

5. Diskussion

5.1 Der Tumorregulatorlocus *R*

5.1.1 Segregation der Tumorphänotypen und Kopplung von *ESI* und *R*

Aufgrund der Segregation benigner und maligner Melanome in *Xiphophorus* Rückkreuzungshybriden war ein Modell erstellt worden (Ahuja & Anders, 1976), demzufolge die Tumorentstehung auf die Wirkung zweier unabhängig voneinander segregierender Genloci zurückzuführen ist. Die Melanomentstehung, die durch die unkontrollierte Aktivität des inzwischen identifizierten *Xmrk* Onkogens ausgelöst wird (Wittbrodt et al., 1989), wird im *X. maculatus* WT durch das Vorhandensein eines Repressorlocus *R* unterdrückt. Dieser Locus scheint an der Kontrolle der Differenzierung der Makromelanophorenvorläufer, des Zelltyps, der durch das *Xmrk* Onkogen transformiert wird, maßgeblich beteiligt zu sein (Vielkind, 1976; Vielkind et al., 1989). Kopplungsstudien hatten *R* als Mitglied von Kopplungsgruppe V identifiziert, wobei die beobachteten Rekombinationswerte zu einem Esterase-Isoenzymlocus, *ESI*, zwischen 10% (Ahuja et al., 1980) und 36% (Morizot & Siciliano, 1983) variierten. Eine in unserem Arbeitskreis durchgeführte Analyse hatte einen genetischen Abstand zwischen *R* und *ESI* von 30,4% ergeben (Förnzler, 1994). Eine Ausdehnung dieser Untersuchung von 250 auf 268 Bastarde der ersten Rückkreuzungsgeneration führte zu einer Verringerung der Rekombinationshäufigkeit auf 29,5%. In der Literatur konnte kein Hinweis auf Kopplungsanalysen bei Fischen aus höheren Rückkreuzungen gefunden werden. So wäre eine gleichbleibende Rekombinationsrate zwischen *ESI* und *R* bei Bastarden aus höheren Rückkreuzungen ein guter Hinweis dafür, daß ein einzelner Faktor die Melanomentstehung in *Xiphophorus* kontrolliert. Die Untersuchung von Fischen der Rückkreuzungsgenerationen zwei bis fünf erbrachte Abweichungen von den 29,5% bei Rekombinationsfrequenzen zwischen 22,1% und 42,7%, wobei die Abweichung nur bei der BC₅ signifikant war ($p < 0,05$). Betrachtet man jedoch die Nachkommen einzelner Elternpaare, fällt auf, daß in der dritten und fünften Rückkreuzungsgeneration die Rekombinationsfrequenz zwischen *ESI* und *R* bei je einem Elternpaar dem erwarteten Wert nahekommt, während bei anderen Eltern Rekombinationswerte von mehr als 50% resultieren. So zeigen z. B. die 30 Nachkommen eines Elternpaares der BC₅ eine Rekombinationsrate zwischen *ESI* und *R* von 23,3%, während 57 Nachkommen zweier weiterer Elternpaare eine Rekombinationshäufigkeit von 50,9% aufweisen. Man könnte vermuten, daß eine Mißklassifizierung des Hybridelternteils in Bezug auf das Esterase-Isoenzym oder den Tumorphänotyp vorlag. Dies scheint jedoch eher unwahrscheinlich, weil zum einen der Esterasetest unzweifelhaft über die Präsenz der ES1^a-Isoform des Enzyms Auskunft gibt, zum anderen nur solche Tiere für eine Weiterzucht

ausgewählt wurden, deren Pigmentierung sich nicht auf den Körper ausdehnte. Durch die Zucht konnten diese Tiere über mehrere Monate beobachtet werden, so daß eine Veränderung des Pigmentphänotyps leicht hätte erkannt werden müssen. Eine Betrachtung der Segregation der Tumorphänotypen bei Fischen höherer Rückkreuzungen ergibt ebenfalls Auffälligkeiten. In der Literatur ist beschrieben, daß die Segregation gut- und bösartiger Melanome bei höheren Rückkreuzungen stets dieselbe sei (Anders et al., 1973, Anders, 1991). Bei Zahlenangaben sind jedoch die Tiere aller Generationen zusammengefaßt (BC₁-BC₄, Anders et al., 1980), so daß keine Werte über die einzelnen Rückkreuzungsgenerationen vorliegen. Unsere eigenen zusammengefaßten Daten entsprechen ebenfalls einer 1:1 Aufteilung benigner zu maligner Tumoren (benign: 310, malign: 337). Bei Trennung der Datensätze zeigt sich jedoch eine signifikante Abweichung der Aufteilung bei BC₃-BC₅. Überwiegen bei der BC₃ noch die Tiere mit gutartigem Tumorphänotyp, ist die Anzahl der Fische mit malignem Melanom bei der BC₄ und BC₅ deutlich erhöht. So weisen unter 31 Nachkommen eines Elternpaares der BC₅ 29 Fische einen bösartigen Tumor auf. Interessanterweise beträgt die Rekombinationshäufigkeit zwischen *ESI* und *R* bei diesen Fischen 51,6%. Bei den übrigen zwei Elternpaaren treten keine signifikanten Abweichungen von der 1:1 Aufteilung auf. Für eine Bestätigung dieser Befunde wird die zukünftige Untersuchung von Bastarden weiterer Rückkreuzungsgenerationen von großer Bedeutung sein. Sowohl die mit steigender Rückkreuzungsgeneration sich zunehmend verändernden Rekombinationswerte zwischen *ESI* und *R* als auch die Abweichung von der 1:1 Segregation der beiden Tumorphänotypen bei diesen Fischen deuten darauf hin, daß ein alleiniger Kontrollfaktor der Tumorentstehung immer unwahrscheinlicher wird. Schon Morizot (1983) zog die Existenz mehrerer beteiligter Faktoren in Kopplungsgruppe V in Betracht, um die beobachtete Nichtlinearität der Abstände *ESI-MDH2* und *ESI-R-MDH2* zu deuten. Eine Beteiligung mehrerer Faktoren an der Tumorkontrolle könnte ebenfalls den nicht unerheblichen Anteil (zwischen 18 und 35%) an intermediären Phänotypen erklären, die nicht eindeutig als gutartig oder bösartig zu klassifizieren sind. Bei Verlust eines Regulatorlocus würde das Vorhandensein eines weiteren beteiligten Locus möglicherweise die Ausprägung eines vollständig malignen Phänotyps verhindern. In der Literatur wird die Hypothese von *R* als ein aus dem Platygenom stammender Repressor häufig bevorzugt. Dennoch ließen sich die bei Betrachtung einzelner Nachkommenschaften und Generationen aufgetretenen Abweichungen auch mit dem Modell von *R* als einem aus dem Schwerträgergenom stammenden "Intensifier" erklären. Es müßten jedoch allele Formen dieses Verstärkungsfaktors postuliert werden, die in unterschiedlichem Maße mit Genen von *X. maculatus* bzw. deren Produkten interagieren.

5.1.2 Molekulare Marker für *R*

Da trotz jahrzehntelanger Forschung am Xiphophorus Melanomsystem keinerlei Hinweis darauf vorlag, auf welche Weise *R* die Differenzierung der Melanocyten kontrolliert, der Schweregrad des Tumors jedoch einen phänotypischen Marker für *R* darstellt, schien ein "positional cloning" Ansatz (Collins, 1992) die Methode der Wahl zu sein. Auf diese Weise waren bereits das *Xmrk* Onkogen bei Xiphophorus (Wittbrodt et al., 1989) sowie eine Vielzahl weiterer Gene bei anderen Organismen, darunter die humanen Tumorsuppressorgene *Rb-1* (Friend et al., 1986) und *WT-1* (Gessler et al., 1990; Call et al., 1990) kloniert worden. Für eine Identifizierung von *R* sind molekulare Marker nötig, die sehr eng mit *R* gekoppelt vererbt werden. Bei einer Genomgröße von Xiphophorus von $4\text{-}5 \times 10^8$ bp (Schwab, 1982) dürfte ein aussichtsreicher Marker nicht mehr als 1 cM von *R* entfernt sein, was ca. 300 kb entspricht (Morizot, 1991). Die vorhandene *X. maculatus* Cosmidgenbank (Burgtorf, 1998) würde eine Isolierung des Gens von diesem Marker ausgehend durch "chromosome walking" ermöglichen. Zunächst wurden, wie bereits mit der Diplomarbeit begonnen (Gutbrod, 1996), molekulare Marker mit Hilfe der AP-PCR Technik identifiziert. Diese Methode war schon zur Erstellung von Genkarten bei anderen Laborfischarten, dem Zebrafisch (*Danio rerio*; Postlethwait et al., 1994) und dem Medaka (*Oryzias latipes*; Wada et al., 1995) erfolgreich angewandt worden. Als noch zuverlässiger und informativer aufgrund einer größeren Ausbeute an Polymorphismen erwies sich die AFLP-Analyse, die häufig bei der Genidentifizierung und beim Genkartenvergleich von Nutzpflanzen Anwendung findet (Simons et al., 1997; Rouppe van der Voort et al., 1997), aber auch zur Vergrößerung einer Genkarte der Ratte eingesetzt wurde (Otsen et al., 1996). Unter insgesamt 389 *X. maculatus* spezifischen Polymorphismen konnten neun Marker mit signifikanter Kopplung zu Kopplungsgruppe V (lod score > 3) detektiert werden. Erwartet wurde ebenfalls, mit dem Geschlechtschromosom kosegregierende Marker zu isolieren, doch alle sieben in Frage kommenden Kandidaten (siehe Anhang, Tab. 15) traten auch bei den zusätzlich untersuchten Kontrollfischen ohne das *X. maculatus* X-Chromosom auf. Das Fehlen eines solchen Markers wäre nur so zu interpretieren, daß in der Region des *Xmrk* Gens, das anhand der Tumoren als phänotypischer Marker für das X-Chromosom fungierte, eine unerwartet hohe meiotische Rekombination erfolgt. Nur direkt dem Gen benachbarte Sequenzen wären demnach als enger gekoppelt erkennbar. Ein solch eng gekoppelter Marker konnte jedoch bislang nicht detektiert werden.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von D. Morizot gelang es, drei der AP-PCR Marker auf deren Kreuzungen zu übertragen, die mit einer anderen *X. helleri* Population (Rio Sarabia) durchgeführt wurden. Zusätzlich konnten sechs weitere Marker für diese Kreuzungen identifiziert werden (Morizot et al., 1998). Im Gegenzug war es möglich, drei in den Sarabia-Kreuzungen detektierte Polymorphismen auch in unserer Kreuzung wiederzufinden. Anhand der zusammengefaßten Markerdaten aus insgesamt sieben Kreuzungen, die aus *X. helleri*, *X. andersi* bzw. *X. couchianus* als rekurrentem Elternteil und *X. maculatus* bzw. *X. variatus* hervorgingen, wurde eine Genkarte von Kopplungsgruppe V erstellt (Kazianis et al., 1998).

Diese umfaßt 20 Markerloci, die sich neben anonymen AP-PCR Markern auch aus fünf Genen zusammensetzt, die für bereits bekannte Proteine kodieren. Diese Analysen zeigten, daß die untersuchte chromosomale Region bei den involvierten *Xiphophorus* Spezies weitgehend homolog zu sein scheint. Allerdings weisen die Marker 18.2 und 19.5 in unserer Kreuzung jeweils eine etwa 13% niedrigere Rekombinationshäufigkeit zum Tumorphänotyp auf als in den beiden *Sarabia*-Kreuzungen (siehe 4.1.2.1, Tab. 4 und 6). Dies läßt vermuten, daß es doch art- oder populationspezifische Unterschiede in der Markerlokalisierung innerhalb von Kopplungsgruppe V geben könnte.

5.1.3 *CDKN2X* und *XDNMT-1* als Kandidaten für *R*?

Die Induzierbarkeit von Melanomen bei *Xiphophorus* Rückkreuzungshybriden durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht konnte bereits vor zehn Jahren demonstriert werden (Setlow et al., 1989). In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde die Kopplung einer Sequenz (*CDKN2X*), die mit den Genen des humanen p15 und p16 Proteins große Homologie aufweist, mit durch UV induzierten malignen Melanomen festgestellt (Nairn et al., 1998). *CDKN2X* konnte durch Kosegregation mit Mitgliedern der Kopplungsgruppe V diesem Chromosom zugeordnet werden. Rekombinationshäufigkeiten zu *ES1* und *MDH2* (Malatdehydrogenase2) von jeweils etwa 20% führten zu der Hypothese, daß es sich bei *CDKN2X* um den Tumoregulatorlocus *R* handeln könnte. *CDKN2* wurde beim Menschen als Tumorsuppressorgen identifiziert, da es in vielen Tumoren homozygot deletiert ist (Nobori et al., 1994) oder durch Mutationen (Okamoto et al., 1994) und Methylierung (Gonzalez-Zulueta et al., 1995) inaktiviert vorliegt. Das Auftreten von Keimbahn-Mutationen im *CDKN2* Gen bei familiären Melanomen (Hussussian et al., 1994; Gruis et al., 1995) und die Anzeichen, daß *CDKN2* möglicherweise einen Einfluß auf die Differenzierung von Zellen ausübt (Lois et al., 1995; Wang & Walsh, 1996), lassen eine Beteiligung des Gens auch an der Melanomentstehung von *Xiphophorus* vermuten. Untersuchungen der Expression zeigten, daß *CDKN2X* sowohl in gut- als auch in bösartigen Melanomen stark überexprimiert wird (S. Kazianis, pers. Mitteilung), und gegenüber normalen Geweben in den Tumoren große Mengen des Proteins vorliegen (K.Sweeney, pers. Mitteilung). Es scheint allerdings schwer vorstellbar, daß die Überexpression eines Wachstumsrepressors die Entstehung der Melanome in den Rückkreuzungsbastarden ermöglichen soll. Eine Überexpression von *p16* wird auch in humanen Tumorzellen beobachtet, denen funktionelles Retinoblastomprotein (Rb) fehlt (Parry et al., 1995; Yeager et al., 1995). Dieser Befund und eine erhöhte Expression von *p16* nach Inaktivierung von Rb gegen Ende der G1-Phase des Zellzyklus deuten auf eine negativ-Kontrolle der Expression von *p16* durch Rb hin (Li et al., 1994; Tam et al., 1994). Ob die Überexpression in den Melanomen von *Xiphophorus* Rückkreuzungsbastarden ebenfalls das

Ergebnis eines inaktiven Rb-Proteins darstellt, bleibt in zukünftigen Experimenten zu klären. Die beobachtete Überexpression und die Feststellung, daß *CDKN2X* die stärkste Kopplung zu UV-induzierten exophytisch wachsenden Melanomen (10%) aufweist, die Kopplung zum gut- und bösartigen Tumorphänotyp dagegen nur 36% (Nairn et al., 1996), in unserer Kreuzung 38% beträgt, scheint *CDKN2X* zumindest als alleinigen Kandidaten eines durch klassische Genetik definierten Repressorlocus auszuschließen. QTL-Analysen von Kopplungsgruppe V hatten jedoch gezeigt, daß noch andere Bereiche des Chromosoms eine, wenn auch weniger starke Assoziation zum Tumorphänotyp zeigen (Kazianis et al., 1998). So kann nicht ausgeschlossen werden, daß *CDKN2X* einen von mehreren Faktoren darstellt, der an der Kontrolle der Tumorexpression mitwirkt.

Die Methylierung von Cytosinresten in CpG Dinukleotiden genregulatorischer DNA-Elemente kann bekanntermaßen die Expression des benachbarten Gens beeinflussen (Razin & Cedar, 1991). So wurde eine Inhibition der Expression von Tumorsuppressorgenen durch Methylierung in einigen Tumoren beobachtet (Esteller et al., 1999; Bachman et al., 1999). In manchen Tumoren konnte auch eine Demethylierung von Protoonkogenen nachgewiesen werden (Hanada et al., 1993). Eine Untersuchung des Methylierungsstatus des *Xmrk* Onkogens hatte gezeigt, daß in Melanomen eine Hypomethylierung, in der Melanomzelllinie PSM sogar eine vollständige Demethylierung des *Xmrk* Onkogen Promotors vorliegt (Altschmied et al., 1997). So ist es möglich, daß für die Melanom-spezifische Überexpression des *Xmrk* Onkogens Hypomethylierung eine Rolle spielt. Demzufolge könnte ein Zusammenhang zwischen Genen, die für die DNA-Methylierung verantwortlich sind, und dem Tumorsuppressorlocus *R* bestehen. Um dies untersuchen zu können, war das DNA-Methyltransferasegen (*XDnmt-1*) von *Xiphophorus* aus der Melanomzelllinie PSM kloniert worden (Altschmied et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Ein 900 bp Fragment des Methyltransferasegens wurde als Sonde für eine RFLP-Kopplungsanalyse von Rückkreuzungsbastarden eingesetzt. Eine Kosegregation des Gens mit dem Tumorphänotyp konnte nicht festgestellt werden, womit die Methyltransferase als Kandidat für *R* ausscheidet. Dennoch ist nicht auszuschließen, daß *R* über andere Faktoren indirekt einen Einfluß auf die Methylierung des *Xmrk* Promotors ausübt.

5.1.4 Genkarte von Kopplungsgruppe V von *Xiphophorus*

Mit den insgesamt 12 identifizierten Markern, die einen lod score ≥ 3 zu *ESI* aufwiesen, wurde eine Genkarte mit Hilfe der Computerprogramme Mapmaker und MapManager erstellt (siehe Abb. 9). Ein Teil der Marker konnte relativ zum *ESI* Gen in Übereinstimmung mit den paarweisen Rekombinationshäufigkeiten positioniert werden. Als problematisch erwies sich jedoch die Einordnung des AP-PCR Markers 13.3. Ob die nicht zu vermeidenden Doppel-

Crossover zum Teil auf experimentellen Fehlern beruhen, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da die Intensität dieses Markersignals bei einigen Individuen sehr schwach und damit schwer auszuwerten war. Durch das Auftreten der Doppel-Crossover erhöht sich die Gesamtlänge der Genkarte auf 87,5 cM. So liegen Marker, die eine Rekombinationshäufigkeit zu *ESI* von weniger als 5% aufweisen (ttt, 12.1, 10.1), dadurch mehr als 15 cM von dem Enzymlocus entfernt. Ein weitaus größeres Problem ergab sich bei dem Versuch, den Tumoregulatorlocus *R* in die Genkarte einzuordnen. Die mit Hilfe der Computerprogramme erstellte Genkarte positioniert *R* an ein Ende der Karte in einem Abstand, der der Rekombinationsfrequenz des äußersten Markers zu *R* entspricht. Dadurch wird der Abstand von *R* zu *ESI* artifiziell auf über 50 cM erhöht. Nur zwei der Markerloci (K2.3, K31.9) zeigen neben *ESI* eine Kopplung zu *R*. Die beiden Marker sind jedoch auf verschiedenen Seiten von *ESI* lokalisiert und 15,9 cM voneinander entfernt. Beide Marker weisen eine Rekombinationsfrequenz zu *R* von 27% auf. Beidseitig benachbarte Marker von K2.3 und K31.9 zeigen jedoch eine sich jeweils erhöhende Rekombinationsrate zu *R* und damit auch einen sinkenden lod score, der diese Marker als nicht mehr mit *R* gekoppelt angibt (siehe Tab. 11).

Tab. 11: Rekombinationshäufigkeiten und lod score-Werte der Markerloci zu *R*. Diese sind entsprechend ihrer Reihenfolge auf dem Chromosom angeordnet.

Markerlocus	n	rekombinant	p [%]	lod score
<i>o</i>	21	9	42,9	0,1
<i>CDKN2X</i>	55	21	38,2	0,7
<i>K11.7</i>	64	24	37,5	0,9
<i>K27.6</i>	63	19	30,2	2,2
<i>K2.3</i>	64	17	26,6	3,2
<i>ESI</i>	268	79	29,5	10,1
<i>13.3</i>	31	13	41,9	0,2
<i>ttt</i>	18	7	38,9	0,2
<i>12.1</i>	42	14	33,3	1,0
<i>10.1</i>	43	14	32,6	1,2
<i>18.2</i>	40	12	30,0	1,4
<i>K31.9</i>	64	17	26,6	3,2
<i>19.5</i>	43	12	27,9	1,9

Abkürzungen: n, Anzahl der getesteten Fische; p, Rekombinationshäufigkeit; Rekombinationshäufigkeiten und lod score-Werte von Markern, die eine Kopplung zu *R* zeigen, sind fettgedruckt hervorgehoben; der hohe lod score bei *ESI* ist auf die große Anzahl der getesteten Fische zurückzuführen, da n in die Berechnung des lod scores eingeht.

Die bestmögliche Erklärung der Kopplungsdaten aus der klassischen Kreuzung postuliert zwei Faktoren in Kopplungsgruppe V, die die Tumorentstehung bei *Xiphophorus maculatus*

kontrollieren, wobei anscheinend keiner eine dominierende Funktion ausübt. Dies würde auch erklären, warum bislang kein molekularer Marker detektiert werden konnte, der eine ähnlich hohe Kopplung zu *R* zeigt wie einige der Marker zu *ESI*. Ob die Hypothese zweier Tumorregulierender Faktoren auch für andere Xiphophorus Kreuzungen zutreffen könnte, war bislang nicht überprüfbar, da keine Experimente zur Übertragung der Marker K2.3 und K31.9 auf andere Kreuzungen unternommen wurden. Es kann nur spekuliert werden, daß eine ähnliche Situation vorliegen könnte, da QTL-Analysen einen schwächeren Peak zwischen *ESI* und *CDKN2X* genau dort ergaben, wo K2.3 in unserer Kreuzung lokalisiert ist. Auch auf der anderen Seite von *ESI* wurde ein weiterer Peak angezeigt, der allerdings eher mit dem Marker ttt assoziiert ist (Kazianis et al., 1998). Für diese Analysen wurden nur Fische aus Kreuzungen eingesetzt, die mit *X. helleri* bzw. *X. couchianus* und *X. maculatus* durchgeführt wurden. Kreuzungen, die *X. variatus* oder *X. andersi* als ein Elternteil benutzten, hatten keine Kosegregation des Tumorphänotyps mit Markern aus Kopplungsgruppe V ergeben. Der Befund, daß die Abstände von je drei Markern zueinander additiv waren (Ausnahme Marker 13.3), zeigt, daß diese Chromosomenregion entgegen einer häufig postulierten Nicht-Homologie (diskutiert bei Vielkind, 1989) weitgehend linear ist. Diese Nicht-Homologie war als Erklärung für die Schwierigkeiten herangezogen worden, *R* in Kopplungsgruppe V einzuordnen.

5.2 Untersuchung der *Xmrk* Funktion durch Analyse verschiedener *Xmrk* Mutanten

Eine Anzahl verschiedener geschlechtschromosomaler Xiphophorus Mutanten war aufgrund eines veränderten Makromelanophoren-musters oder einer Veränderung des Melanomphänotyps isoliert worden. Deren Charakterisierung ließ nicht nur einen tieferen Einblick in die Mechanismen der Tumorentstehung erhoffen, sie konnten auch für eine Kartierung geschlechtschromosomaler Gene benutzt werden. Frühere Angaben zur Zuordnung dieser Gene waren doch zum Teil sehr hypothetisch (Anders et al., 1973; Anders et al., 1984). Erst durch die Klonierung der *Xmrk* Gene wurde die Voraussetzung für eine genaue Genkartierung geschaffen. Eine Untersuchung des *Xmrk* Onkogens der Mutanten setzte eine detaillierte Aufklärung der Struktur der beiden geschlechtschromosomalen Allele voraus. So wurden zunächst fehlende genomische Intronregionen von *Xmrk* in einer PCR Strategie amplifiziert und deren Position durch Sequenzierung der Exon/Intronübergänge ermittelt. Ein Vergleich der genomischen Struktur mit der eines nahen Verwandten, des EGF-Rezeptorgens des Hühnchens (*CER*, Callaghan et al., 1993) zeigte eine hohe Konservierung. Abweichungen fanden sich in den Übergängen von Exon 11/12 und Exon 16/17, die um je drei Nukleotide verschoben sind. Intron12, das in *CER* die Subdomänen III und IV der extrazellulären Domäne trennt, fehlt

sowohl im *Xmrk* Onkogen als auch im Protoonkogen. Damit ist eine von drei Exongrenzen der für die extrazelluläre Domäne des Proteins kodierenden Region betroffen, die noch sowohl bei *let-23* und *DER* der Wirbellosen *C. elegans* (Aroian et al., 1990) und *Drosophila* (Clifford & Schüpbach, 1994) konserviert sind (gezeigt bei Lee & Maihle, 1998). Intron12 von *CER* beinhaltet ein Polyadenylierungssignal, und ein Durchlesen in dieses Intron generiert ein verkürztes Transkript, das neben dem Protein vollständiger Länge gebildet wird (Maihle et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, daß das verkürzte Protein sezerniert wird und durch Bindung des Liganden von *CER*, $TGF\alpha$, die Transformation von Fibroblastenzellen inhibieren kann (Flickinger et al., 1992). Dies scheint einen Regulationsmechanismus darzustellen, um das durch den EGF-Rezeptor vermittelte Wachstumssignal zu modulieren. Verkürzte lösliche Formen von EGF-Rezeptor Homologen wurden z. B. auch in normalen Geweben der Ratte und beim Menschen nachgewiesen. Dafür ist jedoch nicht immer alternative Prozessierung (Reiter & Maihle, 1996), sondern auch alternatives Spleißen (Petch et al., 1990) verantwortlich. Eine Untersuchung dieser Region des EGF-Rezeptorgens von *Xiphophorus* (*XER*, A. Gomez, pers. Mitteilung) zeigte, daß ein 108 bp großes Intron mit einem veränderten Polyadenylierungssignal vorhanden ist. Ob dieses in der Lage ist, die Synthese eines verkürzten Produkts zu ermöglichen, wurde bislang nicht untersucht. In der Literatur wurden jedoch alternative funktionelle Polyadenylierungssequenzen beschrieben (Senterre-Lesenfants et al., 1995; Penhoat et al., 1997). Verkürzte Transkripte von *Xmrk*, die durch Hineinlesen in andere Introns oder auch durch alternatives Spleißen oder alternative Transkriptionsstartpunkte entstehen könnten, wurden in Northern Blot Experimenten detektiert (Wittbrodt et al., 1989; Adam et al., 1991). Da verkürzte Transkripte vor allem in malignen Melanomgeweben gefunden werden, kann eine negative regulatorische Funktion dieser Produkte ausgeschlossen werden. Wie auch in vielen Tumorzelllinien zu beobachten (Lee et al., 1998), dürften verkürzte mRNAs eher aus der starken Überexpression Tumor-spezifischer Gene resultieren. Es gilt als gesichert, daß Mitglieder einer Genfamilie aus einer Vorläufersequenz durch Genduplikation und nachfolgende Diversifizierung entstehen (Stark & Wahl, 1984; Maeda & Smithies, 1986). Das Vorhandensein des Introns12 in *XER* gibt jedoch keine Auskunft darüber, ob die *Xmrk* Gene sich aus einem solchen Urgen vor Entstehung von *XER* entwickelten, oder ob *Xmrk* aus *XER* hervorging und Intron12 erst sekundär verlorenging. Möglicherweise kann die detaillierte Aufklärung der genomischen Struktur von *XER* mehr Aufschluß darüber geben. So ist die Zahl der Exons unter Berücksichtigung des fusionierten Exons12/13 bei *Xmrk* gegenüber *CER* um eines (27, Y-ONC, INV-*Xmrk*) bzw. zwei (26, X-ONC) reduziert. Der etwaige Verlust eines Exons erfolgte wahrscheinlich, wie bei der Deletion von Exon 26 in X-ONC, in dem für die carboxyterminale Domäne des Proteins kodierenden Bereich. Dies kann daraus geschlossen werden, daß dieselbe Exonanzahl in *CER* und *Xmrk* die extrazelluläre und die Kinasedomäne des Rezeptors kodieren. So bleibt es interessant abzuwarten, ob die Zahl der Exons von *XER* eher *Xmrk* oder *CER* gleichkommt.

5.2.1 Ausfall der Melanombildung durch Deletion des *Xmrk* Onkogens

Der Beweis, daß *ONC-Xmrk* das für die Tumorentstehung verantwortliche Gen darstellt, konnte unter anderem anhand einer Loss-of-Function Mutanten (Lof-1) geführt werden. Deren *Xmrk* Gen weist die Insertion eines ca. 7 kb großen Fragments in Exon24 (ehemals Exon w, Wittbrodt et al., 1989) auf, das ein Transposon-ähnliches Element darstellt. Zwei verschiedene Mechanismen führen zur Entstehung eines um die carboxyterminale Domäne verkürzten *Xmrk* Rezeptors, der nicht mehr in der Lage ist, Proliferationssignale in die Zelle zu senden (Schartl et al., 1999). Während Loss-of-Function Mutationen durch den Funktionsverlust eines Gens normalerweise nachteilig für den betroffenen Organismus sind, hat ein Funktionsverlust von *ONC-Xmrk* in Xiphophorus Hybriden einen positiven Effekt, da diese Fische niemals *Xmrk*-bedingte Hauttumoren ausprägen. Die Untersuchung zweier weiterer Loss-of-Function Mutanten konnte zumindest für die Mutante Lof-2 die Unfähigkeit zur Melanomentwicklung durch Deletion des gesamten Onkogenlocus erklären. Wie später noch diskutiert wird, sind die Gene für die Ausprägung der RY-Farbmerkmale und die Geschlechtsdeterminierung 3' von *ONC-Xmrk* lokalisiert. Da Lof-2 das Farbmuster *Dr* ausprägt, kann sich die Deletion nicht auf Elemente erstrecken, die für die Expression von *Dr* nötig sind. Überraschenderweise zeigt sich jedoch ein Effekt auf den geschlechtsdeterminierenden Locus (*SD*) insofern, daß alle direkten Nachkommen von Lof-2, das selbst weiblichen Geschlechts war, mit *X. helleri* fertile Männchen sind. Üblicherweise wird bei den Bastarden das Gegenteil beobachtet, da anscheinend Faktoren auf dem X-Chromosom von *X. maculatus* über autosomale geschlechtsbestimmende Faktoren von *X. helleri* dominieren. Da *SD* 3' des *RY*-Locus positioniert wurde, kann ausgeschlossen werden, daß die Deletion bei Lof-2 auch *SD* einschließt. Ob eine zweite Mutation in Lof-2 stattgefunden hat, die *SD* involviert, kann erst nach Identifizierung und Klonierung des geschlechtsdeterminierenden Gens festgestellt werden. Das Fehlen jeglicher Makromelanophoren bei Lof-2 könnte bedeuten, daß die Deletion auch den Makromelanophorenlocus (*Mdl*) einschließt. Dieser konnte kürzlich als separater Locus im *Tu*-Genkomplex identifiziert werden (Weis & Schartl, 1998) und befindet sich 5' von *ONC-Xmrk* (siehe 5.2.3). Zahlreiche repetitive Sequenzen in dieser Region erschwerten bislang eine Klärung dieser Frage durch Southern Analysen. Erste Hinweise deuten an, daß das Chromosom von Lof-2 in einem Bereich, der ein Kandidatengen für *Mdl* beinhaltet, nicht deletiert zu sein scheint (J.-N. Volff, persönliche Mitteilung). Dies muß jedoch in weiteren Experimenten abgesichert werden, da auch dieses Kandidatengen wie *Xmrk* in mehrfacher Kopie im Genom von *X. maculatus* vorkommt. Sollte sich diese Annahme bewahrheiten, müssen epigenetische Effekte wie im Fall der Lof-1 Mutante (Schartl et al., 1999) postuliert werden, die die Expression der Makromelanophoren verhindern (Henikoff & Matzke, 1997).

Eine lokal beschränkte Deletion könnte z. B. durch repetitive Elemente wie den SINEs ("short interspersed nuclear element") verursacht worden sein, die bekanntermaßen die Entstehung von Deletionen durch homologe Rekombination begünstigen können. So konnte in einem Fall der familiären Hypercholesterinämie eine durch Rekombination zwischen Einheiten von Alu-Sequenzen ausgelöste Deletion im humanen LDL-Rezeptorgen identifiziert werden, die ursächlich für die Erkrankung war (Lehrman et al., 1985). Derartige repetitive Elemente (z. B. Cluster von XIR-Elementen, siehe Anders et al., 1994) wurden im 5'-Bereich des *Xmrk* Onkogens nachgewiesen (J.-N. Volff, persönliche Mitteilung). Auch 3' des Gens wurden repetitive Sequenzen gefunden, die jedoch noch nicht näher charakterisiert sind. Der Mechanismus der Deletionsentstehung von Lof-2 wird erst nach Klonierung des Deletionspunktes zu klären sein.

Bei der Untersuchung des *Xmrk* Onkogens einer weiteren Mutante, Lof-3, konnte mit keiner der angewandten Techniken eine Veränderung gegenüber dem wildtypischen X-chromosomalen Allel detektiert werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß eine Nonsense- oder Missense-Mutation in einem der Exons vorliegt. Da die Sensitivität der SSCP-Analyse unter optimalen Bedingungen maximal 95% erreicht (Sheffield et al., 1993), ist es möglich, daß ein vorhandener Basenaustausch unter den Bedingungen, mit denen die Experimente durchgeführt wurden, nicht nachzuweisen war. Der Beleg einer Nonsense-Mutation durch Detektion eines verkürzten *Xmrk* Proteins in Western Blot Experimenten ist bislang nicht durchführbar, da ein ONC-*Xmrk*-spezifischer Antikörper, der möglichst den extrazellulären Bereich des Proteins erkennen sollte, noch nicht zur Verfügung steht. Der Phänotyp von Lof-3 ließe sich aber auch mit einer Mutation im *Mdl*-Locus erklären. Makromelanophoren bzw. deren Vorläuferzellen, die Melanoblasten, stellen den Zelltyp dar, der für die neoplastische Transformation durch *Xmrk* empfänglich ist (Ahuja, 1979; Anders et al., 1991). Ein Fehlen von Makromelanophoren, wie es bei der Lof-3 Mutante beobachtet wird, macht somit die Entwicklung von Melanomen unmöglich. Southern Blot Experimente in der Region des bereits erwähnten *Mdl*-Kandidatengens hatten keinen eindeutigen Hinweis für eine größere Deletion erbracht. Die Aufklärung der genomischen Organisation dieses Gens wird zukünftige intensive Mutationsanalysen ermöglichen. Der Nachweis eines ONC-*Xmrk* Transkripts in der dorsalen Rückenflosse der Mutante in mit dem WT vergleichbarer Menge hatte zumindest zeigen können, daß die Expression des Onkogens nicht, wie vermutet (Woolcock et al., 1994), mit der Bildung der Pigmentzellen korreliert ist (Schartl et al., 1999). Dies wird ferner daran deutlich, daß bei Xiphophorus Stämme mit Makromelanophorenmustern existieren, denen eine onkogene Kopie von *Xmrk* fehlt (Weis & Schartl, 1998).

5.2.2 Anzeichen für einen Rekombinations-"Hotspot" im *Xmrk* Onkogen

Der Vergleich der beiden WT-Allele des *Xmrk* Onkogens hatte insgesamt 20 Polymorphismen bestehend aus Deletionen/Insertionen oder aber einzelnen Basenaustauschen ergeben. Verschiedene *Xmrk*-Mutanten wurden daraufhin an diesen polymorphen Genregionen analysiert. Interessanterweise ergaben diese Untersuchungen drei Gruppen von Crossover-Mutanten, deren Bruchpunkt in jeweils unterschiedlichen Regionen lokalisiert ist, wobei sich sämtliche Crossover auf die für die extrazelluläre Domäne des Rezeptors kodierende Region konzentrieren. In Anbetracht der niedrigen Rekombinationsrate, die bei Kopplungsanalysen der auf den Geschlechtschromosomen lokalisierten bekannten Gene beobachtet wurde (1:158, Gutbrod & Schartl, 1999), überrascht die große Zahl der aufgetretenen Crossover im *Xmrk* Onkogen (ca.10). Intragenische Crossover sind in der Literatur nur spärlich beschrieben (Kim et al., 1994; Lo Ten Foe et al., 1997), was auf die Schwierigkeiten der Identifizierung zurückzuführen sein dürfte, wenn keine phänotypische Veränderung damit einhergeht. Der Befund, daß sich die Crossover-Ereignisse auf eine bestimmte Region von *ONC-Xmrk* beschränken, läßt die Präsenz eines Rekombinations-"Hotspots" vermuten. Derartige "Hotspots" wurden vor allem für den MHC ("major histocompatibility complex") der Maus beschrieben (Lafuse et al., 1986; Steinmetz et al., 1986). Doch trotz detaillierter Untersuchung und weitläufiger Sequenzierung der Crossover-Regionen von rekombinanten und parentalen Maus-Haplotypen gelang es nicht, die Bruchpunkte auf ein bestimmtes Sequenzelement einzugrenzen (Shiroishi et al., 1990; 1991). Es ist jedoch auffällig, daß zwei der "Hotspots" mit je drei Motiven assoziiert sind, die repetitiver Natur sind. Diese stellen eine Tandem Wiederholung einer tetrameren Sequenz (Kobori et al., 1986), ein degeneriertes retrovirales Element (Zimmerer & Passmore, 1991) und ein mittel-repetitives Element der MT-Familie dar (Shiroishi et al., 1990). Ähnliche repetitive DNA-Elemente treten auch in der Rekombinations-"Hotspot" Region des menschlichen MHC-Haplotyps HLA-DQ auf (Wahls et al., 1990a). Im Zusammenhang mit repetitiven Elementen wird auch eine Begünstigung der Rekombination durch Z-DNA diskutiert (Stringer, 1985). Diese besondere Konformation von linksgängiger superspiralierter DNA tritt in Sequenzen aus sich wiederholenden Dinukleotiden auf, worin sich ein Pyrimidin- und ein Purinrest abwechseln (Rich et al., 1984). Experimente mit nicht-replizierenden Plasmiden, die ein Z-DNA-Motiv enthielten, zeigten eine 20fache Erhöhung der Rekombinationsrate in humanen Zellen (Wahls et al., 1990b).

Die Crossover Bruchpunkte der *Xmrk* Mutanten konnten aufgrund der Größe der in Frage kommenden Bereiche nicht exakt identifiziert werden. Das Fehlen polymorpher Marker zwischen dem ersten Intron und Exon 15 ließ keine weitere Eingrenzung der Bruchpunkte bei den Mutanten DrLi (mut), Sb und Sr crossover 30⁸⁴B zu. Die Sequenzen dieser Region, die mit Ausnahme weniger 100 bp vollständig vorliegen, zeigten keine auffälligen Motive mit Ausnahme eines CA-Dinukleotids in Intron8, das in 8-11 Wiederholungen auftrat. Außerdem weist Intron6 über einen Bereich von mehr als 500 bp eine Sequenzhomologie von 74% zu einem in der 5'-Region des *Xmrk* Onkogens identifizierten Retrotransposons auf, Rex-3, das

eine reverse Transkriptase kodiert. Rex-3 liegt im Genom von *Xiphophorus* in ca. 1000 Kopien pro haploidem Genom vor (J.-N. Volff, persönliche Mitteilung). So wäre denkbar, daß diese Sequenz an Rekombinationsereignissen im *Xmrk* Gen beteiligt ist. Auch die dem CA-Mikrosatellit komplementäre Sequenz (TG)₈₋₁₁ könnte ein Ziel für bevorzugte Rekombinationsereignisse darstellen. So konnten Tracy et al. (1997) nachweisen, daß verschiedene 18 nt lange GT-reiche Sequenzen Rad51, dem RecA aus *E. coli* homologen Protein von *Saccharomyces cerevisiae*, als bevorzugtes Substrat dienen. RecA ist als Katalysator des DNA Strangaustausches bei homologen Rekombinationsvorgängen und der DNA-Reparatur in *E. coli* unabdingbar. Diese TG-Wiederholung stellt aber auch ein Motiv dar, das Z-Konformation annehmen kann. So konnten Kmiec et al. (1985) zeigen, daß das Rekombinationsprotein RecI aus dem Pilz *Ustilago* Z-DNA Bindungsaffinität aufweist.

Das Crossover im Onkogen von DrLi wurde auf einen Bereich im 5'-Teil des ersten Introns eingegrenzt. Da bislang erst ein Bruchteil dieses Introns sequenziert ist, wurden keine weiteren Experimente zur Identifizierung des Bruchpunkts durchgeführt. Bei Sp4 und N1 war der Bruchpunkt auf eine relativ kleine Region um den Transkriptionsstartpunkt herum lokalisierbar. Die Promotorregion des X- und Y-Allels des *Xmrk* Onkogens ist zumindest bis nt -305, der Stelle der Insertion in Y-ONC, identisch, deshalb schien eine weitere Sequenzierung nicht lohnenswert. So hatte die Sequenzierung eines "Hotspots" im MHC der Maus nur zeigen können, daß die Rekombinationsereignisse ohne Fehler, also ohne die Entstehung von Insertionen, Deletionen oder Nukleotidaustausch stattfanden (Kobori et al., 1986). Was bei diesen Mutanten sowie bei N2 und N2orn auffällt, ist das Fehlen eines zweiten Signals bei Hybridisierungen mit den beiden Intron1-spezifischen Proben. Neben einer als eher unwahrscheinlich anmutenden Deletion des gesamten ersten Introns des Onkogens könnte sich hinter dem detektierten Signal jeweils eine zweite Bande gleicher Größe verbergen, die ein bislang nicht bekanntes Onkogenfragment repräsentiert. Diese Annahme wäre durch Southern Blot Experimente unter Verwendung weiterer Restriktionsenzyme zur Detektion eines RFLPs zu überprüfen. Der Befund wäre auch durch eine Genkonversion zwischen der onkogenen und protoonkogenen Version von *Xmrk* zu erklären. Diese Konversion müßte zumindest zweimal, in Sp4 und in N1, stattgefunden haben. Genkonversionen sind, trotz der Schwierigkeit des Nachweises, inzwischen mehrfach z. B. für menschliche Gene und Gene der Maus beschrieben. So wurde zwischen den fast identischen Genen *SMN^T* ("Survival motor neuron") und *SMN^C* im Locus für Spinale Muskelatrophie Genkonversion postuliert (Campbell et al., 1997). Eine Genkonversion des Steroid 21-Hydroxylasegens mit einem nahe gelegenen Pseudogen konnte mehrfach bei Untersuchung von Fällen der Congenitalen adrenalen Hyperplasie nachgewiesen werden (Higashi et al., 1988; Urabe et al., 1990). Das Pseudogen weist eine Sequenzähnlichkeit von 98% auf und ist durch Duplikation eines Komplexes, der ein weiteres Gen einschließt, entstanden. Als Voraussetzung für eine Genkonversion in Säugerzellen scheint eine Sequenzhomologie der beteiligten Gene essentiell, wobei die

Rekombinationsraten mit sinkender Länge und zunehmender Divergenz der Sequenzen abnehmen (Rubnitz & Subramani, 1986; Liskay et al., 1987). Diese Homologiebedingung wäre durch die *Xmrk* Gene erfüllt, die zumindest auf cDNA-Ebene eine Sequenzähnlichkeit von 99% aufweisen (Adam et al., 1991; Dimitrijevic et al., 1998). Genkonversion könnte gerade eine Begründung dafür liefern, daß die Funktion eines Gens erhalten blieb, das für ein Überleben der Fische entbehrlich scheint. Denn die Entstehung des *Xmrk* Onkogens durch Duplikation des Protoonkogens machte eine sofortige Funktion einer der beiden Genkopien überflüssig, die normalerweise durch Fehlen eines Selektionsdrucks Mutationen anhäufen sollte. Die beobachtete differentielle Expression des Protoonkogens während der Organogenese läßt auf eine wichtige Funktion dieser Genkopie schließen (C. Winkler, unveröffentlicht; Raulf, 1991), womit das Onkogen die entbehrliche Kopie darstellt. Das zeigt sich sowohl an Mutanten ohne funktionellen Rezeptor als auch an Xiphophorus Stämmen, die trotz des Fehlens des Onkogens keine reduzierte Überlebensfähigkeit aufweisen. Jedoch würden sich allmählich anhäufende Mutationen im Fall von stattfindenden Genkonversionen zwischen den beiden *Xmrk* Versionen auch zu schädlichen Mutationen im Protoonkogen führen. Somit ist zu erwarten, daß solche negativen Genotypen eliminiert werden. Das *Xmrk* Onkogen könnte demnach indirekt unter einem Selektionsdruck stehen, der einer divergenten Entwicklung der beiden Gene entgegenwirkt und auch das Onkogen als funktionellen Rezeptor erhält. Genkonversion könnte auch die Ursache dafür sein, daß die Sequenzierung von Exon 12/13 bis Exon 15 der wildtypischen und verschiedener mutanter Genotypen keine eindeutige Zuordnung der Polymorphismen zu den beiden ONC oder INV Allelen erlaubte. Eine Interpretation durch Phasenunterbrechung während der PCR (Jansen & Ledley, 1990) scheint unbefriedigend. So sollte ein zu amplifizierendes Fragment von nur 568 bp bei ausreichender Extensionszeit in der PCR vollständig synthetisiert werden können. Der Befund bei einem Klon der Mutante DrLi, der in allen Polymorphismen der vermutlichen X-ONC Sequenz (ein Klon, siehe Abb. 23) mit Ausnahme zweier benachbarter Nukleotide entspricht, wäre durch eine Genkonversion zwischen X- und Y-ONC zu erklären.

5.2.3 Kartierung der Region um die *Xmrk* Gene auf den Geschlechtschromosomen durch Analyse von *Xmrk* Crossover-Mutanten

Die molekulare Charakterisierung der *Xmrk* Crossover Mutanten und eine Betrachtung ihres Phänotyps ermöglichte die Kartierung der Farbmustergene und des Geschlechtsdeterminierenden Locus relativ zum *Xmrk* Onkogen. So stimmt in allen Fällen das Makromelanophorenmuster der Mutanten mit dem des Elternteils überein, von dem das 5'-Ende des rekombinanten *Xmrk* Onkogens stammt. Sr crossover 30⁸⁴B z. B. weist das wildtypische Sr-Muster auf. Somit muß *Mdl* 5' von ONC-*Xmrk* lokalisiert sein. Das Geschlecht der Mutante

und deren RY-Farbmuster entspricht jedoch immer dem Elternteil, der den 3'-Anteil von *Xmrk* vererbte. Bei DrLi, DrLi (mut) und Sr crossover 30⁸⁴B stellen der 3'-Teil von *Xmrk* und daran anschließende Sequenzen das X-Chromosom dar. Entsprechend zeigen diese Mutanten das RY-Muster *Dr* und sind weiblichen Geschlechts. Nicht damit in Einklang steht der Befund für die Mutante Sb. Hier wurden in der 3'-Region von *Xmrk* X-chromosomale Marker detektiert, das RY-Farbmuster Rt und das Geschlecht des Fisches identifizierten diesen Bereich jedoch als Y-Chromosom. Wahrscheinlich hat ein Doppel-Crossover zum Austausch des 3'-Bereichs des Y-chromosomalen Onkogen-Allels von Sb geführt. Dieses Ereignis müßte vor der Isolierung des Chromosoms in der Freilandpopulation stattgefunden haben, da sich dieses im genetischen Hintergrund eines Laborstammes befindet, dessen zweites Geschlechtschromosom W keine onkogene Kopie von *Xmrk* aufweist. Die Reihenfolge der Gene 3' von *ONC-Xmrk* konnte mit Hilfe einer weiteren Mutante festgestellt werden, bei der durch ein Crossover der Teil des X-Chromosoms auf das andere Geschlechtschromosom transferiert worden war, der das *Mdl*-Gen einschließlich des *RY*-Locus beinhaltete (Kallman, 1970). Das Geschlecht wurde von dieser Mutation nicht betroffen. Somit ergibt sich eine Gensequenz auf den Geschlechtschromosomen von *Mdl* - 5' *ONC-Xmrk* 3' - *RY* - *SD* (siehe Abb. 29). Eine Kartierung des P-Gens, das den Zeitpunkt der sexuellen Reifung bestimmt, war anhand der charakterisierten Mutanten nicht möglich. Das *Xmrk* Protoonkogen konnte 3' der onkogenen Kopie positioniert werden. Eine genaue Lokalisierung konnte im Rahmen der Experimente jedoch aufgrund der Schwierigkeit, das X- und Y-chromosomale Allel zu unterscheiden, nicht erfolgen. Früheren Untersuchungen zufolge kann eine Orientierung des Genkomplexes auf dem Chromosom derart angenommen werden, daß *Mdl* auf das Telomer, *SD* dagegen in Richtung auf das Centromer weisen (Anders et al., 1973; Ahuja, 1979). Eine Positionierung von *Xmrk* mittels FISH ("fluorescence in situ hybridization") in Telomernähe eines Chromosomenpaares von *X. maculatus* (I. Nanda, unveröffentlicht) läßt eine Abschätzung der Länge des gesamten Komplexes aus der beobachteten Rekombinationshäufigkeit zu. Ermittelte Rekombinationsraten zwischen *Mdl* und *SD* von 0,2-0,3% (Kallman & Schreibman, 1971) und 0,6% (Gutbrod & Schartl, 1999) schränken die untersuchte Region auf einen Bereich von nicht mehr als 180 kb ein. Dies sollte eine molekulare Isolierung der noch fehlenden Gene durch "chromosome walking" mit Hilfe der *X. maculatus* Cosmidgenbank ermöglichen.

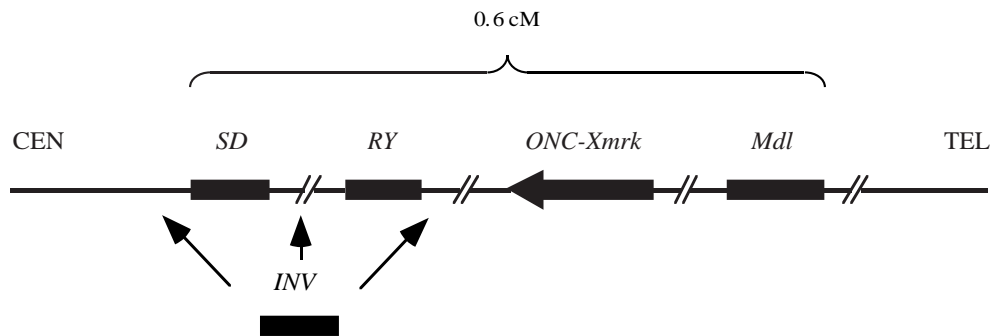


Abb. 29: Anordnung der Gene auf den Geschlechtschromosomen von *X. maculatus*. CEN: Zentromer, *SD*: Geschlechtsdeterminierender Locus, *RY*: Locus für rote und gelbe Farbmuster, *Mdl*: Makromelanophorenlocus, TEL: Telomer. Die exakte Position von *INV-Xmrk* 3' von *ONC-Xmrk* ist konnte bislang nicht ermittelt werden.

5.2.4 Identifizierung einer genregulatorischen Region in *Xmrk*

Das *Xmrk* Onkogen ist als Tumor verursachendes Gen seit längerem identifiziert (Wittbrodt et al., 1989). Dabei gilt die Überexpression des Rezeptors als Auslöser für die Transformation der Pigmentzellen (Adam et al., 1991; Mäueler et al., 1993). Es konnte ein GC-Box Element im Promotorbereich identifiziert werden, das die Transkription von *Xmrk* sowohl in Melanomzellen als auch in einer embryonalen Zelllinie zu aktivieren vermag (Baudler et al., 1997). Bislang konnte jedoch kein regulatorisches Element identifiziert werden, das die gewebespezifische Überexpression, wie sie in Melanomen zu beobachten ist, erklären könnte. Auch ist noch immer unklar, was die erheblichen Unterschiede in der Malignität der Tumoren verursacht, die mit den verschiedenen *Mdl-Xmrk* Allelen einhergeht. So entwickeln Rückkreuzungsbastarde zwischen *X. mac* und *X. hell* mit dem *Mdl*-Muster *Sr* keine malignen Melanome, hier tritt nur eine Verstärkung des Makromelanophorenmusters auf. Aus *Sd* jedoch gehen nach Hybridisierung bösartige Tumoren hervor. Anders et al. (1973) begründen dies mit Kontrollelementen, die im Fall von *Sr* auf dem Y-Chromosom liegen und eng mit *Sr* gekoppelt sind, wohingegen *Sd*-kontrollierende Elemente auf Autosomen lokalisiert sein sollen. Es kann ebensogut spekuliert werden, daß nur das X-chromosomale Allel des Onkogens mit einem Element assoziiert ist, das für die Überexpression des Gens ursächlich ist. Die Lage der Crossover der untersuchten Mutanten in Zusammenhang mit deren Tumorphänotyp lassen diesbezüglich interessante Schlüsse zu. Das Crossover konnte sowohl bei *Sr* crossover 30⁸⁴B und *DrLi* (mut) als auch bei *Sb* auf die Region zwischen dem ersten Intron und Exon 15 eingegrenzt werden. Da *Sr* crossover 30⁸⁴B das wildtypische *Sr*-Muster ausprägt und auch nach Kreuzung keine malignen Melanome hervorbringt, müssen alle Komponenten, die die Pigmentzellen und somit auch den Entstehungsort der Tumoren auf bestimmte Körperbereiche

begrenzen sowie für den Malignitätsgrad des Tumors verantwortlich sind, 5' von Exon 15 von *ONC-Xmrk* zu finden sein. Da die Malignität des Melanoms mit der Überexpression von *ONC-Xmrk* korreliert ist, müssen genregulatorische Elemente, die für diese starke Transkription in den Tumoren verantwortlich sind, ebenfalls 5' von Exon 15 zu finden sein. Die Mutante *Sb* zeichnet sich durch starke Malignität des *Mdl-Xmrk* Komplexes aus. Das wäre demnach so zu interpretieren, daß deren Crossover weiter 5' als das von *Sr* crossover 30⁸⁴B zu suchen sein müßte. Adulte *DrLi* (mut) Fische wiederum entsprechen phänotypisch dem das *Sr*-Muster ausprägenden Wildtyp. Interessanterweise entstand das rekombinante *Xmrk* Onkogen dieser Mutante durch ein Crossover des *DrLi* Chromosoms mit dem Y-Chromosom der Mutante *Sr''*. Dabei wurde die 5'-Sequenz des Onkogens von *Sr''* auf das mutante X-Chromosom übertragen. *Sr''* zeichnet sich zum einen durch ein gegenüber dem wildtypischen *Sr* verstärktes *Mdl*-Muster aus, zum anderen entwickelt diese Mutante im Gegensatz zu *Sr* nach Hybridisierung hochmaligne Melanome. Während *DrLi* nach Kreuzung ebenfalls bösartige Tumoren ausbildet, sind diese in adulten *DrLi* (mut) Fischen nicht zu finden. Das bedeutet, daß die Übertragung des Bereiches von *Mdl-ONC-Xmrk* aus dem *Sr''*-Chromosom auf das *DrLi*-Chromosom nicht nur ein wildtypisches *Sr*-Muster wiederherstellt, sondern gleichzeitig die Entwicklung von Tumoren verhindert. Leider konnte die den mutanten Phänotyp von *Sr''* verursachende Mutation mit den angewandten Methoden nicht identifiziert werden. Eine Mutation in einem der Exons war durch SSCP-Analyse nicht zu detektieren. Es wäre jedoch denkbar, daß durch die Röntgenstrahlung ein regulatorisches Element mutiert wurde, das für die Überexpression des Onkogens in *Sr''* verantwortlich ist. Dieses könnte in einem der Introns verborgen sein, die nur zum Teil näher analysiert wurden. Die Lage eines solchen Elements muß 3' des Crossovers von *DrLi* (mut) angenommen werden. Die Vermutung, *Sr''* könnte durch Mutation derselben regulatorischen Sequenz entstanden sein, die für die Gut- bzw. Bösartigkeit des Tumors in *Sr* crossover 30⁸⁴B bzw. *Sb* verantwortlich ist, verlangt eine Positionierung des Crossovers von *DrLi* (mut) in eben diesem Element (siehe Abb. 30). Die regulatorische Sequenz wäre demnach auf eine Region zwischen dem ersten Intron und Exon 15 einzugrenzen, und zwar zwischen den Bruchpunkten von *Sb* und *Sr* crossover 30⁸⁴B in der Crossover Region von *DrLi* (mut). Es könnte bei *Sr''* jedoch auch ein separater Regulator betroffen sein, der jenseits des Crossovers von *Sr* crossover 30⁸⁴B lokalisiert wäre. Es ist auch nicht völlig auszuschließen, daß es sich bei der Mutation von *Sr''* um einen Nukleotidaustausch in der kodierenden Region handelt, der durch SSCP nicht identifiziert werden konnte. Je nach Lage des Crossovers in *DrLi* (mut) könnte eine solche Punktmutation sowohl die extrazelluläre als auch Transmembran- oder intrazelluläre Domäne von *Xmrk* betreffen. Dies könnte einen *Xmrk* Rezeptor generieren, der ständig hochaktiv vorliegt und deshalb bereits in Jungfischen maligne Tumoren hervorruft. Derartige aktivierende Punktmutationen sind bei einer Reihe von Rezeptortyrosinkinasen bekannt (Woolford et al., 1988; Lips et al., 1994). Auch für den wildtypischen *Xmrk* Onkogenrezeptor werden aktivierende Mutationen als Ursache einer

basalen Autophosphorylierung vermutet, die nach Transfektion in Säugerzellen zu beobachten ist. Ein Nukleotidaustausch in *Xmrk* von *Sr''* müßte jedoch weitaus aktiver sein, denn im Gegensatz zu parentalen *X. maculatus* Fischen mit dem Muster *Sd* weisen bereits parentale Tiere mit dem Muster *Sr''* verglichen mit *Sr* eine Intensivierung der Pigmentierung auf. Deshalb scheint eine aktivierende Mutation als Auslöser für die Melanombildung in den Bastarden wahrscheinlicher als eine Rezeptorüberexpression.

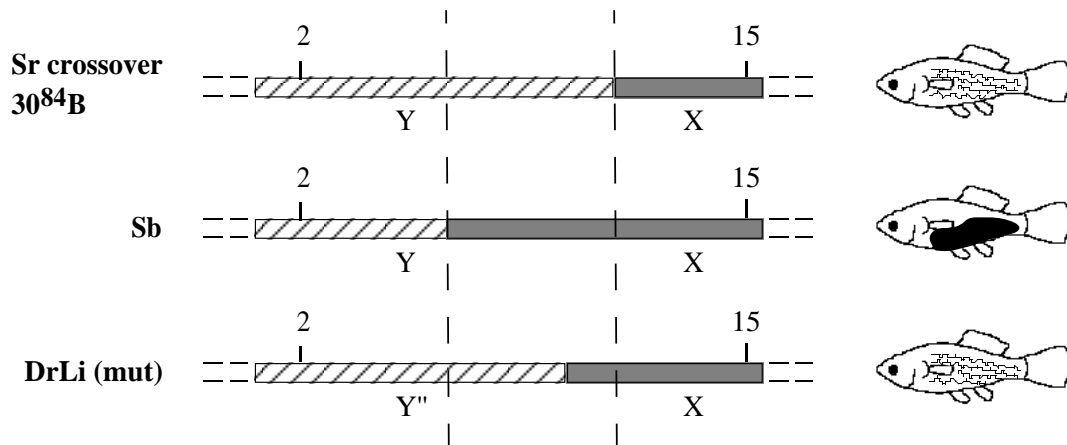


Abb. 30: Schematische Eingrenzung des postulierten regulatorischen Elements im *Xmrk* Onkogen von *Xiphophorus*. Es ist nur der Bereich des Gens abgebildet, in dem die anhand der Crossover der *Xmrk* Mutanten identifizierte regulatorische Sequenz enthalten sein müßte. Die gestrichelten Linien demonstrieren eine weitere Eingrenzung der interessierenden Region. 2/15: Exon2 bzw. 15, Y: nicht-tumorigenes Y-ONC, X: tumorigenes X-ONC.

Der Phänotyp der Mutante *DrLi*, die ein Makromelanophorenmuster ausprägt, das keinem der beiden Elternarten, *X. mac* und *X. var*, entspricht, könnte aus einer gestörten Interaktion regulatorischer Elemente aus der 5'-Region der *X. var* Sequenz mit einem Element aus der *X. mac* Sequenz resultieren. Das würde jedoch bedeuten, daß ein solches Element in *Xmrk* Einfluß auf die Ausprägung des Makromelanophorenmusters nehmen könnte. Eine solche Interaktion kann jedoch nicht zwingend erforderlich sein, da sie in Stämmen mit *Mdl* und ohne *ONC-Xmrk* nicht möglich ist. Die Beobachtung, daß die Mutanten *N1* oder *N2* maligne Melanome nach Kreuzung entwickeln können, kann möglicherweise mit der veränderten Region des ersten Introns deren *Xmrk* Onkogens zusammenhängen. Dies bleibt vorerst jedoch spekulativ und bedarf einer genaueren Untersuchung dieser Region.

Die Ergebnisse der Mutantanalyse im Zusammenhang mit früheren Untersuchungen geben Anlaß zu folgender Hypothese: Die normale Expression des *Xmrk* Onkogens wird durch die Kooperation von zumindest zwei regulatorischen Elementen gesteuert. Dies wurde z. B. auch für das humane EGF-Rezeptorgen beschrieben, für das neben einem im Promotorbereich

identifizierten Enhancer ein weiteres Element im ersten Intron nachgewiesen werden konnte, das nur in Kombination mit dem "upstream" gelegenen Enhancer aktiv ist und dessen aktivierende Fähigkeit in HeLa Zellen um ein mehrfaches erhöht (Maekawa et al., 1989). Ebenso konnten regulatorische Elemente im ersten Intron des EGF-Rezeptorgens in verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen werden, die dort für die zellspezifische Überexpression des Rezeptors verantwortlich gemacht wurden (Chrysogelos, 1993). Auch im ersten Intron des PDGF-B Gens wurden mehrere Sequenzelemente identifiziert, die die Transkriptionsaktivität des Promotors zelltypspezifisch regulieren (Franklin et al., 1991). So wäre denkbar, daß die Aktivität der im Promotorbereich von *Xmrk* identifizierten GC-Box (Baudler et al., 1997) durch ein weiteres Element, das sich in einer Region zwischen dem ersten Intron und Exon 15 befindet, gewebespezifisch reguliert wird. Einer Überexpression von *Xmrk* wird im Wildtyp durch die Aktion von Repressoren (=R) entgegengesteuert, die mit diesem Element kooperativ interagieren. Nach kreuzungsbedingter Eliminierung der R-Faktoren kommt es zur Überexpression des *Xmrk* Onkogens. Dieses Modell wäre mit den Hinweisen auf zwei gekoppelte R-Gene (siehe 5.1.4) vereinbar, die eine Suppressorfunktion ausüben. Erste Versuche zur Kartierung DNaseI-hypersensitiver Chromatinabschnitte, die häufig mit genregulatorischen Elementen assoziiert sind, innerhalb der Region zwischen dem ersten Intron und Exon 15, deuten auf die Präsenz solcher hypersensitiver Sequenzen und unterstützen die Hypothese eines genregulatorischen Elements.