutationen bedarf es der Rekombination zwischen Chromosomen. Meiotische Rekombination ist ein Vorgang, der der Neukombination von väterlichen und mütterlichen Allelen dient, der somit genetische Diversität schafft und die Wirkung der Selektion erlaubt. Rekombinationsvorgänge ermöglichen andererseits eine Reparatur bestimmter DNA Beschädigungen. Zudem gewährleistet Rekombination durch die dabei gebildeten Chiasmata die korrekte Segregation homologer Chromosomen in der Meiose. Gegenüber der meiotischen Rekombination findet mitotische Rekombination wesentlich seltener statt. Dennoch ist sie für die Entstehung zahlreicher somatischer Mutationen verantwortlich, die letztendlich zur Bildung nicht erblicher Tumoren führen kann. Die in der Meiose stattfindende homologe Rekombination erfolgt nach der Paarung der homologen Chromosomen und führt zum Austausch zwischen Allelen desselben Gens. Für die Erklärung des genauen Mechanismus existieren verschiedene Modelle, die entweder Doppel- oder Einzelstrangbrüche in den DNA-Molekülen voraussetzen (Holliday, 1964; Meselson & Radding, 1975; Szostak et al., 1983). Neben reziprokem Austausch zwischen den homologen Chromosomen kann der Rekombinationsvorgang auch zu Genkonversion führen, die aus der Reparatur der entstandenen Heteroduplex-DNA bzw. aus Reparatursynthese (Modell des Doppelstrangbruchs) resultiert.

Genkonversion ist ein möglicher Mechanismus, der die Konservierung der hohen Ähnlichkeit von Genkopien erklärt, die bei Eukaryoten häufig tandemartig hintereinander auf dem Chromosom angeordnet sind. Genkonversion wirkt dabei einer unabhängigen Diversifizierung einzelner Kopien innerhalb des Genclusters entgegen. Hinweise dafür finden sich z. B. bei den Immunglobulinen oder den Globinen des Menschen (Slightom et al., 1980; Baltimore, 1981). Genkonversion bewirkt jedoch nicht nur eine Homogenisierung verwandter Gene, sie kann auch zur Diversifizierung führen, wie für die Entstehung des Antikörperrepertoires bei Vögeln beschrieben wurde (McCormack et al., 1991). Die negativen Folgen werden an Genkonversionen zwischen funktionellen Genen und benachbarten Pseudogenen deutlich, wie bei verschiedenen humanen Erkrankungen wie z. B. der Congenitalen adrenalen Hyperplasie erkannt wurde (Amor et al., 1988).

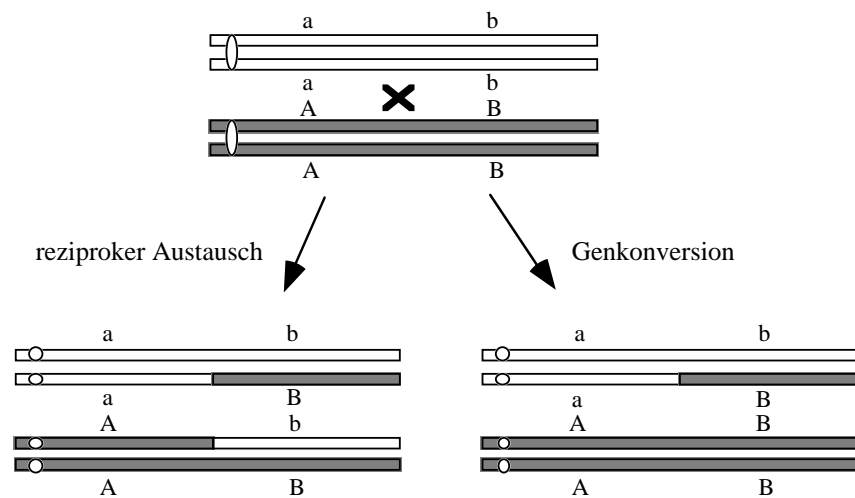


Abb. 1: Produkte aus der Rekombination zwischen zwei homologen Chromosomen. Jedes Chromosom ist aus zwei Schwesterchromatiden bestehend dargestellt, die in der zweiten Teilung der Meiose in verschiedene Keimzellen gelangen.

Orte von Rekombinationsereignissen während der Meiose sind nicht immer gleichmäßig über die Chromosomen verteilt. Dies wird an der bereits öfter beobachteten Diskrepanz zwischen physikalischer Distanz und des durch Rekombination ermittelten genetischen Abstands zwischen Markersequenzen deutlich. Zudem lassen sich bereits Unterschiede im genetischen Abstand zwischen den verschiedenen Geschlechtern beobachten, wobei die Rekombinationshäufigkeit in der weiblichen Meiose meist größer ist als in der des Männchens (Donis-Keller et al., 1987; Reeves et al., 1990). Einen Extremfall stellen *Drosophila* Männchen dar, bei denen keine meiotische Rekombination auftritt. Regionen mit unerwartet hoher Rekombinationsfrequenz werden als Rekombinations-"Hotspots" bezeichnet. Die Klonierung der gesamten Region des MHC ("major histocompatibility complex") der Maus und der Vergleich mit bekannten genetischen Rekombinationswerten führten zur Identifizierung von vier Hotspots (Steinmetz et al., 1986). Auch beim Menschen wurden solche Rekombinations-Hotspots im HLA, aber auch z. B. im Dystrophin-Gen, das bei der Duchenne-Muskeldystrophie mutiert ist, identifiziert (Grimm et al., 1989; van Endert et al, 1992). Über genetische Elemente, die für die vermehrte Rekombination in den Hotspot Regionen verantwortlich sein könnten, wird noch diskutiert. Verschiedene Elemente repetitiver Natur konnten als mögliche Kandidaten in den Hotspot Regionen identifiziert werden. Es scheinen jedoch für die Hotspot Aktivität mehrere zum Teil über größere Entfernungen wirkende Faktoren nötig zu sein (Shiroishi et al., 1990, 1991). Durch "branch migration" (Schenkelwanderung) kann der Ort der initialen Überkreuzung von DNA-Strängen in einiger Entfernung von deren Auflösung liegen. Dies kann die Identifizierung auslösender Faktoren ebenfalls erschweren.

1.3 Rekombination als Grundlage der Entstehung zahlreicher Mutationen

Neben homologer Rekombination gibt es auch nicht-homologe Rekombination, die zwischen ähnlichen Sequenzen erfolgen kann, wobei diese auf demselben oder auch auf einem anderen Chromosom liegen können. Diese spielt in der Evolution des Genoms eine bedeutende Rolle. Durch ungleiches Crossover können Gene vervielfacht werden (Genduplikation). Eine der beiden Kopien kann durch Mutationen verändert werden und letztendlich neue Funktionen ausüben. Dabei ist auch die Translokation neuer Genkopien auf andere Chromosomen von Bedeutung, da diese der bereits erwähnten Homogenisierung durch Genkonversion entgehen. Nicht-homologe Rekombination hat jedoch auch negative Auswirkungen, wenn sie zu Mutationen wie Deletionen, Inversionen oder Translokationen von Chromosomenabschnitten führt. Deletionen wurden in vielen Tumorarten auf bestimmten Chromosomen entdeckt. Durch Deletionskartierung konnten sogar eine Reihe von Tumorsuppressorgenen identifiziert werden. Dazu zählen z. B. das Retinoblastom (*Rb*)-Gen, das bei Fehlen einer funktionsfähigen Kopie zur Ausbildung von Tumoren der Retina führt (Dryja et al., 1986; Friend et al., 1986) sowie das *NF2*-Gen für Neurofibromatose vom Typ 2 (Watson et al., 1993). Translokation von Chromosomenfragmenten auf andere Chromosomen kann auf verschiedene Weise zur Tumorentstehung beitragen (Übersicht bei Rabbitts, 1994). Zum einen können ein Protoonkogen und ein zweites Gen, das häufig ein Gensegment für den T-Zellrezeptor oder ein Immunglobulinprotein darstellt, durch Translokation in unmittelbare Nachbarschaft gelangen. Dies hat die Aktivierung der Expression des zum Onkogen mutierten Gens zur Folge. Derartige Translokationen treten überwiegend in hämatopoetischen Tumoren auf und liegen in den während der T- bzw. B-Zellreifung stattfindenden Umordnungen des Gens für den T-Zellrezeptor bzw. die Immunglobuline begründet. Ein klassisches Beispiel stellt das Burkitt's Lymphom dar, in dem *c-myc* überwiegend mit einem Gensegment für die schwere Kette der Immunglobuline verknüpft wird (Chromosomen 8/14-Translokation). Ein anderer Typ einer onkogenen Translokation besteht darin, daß zwei Gene derart miteinander verbunden werden, daß daraus die Synthese eines Fusionsproteins resultiert. Als erstes Beispiel dafür wurde das Philadelphia Chromosom beschrieben, das in Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie auftritt. Durch die Translokation werden Teile der *c-abl* und *bcr*-Gene fusioniert, was zu einem veränderten Genprodukt mit verstärkter Tyrosinkinase Aktivität führt (Konopka et al., 1984). Nicht-homologe Rekombination aufgrund von Sequenzähnlichkeiten scheint umso häufiger zu erfolgen, je ausgedehnter die ähnlichen Bereiche sind. Dies wird an den Genen für Photorezeptorpigmente deutlich, die für das Farbsehen verantwortlich sind. Ungleiches Crossover verändert die Anzahl homologer roter und grüner Pigmentgene, die beim Menschen auf dem X-Chromosom gekoppelt vorkommen, und kann zu Rot-Grün Blindheit führen.

Hybridgene wiederum können durch ein verändertes Absorptionsspektrum des Proteinprodukts ein verändertes Farbempfinden zur Folge haben. (Nathans et al., 1986). So sollen z. B. etwa 5% aller männlichen Japaner durch eine mehr oder weniger ausgeprägte Form der Farbenblindheit betroffen sein (Deeb et al., 1995). Repetitiven Sequenzen, die in vielfacher Kopie über das Genom verteilt sind, wird ebenfalls eine nicht unbedeutende Rolle am Vorkommen ungleichen Crossovers zugeschrieben (diskutiert bei Pittman & Schimenti, 1998). Zu diesen Elementen zählen sowohl Mikrosatelliten, SINEs ("short interspersed nuclear element"), die nur etwa 100-500 bp lang sind, wie z. B. die Alu-Sequenzen bei Säugern, als auch längere Sequenzelemente wie LINEs ("long interspersed nuclear element"), die mehr als 6 kb umfassen können. Andererseits wird auch diskutiert, daß Insertionen solcher Elemente in Regionen duplizierter Gene die Rekombinationshäufigkeit zwischen diesen Kopien verringern kann, was eine unabhängige Diversifizierung dieser Gene ermöglicht (Hess et al., 1984).

1.4 Das *Xiphophorus* Melanom-System

Die Entstehung von Krebs ist häufig das Resultat mehrerer Mutationen in verschiedenen Genen einer somatischen Zelle. Diese führen zur Transformation der Zelle, die zu proliferieren beginnt. Weitere Veränderungen in den Abkömmlingen dieser Zelle lassen letztendlich eine maligne Wucherung entstehen. Dieser komplexe Prozeß der Tumorbildung ist jedoch meist nicht nachvollziehbar, da nur das Endstadium des Tumors einer Analyse zugänglich ist. So ist am Ende nicht zu entscheiden, welche Mutationen Auslöser und welche für das Fortschreiten des Tumors notwendig waren. Eine detaillierte Untersuchung der molekularen Vorgänge, die zur Zelltransformation führen, wird anhand von Tiermodellen möglich, bei denen das den Tumor induzierende Gen durch klassische Genetik definiert ist. Ein solches Modell stellt die Melanomentstehung bei *Xiphophorus* dar.

Die zur Familie der lebendgebärenden Zahnkarpfen (Poeciliidae) zählenden Fische der Gattung *Xiphophorus* sind in den Flüssen und Flußdeltas Zentralamerikas beheimatet (Kallman, 1975). Bislang konnten 22 Arten identifiziert werden (Rosen, 1979; Meyer et al., 1994), die jedoch untereinander kreuzbar sind und fertile Nachkommen hervorbringen. Einige Arten wurden schon in den 20er Jahren aufgrund auffälliger Pigmentierungsmuster als beliebte Aquarienfische gezüchtet. Genetiker beschrieben, daß Nachkommen aus bestimmten Kreuzungen zwischen dem *Platy*, *Xiphophorus maculatus*, mit einem Schwertträger, *Xiphophorus helleri*, eine Verstärkung der Pigmentierung bis hin zu bösartigen Wucherungen entwickelten (Gordon, 1927; Häussler, 1928; Kosswig, 1928). Diese als Melanome diagnostizierten Wucherungen gingen stets von den Pigmentflecken aus, die aus einem besonderen Zelltyp, den schwarz gefärbten Makromelanophoren, zusammengesetzt sind. Während Mikromelanophoren Melaninhaltige Pigmentzellen von normaler Zellgröße darstellen (\varnothing 30-100 μ m), die für die einheitlich

graue Körperfärbung der Fische verantwortlich sind, zeigen Makromelanophoren einige Besonderheiten. Sie fallen nicht nur durch ihre außergewöhnliche Größe auf (\varnothing 300-500 μm), sondern scheinen auch weniger einer Dichte-abhängigen Wachstumskontrolle zu unterliegen, was sich in einem In- und Übereinanderwachsen ihrer dendritischen Zellausläufer äußert (Anders et al., 1994). Makromelanophoren werden nicht von allen Xiphophorus Arten gebildet. Zudem kann das Auftreten dieses Zelltyps bei Stämmen mit Makromelanophorenmuster zwischen einem und mehr als 50% der Individuen liegen (Gordon & Gordon, 1957).

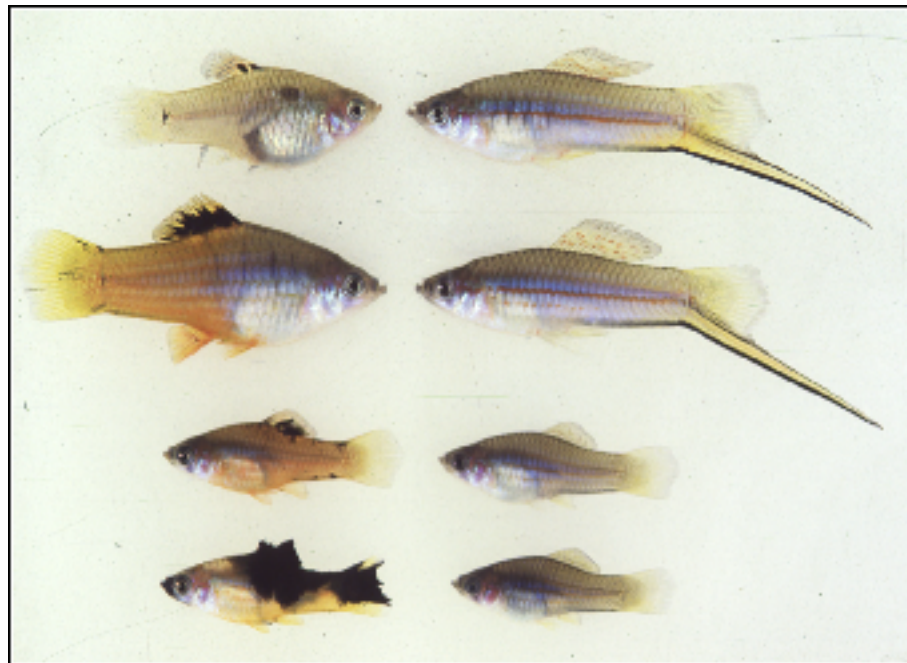


Abb. 2: Pigmentierungsphänotypen der Filial- und Rückkreuzungsgenerationen aus der Kreuzung zwischen *X. maculatus* (oben links) und *X. helleri* (oben/zweite Reihe rechts). Mitte links: F₁-Nachkomme, untere beiden Reihen: BC₁-Generation, 50% sind nicht pigmentiert und tumorfrei (rechts), 25% bilden ein benignes, 25% ein malignes Melanom (links).

In einem klassischen Kreuzungsexperiment werden ein *X. maculatus* Weibchen mit dem Makromelanophorenmuster *Sd* ("spotted dorsal") mit einem *X. helleri* Männchen gekreuzt, welches keine Makromelanophoren besitzt. Fische der resultierenden F₁-Generation zeigen ein verstärktes Pigmentmuster in der Rückenflosse. Nach Rückkreuzung der F₁-Hybride mit *X. helleri* kommt es zu einer Aufspaltung in 50% Fische, denen Makromelanophoren völlig fehlen, 25%, die ein verstärktes Pigmentmuster zeigen, das dem der F₁-Generation gleich und als benignes Melanom zu charakterisieren ist (Vielkind et al., 1977), und 25%, die ein malignes Melanom entwickeln, das invasiv in umliegendes Gewebe einwächst; zum Teil ist auch exophytisches Wachstum zu beobachten. Die histologische Untersuchung der Tumoren zeigt,

daß der Schweregrad des Tumors mit dem Differenzierungsgrad der Pigmentzellen korreliert. So besteht ein gutartiges Melanom überwiegend aus terminal differenzierten Melanophoren, wohingegen sich das maligne Melanom vor allem aus proliferierenden, wenig differenzierten Melanoblasten und Melanozyten zusammensetzt (Anders et al., 1984). Auf den Daten zahlreicher Kreuzungsexperimente basierend wurde ein Modell zur Erklärung der Tumorentstehung postuliert (Ahuja & Anders, 1976). Demzufolge ist ein auf dem Geschlechtschromosom von *X. maculatus* befindlicher Tumorlocus (*Tu*), der mit dem Locus für die Bildung von Makromelanophoren gleichgesetzt wurde, für die Melanomentstehung verantwortlich. Im WT wird die Expression von *Tu* durch einen unabhängig segregierenden Regulatorlocus (*R*) unterdrückt. Die kreuzungsbedingte Eliminierung des Repressors führt zur Deregulation von *Tu*. So kommt es zur Bildung von gutartigen Melanomen, wenn noch eine Kopie von *R* vorhanden ist. Bei Verlust beider Allele des Repressors entwickelt sich durch die unkontrollierte Aktivität von *Tu* ein malignes Melanom. Die Kreuzungsdaten lassen jedoch noch eine alternative Interpretation zu. Anstelle eines aus dem Platygenom stammenden Repressors könnten durch die Kreuzung "Intensifizier"-Faktoren aus dem Schwerträgergenom in die Hybriden eingeführt werden, die zu einer Gendosis-abhängigen Aktivierung der Expression von *Tu* führen.

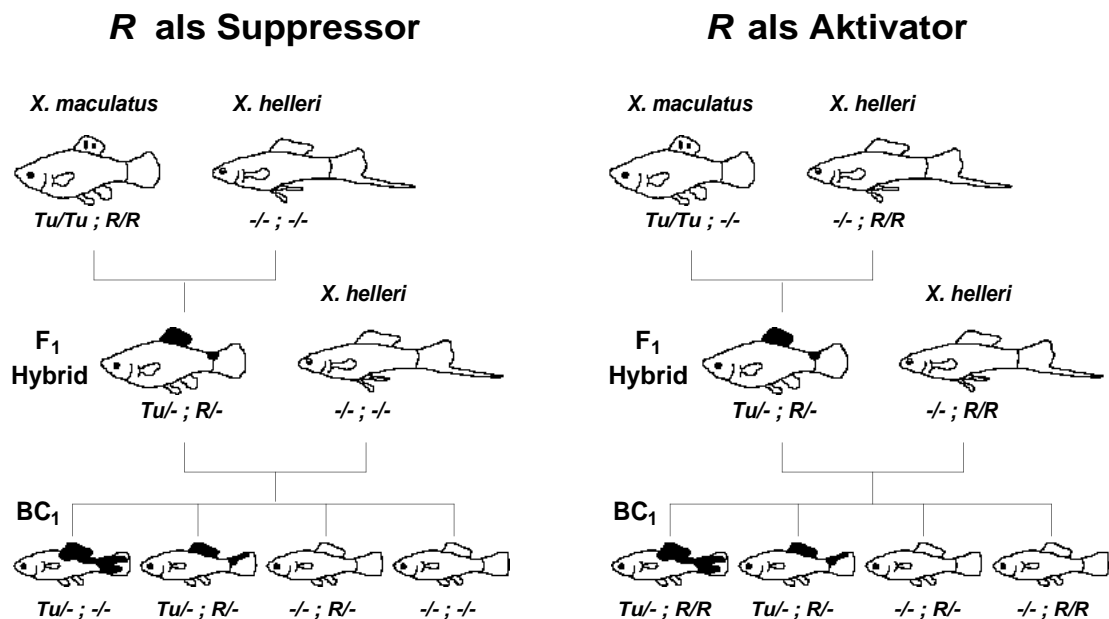


Abb. 3: Genetische Modelle zur Erklärung der aus der Kreuzung zwischen *X. maculatus* und *X. helleri* resultierenden Tumorphänotypen der Bastarde nach Rückkreuzung mit *X. helleri*. *Tu*: Tumorlocus, *R*: Regulatorlocus

Die für die Tumorentstehung verantwortliche Komponente des *Tu*-Locus konnte in einem "positional cloning" Ansatz isoliert werden (Schartl, 1988; Wittbrodt et al., 1989). Ein

Sequenzvergleich mit Gendatenbanken ergab, daß es sich um ein bislang in keiner weiteren Gattung beschriebenes neues Mitglied der Familie der Rezeptortyrosinkinasen vom Typ I (Ullrich & Schlessinger, 1990) handelte, das große Ähnlichkeit mit dem humanen EGF-Rezeptorgen aufwies. Das Gen wurde *Xmrk* für Xiphophorus Melanom Rezeptor Kinase benannt. Der Beweis, daß *Xmrk* das Tumor auslösende Gen des *Tu*-Locus darstellt, konnte anhand einer "loss of function" Mutanten erbracht werden. In Nachkommen dieser Mutante und *X. helleri* konnte in keinem Fall ein Melanom entdeckt werden. Die Ursache dafür liegt in einer 7 kb große Insertion in *Xmrk*, die die Bildung eines funktionellen Rezeptors verhindert (Wittbrodt et al., 1989). Neben einer onkogenen Kopie von *Xmrk*, die *ONC-Xmrk* genannt wurde, konnte eine weitere Genkopie detektiert werden, die unabhängig von der Präsenz des *Tu*-Locus in allen untersuchten Fischen dieser Familie (Poeciliidae) zu finden ist (Schartl, 1990). Diese protoonkogene Kopie wurde *INV-Xmrk* für "invariant" genannt. Die Untersuchung der Expression der beiden Gene brachte Hinweise auf den Mechanismus der Onkogenaktivierung. Das Protoonkogen liegt in hoher Konzentration als maternale mRNA in unbefruchteten Oozyten vor und wird zudem während der Organogenese differentiell exprimiert, was auf eine Funktion des Gens bei der Embryonalentwicklung schließen läßt (Raulf, 1991). Außerdem ist eine niedrige Expression in adulten Geweben zu beobachten (Dimitrijevic et al., 1998). Dagegen ist das Transkript des Onkogens vor allem in Melanomen nachweisbar (Adam et al., 1991; Mäueler et al., 1993), in anderen Geweben ist nur eine schwache Expression festzustellen (Schartl et al., 1999). Die positive Korrelation zwischen der Malignität der Tumoren in den Rückkreuzungsbastarden und der mRNA-Konzentration läßt auf eine Aktivierung des Onkogens durch Überexpression schließen. Mittlerweile konnte ein regulatorisches Element in der Promotorregion des Onkogens identifiziert werden, das in der Lage ist, die Transkriptionsaktivität des Onkogens auf eine allerdings nicht Pigmentzell-spezifische Weise zu stimulieren. Als mit diesem Element interagierende Transaktivatoren konnten Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie, insbesondere Sp1 und Sp3, identifiziert werden (Baudler et al., 1997). Für eine Überexpression als primäre Ursache der Tumorinduktion sprechen auch die Ergebnisse von Experimenten an Embryonen des Medaka (*Oryzias latipes*). Nach Transfer des *Xmrk* Onkogens unter der Kontrolle eines starken konstitutiven Promotors in frühe Embryonen führte die ektopische Expression von *Xmrk* nach kurzer Latenzzeit zu signifikanter Bildung gewebespezifischer Tumoren (Winkler et al., 1994). Inwieweit aktivierende Mutationen im Onkogen zu dessen Tumor-induzierendem Potential beitragen, konnte bislang noch nicht endgültig geklärt werden. Jedoch können durch Überexpression von *INV-Xmrk* wesentlich weniger häufig Tumoren in Medaka Embryonen induziert werden, wie das mit *ONC-Xmrk* bei Verwendung desselben starken Promotors der Fall ist (Winkler et al., 1994). Das zu beobachtende basale Niveau an Autophosphorylierung nach Transfektion des Onkogens in Säugerzellen weist auf eine solche Mutation in der extrazellulären Domäne des Rezeptors hin (Wittbrodt et al., 1992). Aminosäureaustausche in

dieser Region des Onkogens im Vergleich zum Protoonkogen wurden inzwischen identifiziert (Dimitrijevic et al., 1998) und müssen auf ein aktivierendes Potential in Transfektions-experimenten getestet werden.

Eine Untersuchung der genomischen Organisation beider Gene zeigte eine Sequenzhomologie im Bereich der kodierenden Region von etwa 99% (Adam et al., 1991; Dimitrijevic et al., 1998). Allerdings endet diese Homologie abrupt oberhalb des Transkriptionsstartpunktes des Onkogens (Adam et al., 1993). Southern Analysen identifizierten einen Genlocus, der die gleiche Sequenz wie die 5'-Region des Onkogens enthält. Dieser neue Locus wurde *D-Locus* (für "Donor") genannt (Adam et al., 1993). Aus diesem Befund ließ sich ein Modell ableiten, das die Entstehung des *Xmrk* Onkogens durch ein nicht-homologes Rekombinationsereignis zwischen dem Protoonkogen und dem *D-Locus* annimmt, bei dem das entstandene Onkogen unter die Kontrolle eines fremden Promotors gelangte (siehe Abb. 2). Dies erklärt die unterschiedlichen Expressionsmuster der beiden *Xmrk* Genversionen. Durch Klonierung der chromosomalen Bruchpunkte konnte inzwischen die Richtigkeit des Modells bestätigt werden (Adam et al., 1993). Der Sequenzvergleich zwischen den geschlechtschromosomalen Onkogenallen X-ONC und Y-ONC und dem Protoonkogen INV-*Xmrk* läßt darauf schließen, daß Y-ONC durch Duplikation des Protoonkogens entstand. Aus diesem ging später das X-chromosomale Allel durch geschlechtschromosomales "Crossing over" hervor.

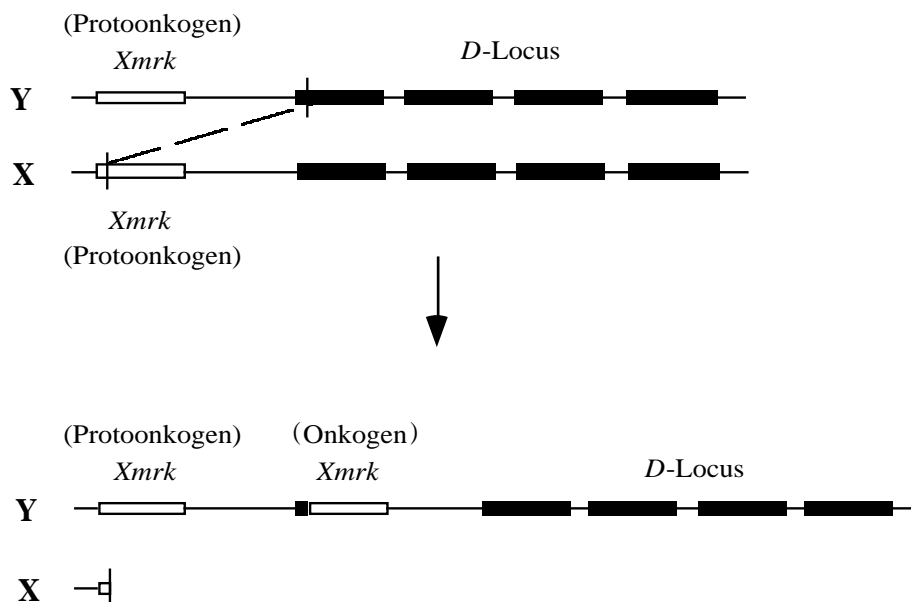


Abb. 4: Modell zur Evolution des *Xmrk* Onkogens. Erläuterungen siehe Text

Analysen des D-Locus ergaben, daß dieser im Genom von *Xiphophorus* amplifiziert vorliegt, wobei die geschätzten 20-30 Kopien als Cluster auf einem Chromosom liegen (Förnzer et al., 1996; Nanda et al., 1996). Der D-Locus tritt unabhängig von der Präsenz des *Xmrk* Onkogens auf und konnte in allen bislang untersuchten *Xiphophorus* Arten nachgewiesen werden. Die Untersuchung der genomischen Organisation einer repetitiven Einheit dieses Locus ließ neben dem Gen, das den Promotor des Onkogens bereitstellt und eine Integrase kodiert, ein Gen für ein Zinkfingerprotein vom Krüppeltyp (Förnzer et al., 1996) und bislang weitere sechs offene Leseraster (ORF) identifizieren (M. Scharl, unveröffentlicht). Homologe Sequenzen zu diesen ORFs sind mit zum Teil konservierter Anordnung auch bei *Tetraodon nigroviridis* (Süßwasser-Fugu) zu finden. Ein Vergleich der Expressionsmuster des Integrasegens und des *Xmrk* Onkogens ergab unerwarteterweise keine Übereinstimmung. Das Integrasetranskript ist in Leber und Hoden, nicht jedoch im Melanom nachzuweisen. Eine mögliche Erklärung liegt in zusätzlichen regulatorischen Elementen, die 3' des Promotors im Onkogen zu suchen wären. Diese könnten für die Pigmentzell-spezifische Expression verantwortlich sein. Es könnten jedoch auch 5' gelegene weitere Promotorelemente beteiligt sein, die im D-Locus fehlen. Dies ist nicht unwahrscheinlich, da die Homologie zwischen dem Onkogen-Promotor und dem D-Locus ca. 1,3 kb (X-Allel) 5' des ersten Bruchpunktes erneut endet. In dieser aufwärts gelegenen Region konnten verschiedene im Genom repetitiv vorliegende Sequenzelemente identifiziert werden (J.-N. Volff, persönliche Mitteilung). Neben drei unabhängigen Retrotransposons ohne "long terminal repeats" (LTR) konnten zwei Versionen von XIR Elementen detektiert werden, die sich von Retrotransposons vom LTR-Typ ableiten und erstmals von Anders et al. (1994) beschrieben wurden. Diese XIR Cluster enthalten interessanterweise Bindungsmotive für den Pigmentzell-spezifischen Transkriptionsfaktor *Microphthalmia*.

Neben den beiden *Xmrk* Genen sind weitere zu *ONC-Xmrk* eng gekoppelte Gene als Komponenten der Geschlechtschromosomen bekannt. Dazu zählt auch der das Geschlecht bestimmende Locus *SD*. Untersuchungen zur Geschlechtsentwicklung bei *Xiphophorus* hatten ergeben, daß vermutlich ein das männliche Geschlecht induzierendes Gen auf allen Geschlechtschromosomen vorhanden ist (X, Y, W), jedoch nur das auf dem Y-Chromosom keiner Suppression durch autosomale Faktoren unterliegt. Bei Vorliegen von WY, wie es z. B. bei Weibchen des *X. maculatus* Stammes aus dem Rio Usumacinta der Fall ist, scheint ein Repressor auf dem W-Chromosom die Aktivität des Y-chromosomalen Geschlechts-determinators zu unterdrücken. Das mit *P* (für "pituitary", Hypophyse) bezeichnete Gen, das den Zeitpunkt des Eintretens der sexuellen Reifung bestimmt, ist ebenfalls Teil dieser Chromosomenregion. Ein weiterer Locus dieser Region wurde *RY* (für "red-yellow pattern") genannt und bestimmt die verschiedenen Farbmuster, die aus Pigmentzellen der Xanthophoren- bzw. Erythrophorenzelle zusammengesetzt sind.

Während mit der Klonierung des *Xmrk* Onkogens viele Erkenntnisse über den Tumorlocus *Tu* gewonnen wurden, ist über die Natur des Genprodukts, das von dem regulatorischen Locus *R* kodiert wird, bislang nichts bekannt. Von Vielkind wurde postuliert, daß *R* die Differenzierung der Makromelanophoren-Zelllinie kontrolliert (Vielkind, 1976). Zum damaligen Zeitpunkt ging man jedoch davon aus, daß der Locus, der die genetische Information für die Bildung von Makromelanophoren enthält, mit dem Tumorlocus *Tu* identisch sei. Mittlerweile konnte gezeigt werden, daß der Makromelanophorenlocus (*Mdl*) und das Tumorgen *Xmrk* separate, jedoch sehr eng gekoppelte Gene auf den Geschlechtschromosomen darstellen (Weis & Scharl, 1998). Von *Mdl* sind in der *Xiphophorus* Population mehrere Allele bekannt (Gordon, 1948), und nach Kreuzung können aus den verschiedenen Pigmentmustern ganz unterschiedliche Tumoren im Hinblick auf die Lokalisation und Malignität hervorgehen. *R*, das in der Literatur auch mit *Mel Sev* (Morizot & Siciliano, 1983) bzw. *Diff* (Vielkind, 1976; Ahuja et al., 1980) bezeichnet wird, konnte in Kopplungsanalysen anhand von Isoenzymmarkern der Kopplungsgruppe V von *Xiphophorus* zugeordnet werden (Siciliano et al., 1976; Ahuja et al., 1980). Zu dieser zählen außerdem die Genloci für Esterase1 (*ESI*) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GLYDH*) (Morizot et al., 1991), für eine Malatdehydrogenase (*MDH2*) (Morizot & Siciliano, 1983) und eine Glutamatoxalacetat-Transaminase (*GOT1*) (Kazianis et al., 1996). Ein ebenfalls dieser Kopplungsgruppe zugeordneter und mit *ES4* benannter Isoenzymlocus konnte als eine in der Leber exprimierte Form von *ESI* identifiziert werden (Förnztler et al., 1991). Die Reihenfolge dieser Isoenzymloci auf dem Chromosom ist *ESI* - *GLYDH* - *MDH2* - *GOT1* (Morizot et al., 1998). Eine Einordnung von *R* in diese Genkarte war bislang nicht möglich, da zum einen die beschriebenen Rekombinationsfrequenzen zu *ESI* stark variierten (10%, Ahuja et al., 1980; 36%, Morizot & Siciliano, 1983), zum anderen keine lineare Drei-Punkt-Kopplung festgestellt werden konnte. Eine von D. Förnztler durchgeführte Analyse an 250 Rückkreuzungsbastarden, der eine detaillierte Charakterisierung oftmals schwer zu unterscheidender Esterase-Isoenzyme vorausging, hatte eine Rekombinationshäufigkeit zwischen *R* und *ESI* von 30% ergeben (Förnztler, 1994).

1.5 Zielsetzung

Ein umfassendes Verständnis der Tumorentstehung bei *Xiphophorus* ist erst nach Identifizierung aller Faktoren möglich, die für die Überexpression des Tumor-auslösenden *Xmrk* Onkogens in den Rückkreuzungshybriden verantwortlich sind. An der Regulation der Onkogenexpression ist nach der bestehenden Hypothese der Tumorregulatorlocus *R* beteiligt, der durch klassische Kreuzungsgenetik definiert wurde. Dessen regulatorische Funktion kann sowohl durch direkte Interaktion mit dem Onkogen im Sinne eines Transkriptionssuppressors erfolgen, es wären aber auch indirekte Mechanismen denkbar, die der Teilnahme weiterer

Faktoren bedürften. Ein Ziel dieser Arbeit war, diesen Genlocus näher zu kartieren, um eine Positionsklonierung ausgehend von einem molekularen Marker zu ermöglichen. Dazu sollte die in der Diplomarbeit begonnene Strategie zur Identifizierung molekularer Marker fortgesetzt werden. In dieser konnten mit der Methode der AP-PCR unter 69 informativen Markersequenzen drei mit *ESI* kosegregierende Marker detektiert werden. Zwei weitere, von S. Kazianis aus *Xiphophorus variatus* isolierte und zur Verfügung gestellte AP-PCR Marker (Kazianis, 1995) konnten ebenfalls in die Genkarte um *ESI* eingefügt werden. Keiner dieser Marker wies jedoch eine Kopplung zu *R* auf. Für die Isolierung eines eng mit *R* gekoppelten Markers sollte neben der Methode der AP-PCR die relativ neue Technik der AFLP-Analyse (Vos et al., 1995) zur Anwendung kommen. Da die in die Kreuzung eingesetzten Arten *X. maculatus* mit dem *Mdl*-Allel *Sd* und *X. helleri* in Bezug auf die Enzyme GLYDH, MDH2 und GOT1 nicht polymorph waren (Förnzler, 1994; S. Kazianis, pers. Mitteilung), konnten sie nicht in die Kartierung dieser Region einbezogen werden. Die in bisherigen Untersuchungen festgestellte Nicht-Linearität der Abstände von Isoenzymmarkern zueinander und zu *R* könnte zum einen auf einer Nicht-Homologie dieser Region zwischen *X. maculatus* und *X. helleri* beruhen. Es wäre jedoch auch denkbar, daß die bei Fischen der BC₁ festgestellte Kopplung von *R* zu *ESI* von 30% nur eine scheinbare Kopplung darstellt, die durch ein polyfaktorielles Regulationssystem vorgetäuscht wurde. In diesem Fall ist zu erwarten, daß die Kopplung zwischen *ESI* und *R* bei höheren Rückkreuzungen verloren geht. Durch Auskreuzen einzelner regulatorischer Faktoren sollte zudem bei diesen Generationen die Zahl der Fische mit bösartigem Tumor zunehmen. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten Fische der zweiten bis fünften Rückkreuzungsgeneration, die vor Weiterkreuzung jeweils auf Präsenz von *ESI*^a und einen benignen Tumorphänotyp selektioniert wurden, auf Kopplung von *ESI* und *R* zum einen und Segregation der Tumorphänotypen zum anderen untersucht werden.

An der Expressionskontrolle von *ONC-Xmrk* ist jedoch nicht nur der Tumorregulatorlocus *R* beteiligt. Zur Erklärung der Gewebe-spezifischen Überexpression, die nur zur Bildung maligner Melanome, nicht jedoch zu Tumoren in anderen Geweben bei den Rückkreuzungsbastarden führt, ist die Präsenz eines oder mehrerer regulatorischer Elemente nötig, die bislang noch nicht identifiziert werden konnten. Ein im Promotorbereich von *ONC-Xmrk* identifizierter Enhancer ist nicht in der Lage, eine Gewebespezifität der Expression zu vermitteln. Die Untersuchung von Mutanten mit verändertem Tumorphänotyp im Hinblick sowohl auf den Körperbereich, von dem der Tumor ausgeht, als auch auf die Malignität des Tumors, könnte Hinweise auf die Lokalisation eines solchen Elements geben, das durch Kartierung der Mutanten eingegrenzt und anschließend charakterisiert werden könnte. Diese Mutanten fallen zudem häufig auch durch ungewöhnliche Makromelanophorenmuster auf. Bislang ist noch nicht klar, ob *ONC-Xmrk* auch an der Ausprägung der unterschiedlichen Pigmentmuster der verschiedenen *Mdl-Xmrk*-Komplexe beteiligt ist und welcher Art die dafür nötige Interaktion mit dem *Mdl*-Gen sein könnte. Um diese Frage zu klären, muß der *Mdl*-Locus zunächst kartiert

werden, was eine anschließende Klonierung und detaillierte Charakterisierung dieses Gens ermöglichen würde. *Xmrk*-Mutanten könnten außerdem für die Kartierung weiterer, eng mit *ONC-Xmrk* gekoppelter und genetisch gut charakterisierter Gene aufschlußreich sein. Zu diesen Genen zählen neben *Mdl* der das Geschlecht bestimmende Locus *SD*, das *P*-Gen sowie der *RY*-Locus.