

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Melanomentstehung bei Xiphophorus Rückkreuzungshybriden ist auf die Überexpression des Rezeptortyrosinkinasegens *Xmrk* zurückzuführen. Dessen Expression wird im parentalen Wildtyp durch einen autosomalen regulatorischen Locus, *R*, supprimiert. Über die molekulare Natur des Genprodukts von *R* liegen bislang keine Erkenntnisse vor. In Kopplungsanalysen konnte *R* der autosomalen Kopplungsgruppe V zugeordnet werden. Das dem *R*-Locus nächstgelegene Gen kodiert für die Carboxylesterase *ESI* und weist einen Abstand von 30 cM zu *R* auf. Eine Einordnung von *R* in die Genkarte, die aus weiteren Isoenzymgenloci zusammengesetzt ist, war bislang aufgrund einer Nicht-Linearität der Rekombinationswerte in Dreipunkt-Kopplungsanalysen nicht möglich.

Um zu überprüfen, ob die Tumor regulierende Funktion von *R* möglicherweise durch mehrere Gene ausgeübt wird, wurde die Kopplung zwischen *ESI* und *R* an Xiphophorus Hybriden der zweiten bis fünften Rückkreuzungsgenerationen ermittelt. Es zeigten sich schwankende Werte, die mit zunehmender Rückkreuzungsgeneration stärker von der bei der BC₁ ermittelten Rekombinationsfrequenz von 30% divergierten. Zudem waren ab der dritten Rückkreuzungsgeneration signifikante Abweichungen von der zu erwartenden 1:1 Aufspaltung gutartiger und bösartiger Tumorphänotypen zu beobachten. Diese Ergebnisse sind Hinweise dafür, daß es tatsächlich mehrere Faktoren im Xiphophorus Genom geben könnte, die die Expression des *Xmrk* Onkogens kontrollieren. Zur Bestätigung dieser Hypothese wird es in Zukunft von Bedeutung sein, höhere Rückkreuzungen zu analysieren. Im Fall mehrerer Regulatoren wäre zu erwarten, daß die Kopplung zwischen *ESI* und *R* mit steigenden Rückkreuzungen durch Auskreuzen von *R*-Faktoren verloren geht. Dadurch sollte sich auch das Verhältnis der beiden Tumorphänotypen zu mehr Nachkommen mit malignem Melanom verschieben. Weitere Hinweise auf die Hypothese mehrerer *R*-Gene ergab sich durch die Kartierung von *R* mit Hilfe molekularer Markersequenzen. In AP-PCR- und AFLP-Analysen von BC₁-Bastarden zwischen *X. maculatus* und *X. helleri* konnten insgesamt 12 polymorphe Markersequenzen identifiziert werden, die eindeutige Kopplung zu *ESI* aufweisen, jedoch nur zwei dieser Marker sind auch mit *R* gekoppelt. Zudem ist der Abstand zu *R* mit ca. 27 cM sehr groß. Bei der Erstellung einer Genkarte anhand der 12 Marker war es nicht möglich, *R* eine eindeutige Position in dieser Genkarte zuzuordnen. Die zwei mit *R* gekoppelten Marker liegen zu beiden Seiten von *ESI*, einer Positionierung von *R* zwischen diesen beiden Markern widersprechen jedoch statistisch signifikante Rekombinationswerte von *ESI* und den übrigen Markern zu *R*. So wäre denkbar, daß zumindest zwei *R*-Gene in dieser nicht näher einzugrenzenden Region liegen. Dies würde auch die bisherige Unmöglichkeit erklären, eng zu *R* gekoppelte Marker zu detektieren.

Die in der klassischen Kreuzung (*X. mac Sd/X. hell*) ermittelten Rekombinationswerte zwischen einem Kandidatengen, *CDKN2X*, und den Tumorphänotypen deuten nicht darauf hin, daß dieses Gen *R* darstellt, eine Funktion in einem polyfaktoriellen System wäre dagegen denkbar. Kopplungsanalysen konnten auch *XDNMT-1* als Kandidat für *R* ausschließen. Zukünftige differentielle Genexpressionsstudien zwischen gut- und bösartigen Geweben der Hybriden könnten einen völlig anderen Ansatzpunkt für eine Identifizierung aller beteiligten regulatorischen Faktoren bieten.

Durch Charakterisierung verschiedener *Xiphophorus* Mutanten wurden weitere Erkenntnisse über die Expressionsregulation des *Xmrk* Onkogens erwartet. So sollten ursächliche Faktoren für das unterschiedliche Potential verschiedener *ONC-Xmrk* Allele im Hinblick auf die Tumorinduktion und eine mögliche Beeinflussung der Ausbildung von Makromelanophorenmustern identifiziert werden. Für die Analyse mutanter *Xmrk* Allele wurde zunächst die bisher noch nicht bekannte genomische Organisation in der für die extrazelluläre Domäne des Rezeptors kodierenden Region der beiden geschlechtschromosomalen Wildtyp Allele aufgeklärt. Gegenüber dem nahe verwandten EGF-Rezeptorgen des Hühnchens weist *Xmrk* sowohl den Verlust eines Introns als auch die Reduktion um ein Exon auf. Die Untersuchung zweier "loss of function" (lof) Mutanten, denen sowohl Makromelanophoren als auch die Fähigkeit zur Tumorbildung fehlt, ergab in einem Fall einen Verlust der *Xmrk* Funktion durch die vollständige Deletion des Onkogenlocus. Dies bestätigt erneut, das *Xmrk* das für die Tumorauslösung ursächliche Gen darstellt. Eine Mutation in *ONC-Xmrk* der zweiten Lof-Mutante war nicht zu detektieren. Das könnte auf einen Defekt im Makromelanophorengen dieser Mutante hindeuten. Eine Untersuchung von Fischen mit auffälligen Makromelanophorenmustern bzw. Tumorphänotypen ergab, daß ein Großteil dieser Fische ein mutantes *Xmrk* Onkogen aufwies, das aus einer Rekombination zwischen den beiden wildtypischen X- und Y-chromosomalen *ONC-Xmrk* Allele resultierte. Interessanterweise konzentrieren sich die intragenischen Crossover Ereignisse auf die Region des Gens, die für die extrazelluläre Domäne des Rezeptors kodiert. Dies könnte auf einen Ort vermehrter Rekombination, einen sogenannten "Hot spot of recombination" hinweisen.

Mit Hilfe dieser Crossover Mutanten wurde es möglich, weitere bedeutende Gene in dieser Chromosomenregion relativ zu *ONC-Xmrk* zu kartieren. So liegt das Gen für den Makromelanophorenlocus (*Mdl*) 5' von *ONC-Xmrk*, der geschlechtsdeterminierende Locus (*SD*) und ein Gen, das für die Ausprägung der roten und gelben Farbmuster (*RY*) verantwortlich ist, konnten 3' von *ONC-Xmrk* lokalisiert werden. Die Reihenfolge der Gene auf dem Chromosom ist *Mdl* - 5' *ONC-Xmrk* 3' - *RY* - *SD*. *INV-Xmrk* liegt ebenfalls auf der 3'-Seite des Onkogens, die genaue Position konnte jedoch noch nicht ermittelt werden. Eine Analyse der Tumorphänotypen der Mutanten "Sr crossover 30⁸⁴B", "Sb" und "DrLi (mut)" gab Hinweise auf die Lokalisation eines genregulatorischen Elements. Dieses müßte zwischen den Crossover Punkten von "Sb" und "Sr crossover 30⁸⁴B" liegen. Die unterschiedlichen

Eigenschaften der mit dem Mdl-Muster Sr bzw. Sd assoziierten Tumoren in Bezug auf Malignität könnte durch ein solches Element, das nur in einem der beiden geschlechtschromosomalen Onkogenallele vorhanden bzw. funktionell aktiv ist, erklärt werden. Erste Versuche zur Kartierung DNaseI hypersensitiver Regionen an Chromatin der Tumorzelllinie PSM zeigten, daß in der identifizierten Region zwischen dem ersten Intron und Exon 15 von *ONC-Xmrk* aufgelockerte, einer Spaltung durch DNaseI zugängliche Regionen liegen, die auf genregulatorische Sequenzen hinweisen. Dies stimmt mit den strukturellen Daten aus der Analyse der Crossover Mutanten überein. Eine Eingrenzung dieser hypersensitiven Stellen und eine Untersuchung auf eine mögliche Beteiligung an der Expressionsregulation des Onkogens wird das Ziel zukünftiger Experimente sein.