



DIPLOMARBEIT

Titel der Diploarbeit

**Expression der Rezeptoren von
Fibroblastenwachstumsfaktoren und Etablierung von
IIIc-Spleißvarianten-Reportersystemen in
Weichteilsarkomzellen aus Mensch und Hund**

Verfasser

Victor Manuel Muñoz Pérez

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. Rer. nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:
Studienrichtung lt. Studienblatt:
Betreuer:

A 441
Genetik - Mikrobiologie
Ao. Univ. Prof. Dr. Pavel Kovarik

INHALTVERZEICHNIS

I	ZUSAMMENFASSUNG	6
II	ABSTRACT.....	8
III	EINLEITUNG	10
1	SARKOME.....	10
1.1	EPIDEMIOLOGIE DER KNOCHENSARKOME UND WEICHTEILSARKOME	11
1.1.1.	KNOCHENSARKOME	11
1.1.2.	WEICHTEILSARKOME.....	12
1.2	BIOLOGIE UND PATHOLOGIE DER KNOCHENSARKOME UND WEICHTEILSARKOME	13
1.2.1.	KNOCHENSARKOME	13
1.2.2.	WEICHTEILSARKOME.....	13
1.3.	TUMORGENETIK.....	17
1.3.1.	GENETISCHE CHARAKTERISTIKA IN DER TUMORENTSTEHUNG.....	17
1.3.2.	ENDOGENE FAKTOREN UND EXOGENE FAKTOREN (GENETISCHE FAKTOREN).....	19
1.4.	WACHSTUMSSIGNALE UND ZELLWACHSTUM IN DER TUMORENTSTEHUNG.....	21
2	FIBROBLASTWACHSTUMSFAKTOREN UND IHRE REZEPTOREN (FGFs/FGFR).....	23
2.1.	DIE FAMILIE DER FGF-REZEPTOREN (FGFR 1-4)	23
2.1.1.	GRUNDSTRUKTUR DER FGF-REZEPTOREN.....	24
2.1.2.	ISOFORMEN IIIb/IIIc DER FGF-REZEPTOREN	25
2.1.3.	AKTIVIERUNGSMECHANISMUS.....	27
2.1.4.	MUTATIONEN IN FGFRs.....	30
2.1.5.	FGF-REZEPTOR 1 (FGFR1)	31
2.1.5.1.	AUSWIRKUNGEN VON FGFR-1-MUTATIONEN	32
2.1.6.	FGF-REZEPTOR 2 (FGFR2)	34
2.1.6.1.	ASSOZIIERTE STÖRUNGEN UND ERKRANKUNGEN IN FGFR-2.....	34
2.1.7.	FGF-REZEPTOR 3 (FGFR3)	37
2.1.7.1.	MUTATIONEN IN FGFR-3.....	38

2.1.8.	DER FGF-REZEPTOR-4 (FGFR4).....	40
2.1.8.1.	MUTATIONEN IN FGFR-4.....	40
2.1.9.	THERAPEUTISCHES POTENZIAL VON FGF-REZEPTOREN.....	41
2.2.	FAMILIE DER FIBROBLASTWACHSTUMSFAKTOREN.....	41
2.2.1.	GRUNDSTRUKTUR DER FGFs	43
2.2.2.	FUNKTIONSMECHANISMUS DER FGF-FAMILIE	43
3	SPLEIßEN (SPLICING)	45
3.1.	FORMEN VON SPLICING	46
3.1.1.	SPLEIßEN IM SPLICESOSOM.....	46
3.1.2.	SELF-SPLICING ODER AUTOKATALYTISCHES SPLICING.....	47
3.1.3.	SPLICING DER tRNA	48
3.1.4.	ALTERNATIVES SPLICING VON mRNA	49
3.1.5.	TYPEN VON ALTERNATIVEM SPLICING	49
3.1.6.	SPLICING FAKTOREN: SR-PROTEINE UND ENHANCERS/SILENCERS	51
3.1.7.	EFFEKTE VON MUTATIONEN IN ALTERNATIVEM SPLICING.....	53
3.2.	MINIGENEN FÜR DIE STUDIE DES ALTERNATIVEN SPLICING	56
3.2.1.	FLUORESZIERENDE REPORTERSYSTEME (MINIGENE)	56
3.2.2.	GRUNDSTRUKTUR.....	57
3.2.3.	AUFBAU UND FUNKTION BICHROMATISCH FLUORESZIERENDER PLASMIDEN	60
3.2.3.1.	VEKTOR FRE5	60
3.2.3.2.	AUFBAU UND FUNKTION VON RG6.....	61
3.2.3.3.	AUFBAU UND FUNKTION VON pRGIIIc	63
4.	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	66
IV	MATERIALIEN UND METHODEN	67
1.	ZELLINIEN UND PLASMIDEN	67
1.2.	ANGEWENDETE VEKTOREN.....	68
1.3.	MATERIALLISTE.....	68

2	FGFR-GENEXPRESSION	71
	2.1. RNA-ISOLIERUNG	71
	2.2. DNA-ISOLIERUNG	72
	2.3. cDNA-SYNTHESE AUS total-RNA.....	73
	2.4. STANDARD POLYMERASE KETTEN REAKTION (PCR)	75
	2.5. REAL TIME POLYMERASE KETTEN REAKTION (RT-PCR).....	76
	2.6. POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (PAGE-GEL).....	78
3	GEWINNUNG DER DNA DES FLUORESZIERENDEN REPORTER-SYSTEMES pRGIIIc	79
	3.1. pRGIIIc.....	79
	3.2. VERMEHRUNG VON pRGIIIc.....	80
	3.3. TRANSFORMATION DER KOMPETENTEN ZELLEN.....	80
	3.4. DNA-EXTRAKTION.....	80
	3.5. HERSTELLUNG DES INSERTS	80
4	TRANSFEKTION DER STS-ZELLINIEN.....	81
	4.1. TRANFEKTION MTTELS CHEMISCHER METHODE.....	81
	4.2. PASSAGIEREN DER ZELLEN	81
	4.3. SELEKTION VON KLONEN.....	82
	4.3.1. NEUTRALROT	82
	4.3.2. FACS-ANALYSE (FACS=FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING).....	82
5	GFP-DETEKTION – WESTERN BLOT	82
	5.1. PROTEIN ISOLIERUNG.....	83
	5.2. QUANTIFIZIERUNG DER PROTEINKONZENTRATION: COOMASSIE.....	84
	5.3. HERSTELLUNG VON SDS-POLYACRYLAMID GEL ELEKTROPHORESE (PAGE).....	84
	5.4. WESTERN BLOT.....	85
	5.5. PONCEAU S FÄRBUNG	86
	5.6. IMMUNOLOGISCHE DETEKTION VON PROTEINEN	86

V	ERGEBNISSE	88
1	EXPRESSION DER FGF-REZEPTOREN (1-5) UND IHRER VARIANTEN IN STS-ZELLINIEN AUS MENSCH UND HUND MITTELS RT-PCR	88
	1.1. ERGEBNISSE DER EXPRESSION DER FGFR (1-5) UND IHRER VARIANTEN (IIIb/IIIc) DURCH RT- PCR	89
	1.2. GEMESSENE EXPRESSIONSWERTE ALLER FGF-REZEPTOREN UND VARIANTEN (Ct-VALUES) UND DIE QUANTITATIVE EXPRESSION DER FGFR 1-5	91
2	EXPRESSION VON pRGIIIc IN STS-ZELLINIEN	97
	2.1. MIKROSKOPISCHE ANALYSE	97
	2.1.1. TRANSFEKTION IN HTB92 UND HTB94	98
	2.1.2. FESTSTELLUNG DER LETALDOSIS DURCH NEUTRALROT	103
	2.2. TRANSFEKTION VON HTB82, HTB91, UND SW480	104
	2.3. NACHWEIS VON pRGIIIc IM WESTERN BLOT	111
	2.3.1. GESAMTZELLEXTRAKT VON HTB82	111
	2.3.2. GESAMTZELLEXTRAKT VON HTB91	112
	2.3.3. GESAMTZELLEXTRAKT VON SW480	113
	2.4. NACHWEIS VON pRGIIIc AUF RNA-EBENE	114
	2.4.1. NACHWEIS VON GFP MITTELS PCR	116
	2.4.2. NACHWEIS DER EXPRESSION VON pRGIIIc IN HTB91 MITTELS RT-PCR	117
	2.5. GEMESSENE EXPRESSIONSWERTE VON pRGIIIc DURCH RT-PCR	118
3	SUCHE NACH ORTHO- UND PARALOGEN SEQUENZEN DES FGFR2 UND SPLEIßVARIANTEN IIIb/IIIc	121
	3.1. FESTSTELLUNG DER EXON IIIc-SEQUENZ DES FGFR2 DER RATTE VON pRGIIIc	121
	3.2. IN SILICO ANALYSE DER EXON IIIb/IIIc DER RATTE DURCH DIE DES MENSCHEN	122
VI	DISKUSSION	125
VII	LITERATURVERZEICHNIS	136
VIII	VERZEICHNIS DER ANHÄNGE	145
IX	ANHÄNGE 1-8	146
X	LEBENS LAUF	166

I ZUSAMMENFASSUNG

Weichteilsarkome (STS) stellen eine sehr inhomogene Krankheitsgruppe dar und sie sind bösartige Neoplasien der Weichteile des Körpers. Sie repräsentieren 8% der Krebserkrankungen vor allem bei Kindern. Die Rezeptoren der Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFR) sind notwendige Elemente für die verschiedenen Signalübertragungswege, welche in der Proliferation, Differenzierung, Migration und Metabolismus von Zellen involviert sind. Bis heute sind 5 FGF-Rezeptoren charakterisiert, die aufgrund verschiedener spezifischer Spleißvorgänge eine weit größere Zahl an Rezeptormolekülen erzeugen, die spezifische physiologische Funktionen haben. Die Untersuchung dieser Spleißvorgänge ist essentieller Teil der Erforschung der physiologischen Funktion von FGF-Rezeptoren. pRGIIIc ist ein fluoreszierendes Reporterplasmid, das für solche Untersuchungen geeignet ist. Abhängig von der Inklusion oder Exklusion des IIIc Exons von FGFR2 produziert es 2 alternative fluoreszierende Proteine.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte als erste Aufgabe die Expression der FGF-Rezeptoren (1-5) und ihrer Varianten IIIb/IIIc in den verschiedenen STS Zelllinien untersucht werden. In allen untersuchten Zelllinien sind die FGF-Rezeptoren exprimiert, mit Ausnahme von FCHT-Zellen und den Wi38-Zellen, in denen keine Produkte für FGF-Rezeptor 2 und seine Varianten IIIb/IIIc ermittelt wurden.

Als zweite Aufgabe wurden die Tumorzelllinien mit dem Plasmid pRGIIIc transfektiert, um Information über die Funktionalität dieses fluoreszierenden Konstrukts (pRGIIIc) zu erhalten, das zukünftig für Untersuchungen der Epithelial-Mesenchymal-Transition eingesetzt werden soll. Daher wurden zwei Zelllinien verwendet SW480 (Adenokarzinom des Darm, epithelial) und MBSa (Weichteilsarkomes des Hundes; mesenchymal) Mittels PCR, RT-PCR und Western Blot wurde die Expression von pRGIIIc analysiert. Auf RNA-Ebene konnten beide spezifischen Produkte von pRGIIIc in den Zelllinien HTB91, SW480 und MBSa identifiziert werden, was zeigt, dass die Zellen das Exons IIIc sowohl inkludieren als auch skippen können. Auf Protein-Ebene konnte nur das GFP-Produkt von pRGIIIc nachgewiesen werden, das Inklusion des Exons IIIc anzeigt. Das Proteinniveau ist in den Zelllinien SW480 und HTB91 niedrig und in der Zelllinie HTB82 nicht nachweisbar.

Als dritte Aufgabe wurde eine in Silico-Analyse mit der IIIb- und IIIc-Sequenz des FGF-Rezeptors 2 (FGFR2) des Menschen und der Ratte durchgeführt. Laut Hersteller des Plasmides pRGIIIc stammt die Exon-IIIc Sequenz samt umgebender Introns von der Ratte. Das Ziel dieses Versuches war es, nach Ähnlichkeiten zwischen den Exon Sequenzen von beiden Spezies und der experimentel erhaltenen Sequenz von pRGIIIc zu suchen. Bei der Untersuchung wurden Modifikationen innerhalb der Exon-IIIc Sequenz von pRGIIIc identifiziert, die künstlich eingebaut wurden. Die Ergebnisse der Sequenzvergleiche lokalisierten auch die funktionellen Teile von pRGIIIc, wie zum Beispiel die Sequenzen für DsRed, EGFP und Exon-IIIc auf pRGIIIc. Diese Analyse ist die Basis für die Herstellung weiterer Reportersysteme mit einem möglichen Austausch von ortho- und paralogen Sequenzen der Spleißvarianten mit Exon-IIIb/IIIc Sequenzen.

Zusammenfassend wurde in im Rahmen dieser Arbeit ein Überblick über die Expression der FGF-Rezeptoren und ihre Varianten IIIb/IIIc in Weichteilsarkomen gegeben.

Die Versuche mit den Reportern dienten dafür, um einerseits die Funktionalität des Reporters pRGIIIc in STS-Zelllinien besser zu charakterisieren und andererseits die epithelial-mesenchymal-Transition in den STS-Zelllinien mit dieser nicht invasiven Methode zu beobachten.

II ABSTRACT

Soft Tissue Sarcomas (STSs) represent a heterogenous group of malignant tumors of the soft connective tissue of the body. They represent 8% of the cancers affecting children. The fibroblast growth factor receptors (FGFRs) are necessary elements for the different pathways of signal transduction which are involved in the proliferation, differentiation, migration and metabolism of cells. There are 5 FGF-receptors genes in the human genome that code for a variety of receptor proteins by stringently regulated mechanisms of alternative splicing. The analysis of such splicing events is an essential part of elucidating the roles of FGFR-signaling in physiological processes. pRGIIIc is one of the tools that can be used in such studies. It is a fluorescent reporter plasmid; this is able to express two different fluorescent proteins depending on inclusion or exclusion of the IIIc exon of FGFR2 of the rat.

Within the framework of this diploma thesis the first task was analysis of the expression of the FGF-Receptors 1-5 und their IIIb/IIIc variants in the different STS cell lines. In all examined cell lines are the FGF receptors expressed, with the exception of FCHT cells and the Wi38 cells, in which no products were determined for FGF receptor 2 and its variants IIIb/IIIc.

The second task was transfection of the pRGIIIc plasmid into tumor cell lines in order to get information about the functionality of this reporter construct that will be used in future projects investigating FGFR2 in epithelial-mesenchymal-transition (EMT/MET). Therefore, two cell lines were used: SW480 (adenocarcinoma of the colon; epithelial origin) and MBSa (STS-cell line of the dog; mesenchymal origin) were transfected. Expression from pRGIIIc was determined by means of PCR, RT-PCR and Western Blot detecting the two specific products from pRGIIIc. Both mRNAs could be identified in the cell lines HTB91, SW480 and MBSa indicating that the cells have both included and skipped exon IIIc from pRGIIIc.

At protein-level only the product of GFP from pRGIIIc could be proved. The GFP-product from pRGIIIc is associated with the inclusion of the Exon IIIc. The results showed a low production of the protein GFP in the transfected cell lines SW480 and HTB91, with the exception of the cell line HTB82, in which the product of GFP could not be proved.

The third task was an *in silico* analysis with the IIIb and IIIc sequence of the FGFR 2 carried out with species human and rat. The exon IIIc sequence together with the surrounding introns of the plasmid pRGIIIc is of rat origin according to the manufacturer. The aim of this experiment was to look for similarities between the exon sequences of both species and the experimental sequence obtained from pRGIIIc. In the investigation, artificially added modifications were identified within the exon IIIc sequence of pRGIIIc. The results of sequence comparisons also localized the functional parts of pRGIIIc, such as the sequences for fluorescent reporters DsRed and EGFP, and exon IIIc on pRGIIIc. This analysis is the basis for the preparation of other reporter systems with a possible exchange of ortho-and paralogous sequences of Exon-IIIb/IIIc sequences.

In summary, this work provides an overview of the expression of FGFRs and their variants IIIb/IIIc in STS. These first results with the reporter system demonstrated the functionality of the plasmid pRGIIIc in STS cell lines of human and canine origin. Such non-invasive system may allow observing plasticity of the epithelial-mesenchymal transition in the STS cell lines.

III EINLEITUNG

1. Sarkome

Die Bezeichnung Sarkom bezieht sich auf einen Tumor, der aus Bindegeweben (Mesenchym) entstanden ist. Das griechische Wort „Sarkos“ bedeutet Fleisch und Sarkom bedeutet „fleischartige Substanz“. Das Sarkom kann auch frühzeitig in die Blutgefäße metastasieren. Karzinome, Erkrankungen des Knochenmarks und des Blutes (wie Lymphom und Leukämie) und Sarkome gehören in die Gruppe der malignen Krebserkrankungen. Sarkome kommen viel seltener vor als Karzinome und machen nur 1% aller malignen Erkrankungen beim Menschen aus. Zu den Ursprungsgeweben der Sarkome gehören Bindegewebe, Fettgewebe, Knorpel, Knochen, Muskel. Nach der neuen WHO-Klassifikation (*World Health Organization, WHO*) werden Sarkome in circa 100 verschiedene Entitäten unterteilt, die nach ihren molekulargenetischen Veränderungen, ihrer Herkunft, ihrer Biologie und Morphologie unterschieden werden. Die Klassifizierung eines Sarkoms in die zutreffende diagnostische Gruppe hat eine wichtige Bedeutung für weitere Behandlung, da einzelne Entitäten ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Rückfällen und Metastasen präsentieren (Borden, 2003;Skubitz, 2007) .

Die heterogene Gruppe der Sarkome kann in zwei Kategorien gruppiert werden und zwar in „**Weichteilsarkome**“ (eng.: Soft Tissue Sarcoma=STS), welche auch als malignen Fibro-histiozytome, Liposarkome, Leiomyosarkome, Synovial-Sarkome, protuberante Dermatofibrosarkome, Angiosarkome, Kaposi-.Sarkome, gastrointestinalen Stromatumoren, aggressive Fibromatosis oder Desmoidtumoren, Rhabdomyosarkome, etc. bekannt sind und in die „**primären Knochensarkome**“, welche in Osteosarkome, Ewing-Sarkome, Giant-Cell-Tumore und Chondriosarkome unterteilt werden. Jede dieser Tumorarten hat verschiedenen Verlauf und Behandlungsmodus (Skubitz, 2007).

1.1. Epidemiologie der Knochensarkome und Weichteilsarkome

1.1.1. Knochensarkome

Die Inzidenz der Knochentumoren liegt bei etwa 0,6/100.000. Damit stellen sie 4,6% der malignen Erkrankungen im Kindesalter dar und sind in der Jugend und im jungen Erwachsenenalter besonders häufig. Sie gehören zu den Tumoren mit dem höchsten Altersmedian (unter 15-Jährigen). Die angegebenen Erkrankungsdaten beruhen auf Zahlen der 5 größten Register, wobei Unterschiede im Geschlechtsverhältnis zu beobachten sind. Im Vergleich der Register von Kanada und Australien mit den anderen drei Registern ist der Buben-Anteil höher, hingegen im britischen Bericht sind mehr Mädchen als Jungen erkrankt (Kaatsch, 2010) (Gadner 2006).

Die häufigsten Knochentumore sind die **Osteosarkome** (52,9 %), die in Kindern gar nicht auftreten. Das zweithäufigste Knochensarkom ist das **Ewing-Sarkom** (44,6%). Ganz selten sind die **Chondrosarkome** zu finden (in Deutschland circa ein Kind pro Jahr). Osteosarkome treten überwiegend bei Mädchen und die Ewing-Sarkome häufiger bei Jungen als bei Mädchen auf. Die Inzidenzen des Ewing-Sarkoms liegen zwischen 0,04 und 0,4/100.000 und für das Osteosarkom zwischen 0,1 und 0,4/100.000.

Etwa 67% aller Patienten, die Knochentumor haben, überleben länger als 5 Jahre. Man findet zwischen Ewing-Sarkom und Osteosarkom praktisch keinen erkennbaren Unterschied. Trotzdem die Prognose ist von der Lokalisierung des Tumors abhängig. Anfang der 90er ist die Prognose von beiden Entitäten (Besonders Ewing-Sarkom) verbessert worden. Bei der Prognose des Osteosarkoms in Europa Ende der 80er liegt Deutschland im europäischen Durchschnitt und beim Ewing-Sarkom praktisch darüber.

Etwa 67% aller Patienten, die Knochentumor haben, überleben länger als 5 Jahre. Man findet in dieser Hinsicht zwischen Ewing-Sarkom und Osteosarkom praktisch keinen Unterschied. Die Prognose ist jedoch von der Lokalisierung des Tumors abhängig. Seit Anfang der 90er ist die Prognose von beiden Entitäten (Besonders Ewing-Sarkom) verbessert worden (Schuz, 2002) (Gadner 2006).

1.1.2. Weichteilsarkome

Auch die Weichteilsarkome stellen eine sehr inhomogene Krankheitsgruppe dar. Bei unter 15-Jährigen treten Weichteilsarkome mit einer Inzidenz von 0,9/100.000 auf. Das Rhabdomyosarkom ist die häufigste Erkrankung (57,1%) dieser Gruppe. Alle 5 großen Register geben Häufigkeiten von 0,5/100.000 an, wobei die Inzidenz für das Rhabdomyosarkom in Deutschland mit etwa 0,5/100.000 in vorderem Platz im Vergleich mit anderen Ländern (Spannweite: 0,2 und 0,6/100.000) liegt. Bei Hunden kommen sie mit einer 12 bis 33-fach höheren Inzidenz vor (Steinhoff, H.A. 2009)

Unter den restlichen Weichteilsarkomen sind Fibrosarkome und periphere primitive neuroektodermale Tumoren (pPNET) mit jeweils 8% und Synovialsarkome und extra-ossäre Ewing-Sarkome mit jeweils 4,3% der Weichteilsarkome die wichtigsten Vertreter. Von Weichteilsarkomen sind Jungen im Verhältnis 1,2 zu 1 häufiger als Mädchen betroffen, und beim Rhabdomyosarkom ist dies etwas ausgeprägter. Weichteilsarkome und speziell Rhabdomyosarkome treten bereits im Vorschulalter auf.

Etwa 61% aller Patienten mit Weichteiltumoren überleben länger als 5 Jahre. Die Prognose hat sich seit Ende der 80er-Jahre in Deutschland nicht verändert. Etwas über dem europäischen Durchschnitt sind die Heilungserfolge in USA besser (Kaatsch, 2010, Schuz, 2002) (Gadner 2006).

1.2. Biologie und Pathologie der Knochensarkome und Weichteilsarkome

1.2.1. Knochensarkome

In der Regel sind die histologischen Charakteristika eines Knochentumors nicht ausreichend, um das biologische Verhalten des Knochentumors abzuklären. Trotzdem beruht die Klassifikation von Knochengeschwülsten durch die WHO auf histologischen Untersuchungsmethoden (Rytwinski, 2000) (Schajowicz, 1995).

Also Knochentumoren sind prinzipiell in zwei Kategorien eingeteilt:

- I. **Primäre Knochentumoren:** Knochengewebe (Osteoklasten oder Osteoblasten, Knorpel) sind die Ursprungsquelle. Charakteristisch besitzen sie Prädeliktionsort und –alter. Es gibt auch Geschlechtsunterschied und spezielle Symptomatik. Ihre Vorkommen ist die Zone des Längenwachstums (Metaphyse und Epiphysenfuge). Mit Ausnahme des Ewing-Sarkoms, dessen Lokalisierung die Diaphyse ist. Die meisten Tumoren wachsen destruktiv, deswegen werden sie nach der Lodwick-Klassifikation **radiologisch** eingeteilt. Röntgenbilder stellen die Makroskopie der Knochentumoren dar. Endungen: -chondrom, -osteom und –blastom sind für gutartig und nur –sarkom für bösartig.
- II. **Sekundäre Knochentumoren(Metastasen).** Es handelt sich um Tochtergeschwülste anderer bösartiger Tumorarten im Knochen. Charakteristisch von Lungenkrebs, Nierenkrebs, Brustkrebs, Schilddrüsenkrebs und Prostatakrebs ist die Tendenz, in den Knochen abzusiedeln (Schajowicz, 1995) (Freyschmidt 2003).

1.2.2. Weichteilsarkome

Weichteilsarkome sind bösartige Neoplasien der Weichteile des Körpers. Zu den Weichteilen zählen Bindegewebe, Lymphgefäße, Blutgefäße, Muskeln, Fettgewebe, Sehnen und Gelenke. Wegen ihrer phänotypischen Gleichartigkeit mit normalem Gewebe werden **Weichteilsarkome** histogenetisch klassifiziert. Aber die anatomisch-pathologische Einstufung erfolgt zuerst morphologisch. Zurzeit werden Weichteilsarkome nach dem TNM-Staging System (Sehe Tab. 1.2.2.1.) klassifiziert.

Tab. 1.2.2.1. Klassifikation der Weichgewebssarkome und Subtypen

<i>Histologischer Typ</i>	<i>Subtypen</i>
Alveoläres Weichteilsarkom	0
Angiosarkom (a)	Angiosarkom Lymphangiosarkom
Epitheloides Sarkom	0
Extraskellettales Chondrosarkom	0
Extraskellettales Osteosarkom	0
Extraskellettales Ewing-Sarkom, PNET	0
Fibrosarkom	0
Leimyosarkom	Leiomyosarkom Epitheloides Leiomyosarkom
Liposarkom	Lipomartig Myoxid Rundzellig Pleomorph Differenziert
Undifferenziertes pleomorphes Sarkom (Früher: Malignes fibröses Histiozytom)	Ploeomorph
Solitäre fibröse Tumoren (SFT, früher Malignes Hämangioperizytom)	0
Malignes Mesenchymom	0
Rhabdomyosarkom	Embryonal Botyroides Alveolär Pleomorph
Synovialsarkom	Monophasisch Biphasisch

(a) Wegen des unsicheren Charakters dieser Tumoren werden Angiosarkomen in der neuen TNM-Klassifikation nicht mehr einbezogen. Gleichfalls nicht zu den Sarkomen gerechnet werden Desmoide, das Dermatoidfibrosarkoma protuberans, maligne Nervenscheidentumoren und das Kaposi-Sarkom

(Siewert. 2010)

TNM-Klassifikation ist eine Facettenklassifikation aus der Medizin, die der Stadieneinteilung von malignen Tumoren dient. (TNM Abkürzung für T=Tumor; N=Nodes /Lymphknoten; M=Metastasen: die wichtigsten Kategorien des TNM-Systems) (Rechl, 2006) (Brennan, 2008).

Wegen der oben beschriebenen Schwierigkeiten bei der Klassifizierung spielt die Molekularbiologie eine immer wichtigere Rolle bei der Abgrenzung zwischen den existenten Formen der Weichteilsarkome. Mit der Hilfe von Daten, die in den letzten Jahren gesammelt wurden, über genetische Translokationen bei einigen Tumorentitäten ist eine fast sichere Zuordnung möglich geworden. Sowie der Fall vom Klarzellsarkom, das bisher immer von Melanom abgegrenzt worden war, und durch die in diesen Tumoren nachweisbare charakteristische Translokation t(12;22)(q13;q12) als Subtyp des Melanoms zu definieren ist (Sehe Tab. 1.2.2.2.). Durch immunhistologische, morphologische und ultrastrukturelle Ähnlichkeiten wird das Klarzellsarkom auch als „Melanom der Weichteile“ bezeichnet (Helman, 2003).

Tab. 1.2.2.2. Molekulargenetische Befunde von Weichgewebssarkomen		
<i>Histologischer Tumortyp</i>	<i>Translokation</i>	<i>Häufigkeit(%)</i>
Ewig-Sarkom/PNET	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(1,16)(q11-25;q11-24) t(7;22)(p22;q12) t(2;22)(q33;q12) t(17;22)(q12;q12)	85 5 bis 10 11
Klarzellsarkom	t(12;22)(q13;q12)	> 65
Extraskellettales myoxides Chondrosarkom	t(9;22)(q22;q12) t(9;17)(q22;q11)	75
Myoxides und runzelliges Liposarkom	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q11-12)	75
Synoviales Sarkom	t(X;18)(p11.2;q11.2)	>90
Aveoläres Rhabdomyosarkom	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)	68 14

Aber durch diese Genanalysetechnik lässt sich in Weichteilsarkomen eine verstärkte Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren nachweisen wie z. B. EGF, TGFs, FGFs und ihre Rezeptoren. Die Expression der einzelnen Entitäten ist unterschiedlich stark markiert, was zu einem Zusammenhang zwischen Tumorgradig, Prognose und Wachstumsfaktorexpression führt (Helman, 2003) (Siewert 2010)

In der Tabelle 1.2.2.3. sind die häufigsten histologischen Entitäten im Kindesalter zu finden.

Tabelle 1.2.2.3 Entitätsklassifizierung nach ihrer Manifestationsfrequenz im Kindesalter		
Entität	Abkürzung	Häufigkeit in (%)
Leiomyosarkom		(ca. 2%)
Fibrosarkome		(ca. 3%)
Neurofibrosarkome		4%
Synovialsarkome	(SS)	7%
periphere neuroektodermal Tumoren	(PNET)	(ca. 8%)
extraossäre Ewing-Sarkome	(EES)	8%
Rhabdomyosarkome	(RMS)	61%

Zu der Gruppe der chemotherapie-empfindlichen Weichteilsarkome zählen Rhabdomyosarkome, extraossäre Ewing-Sarkome, periphere neuroektodermale Tumoren und Synovial-Sarkome. Aus diesem Grund werden sie in den CWS-Protokollen (Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe=CWS) als „RMS-artige Tumoren“ bezeichnet und ähnlich behandelt. Prinzipiell ist eine Kombination von zytologischen Merkmalen, dem immun-histochemischen Nachweis unterschiedlicher Antigene sowie Wachstumsart die Basis für die morphologische Diagnose des Rhabdomyosarkoms. Im Allgemeinen wird heute MyoD1 oder/und Myogenin am häufigsten zum Nachweis angewendet. Nach der internationalen Klassifizierung des Rhabdomyosarkoms gibt es 2 Typen *nach (Newton, 1995)*:

alveolär (noch eine existente Variante: solide Alveolär) und *embryonal* (zwei existente Varianten: spindelzellig und botryoid)

Nach unterschiedlicher Prognose werden diese in 3 Untergruppen klassifiziert:

- I. **Rhabdomyosarkome mit günstiger Prognose:** Zu dieser Subgruppe zählt der spindelzellige und botryoide Typ des embryonalen Rhabdomyosarkoms. Der botryoide Typ repräsentiert 7% aller Rhabdomyosarkome, und wächst vor allem in Hohlorganen (wie Harnblase, Vagina, Gallengänge, Gehörgang, Nase). Ein charakteristisches Merkmal dieses Typen ist eine polypoide, traubenartige Vorwölbung in das Lumen. Mit

etwa 3-8% aller Rhabdomyosarkome ist der Spindelzelltyp vertreten, der vor allem paratestikulär vorkommt und histologisch mehr als 75% Spindelzellen aufweist.

II. *Rhabdomyosarkome mit intermediärer Prognose:* Zu dieser Subgruppe gehören nur „klassische embryonale Rhabdomyosarkome“.

III. *Rhabdomyosarkome mit ungünstiger Prognose:* Zu dieser Subgruppe zählen alveoläre Rhabdomyosarkome (RMA) inklusiv der „soliden Variante“. (Koscielniak, 1999)(Klingebl, 1998)(Klingebl, 2008)

Ein charakteristisches Zeichen des embryonalen Rhabdomyosarkoms ist der so genannte Verlust von Heterogenität (loss of heterozygosity) im 11p15-Locus. Es handelt sich dabei um den Verlust des maternalen Genmaterials, wobei eine Disomie des väterlichen Genmaterials auftritt. Diese Veränderung führt dann entweder zum Verlust eines Tumorsuppressorgenes oder zur Überexpression eines Wachstumsgenes. Noch eine molekulargenetische Modifikation ist die Mutation des Onkogens RAS (Kratz, 2007).

Ein Marker für das alveoläre Rhabdomyosarkom ist eine charakteristische Translokation zwischen dem langen Arm des Chromosoms 13 und dem langem Arm des Chromosoms 1 bzw. 2 [t(1; 13) oder t(2; 13) (q35; q14)]. Auf molekulargenetisches Niveau entspricht dieser Translokation das Rearrangement des FKHR-Gens und des PAX3- bzw. PAX7-Gens. Dieses Rearrangement führt zur Aktivierung der Transkription von Genen, die an der Entwicklung von abnormalen Phänotypen beteiligt sind. Der Vorteil der Verwendung dieser Kenntnis dieser Translokation ermöglicht sowohl den Nachweis auf RT-PCR als auch die Identifizierung genetischer Marker, mit denen minimale genetische bzw. residuelle Erkrankungen (MMT und MRD) nachgewiesen werden können (Kratz, 2007) (Rübgen 2007).

1.3. Tumorgenetik

1.3.1. Genetische Charakteristika in der Tumorentstehung

Das Zellschicksal basiert auf ein Gleichgewicht von Zellteilung, Zellalterung, Zelldifferenzierung und Zelltod. Wird aber eines dieser Prozesse falsch reguliert, kann es zur malignen Entartung führen. Krebszellen lassen sich durch ein gestörtes Verhältnis von Proliferation und Absterben, durch eine erhöhte Mobilität (Metastasebildung) und durch eine

modifizierte Zell-Zellkommunikation auszeichnen. Sie haben auch die Tendenz, der Immunüberwachung zu entgehen. Alle Veränderungen, die die maligne Entartung von Zellen auslösen, sind Defekte von Genen. Die Genprodukte sind entweder in der intrazellulären Signalübertragung der Membran zum Zellkern oder in der Genregulation, oder in der internen Zellkommunikation bei Wachstumsfaktoren oder –Rezeptoren involviert. Die Gendeffekte sind in der Pathogenese maligner Tumoren durch zwei Mechanismen charakterisiert:

1. **Mechanismus**: basiert auf strukturellen Veränderungen eines normalen Gens (Protoonkogen), die zur Entwicklung eines Gens mit modifizierten Eigenschaften (Onkogen) führt. Onkoproteine sind in der Lage, die Zellproliferation, das Überleben der Zellen und Differenzierung positiv zu steuern (Im Sinne einer Stimulation). Die Aktivierung eines Onkogens kann entweder *direkt* durch Veränderung eines Gens oder *indirekt* durch Veränderung eines funktionell vorgeschalteten Gens zur Überproduktion des Onkoproteins erfolgen.

2. **Mechanismus**: beruht auf dem Verlust oder Inaktivierung eines Gens, dessen Protein entweder einen hemmenden Effekt auf das Zellwachstum oder eine Reparatur-/Kontrollfunktion bei DNA-Schäden ausübt. Man nennt diese Gene „*Tumorsuppressorgene oder Antionkogene*“. Der Funktionsverlust von Reparaturgenen führt zur Entstehung von DNA-Schäden in Protoonkogenen oder Antionkogenen, die nicht detektiert und beseitigt werden, weswegen es zur Entwicklung von malignen Zellphänotypen kommt.

Keiner der bekannten Gendefekte (***Mutationen***) ist allein in der Lage, Tumoren auszulösen. Die Tumorigenese basiert auf mehrere genetische Veränderungen. Beobachtungen in manchen Krebserkrankungen zeigen den Übergängen vom normalen zum präneoplastischen Phänotyp und dem zunehmenden Grad zur Malignität durch eine Akkumulation von Mutationen. Mutationen können als Folge von Fehlern in der DNA-Replikation oder durch Verteilungsfehler manifestiert werden. ***Mismatch-Reparaturgene*** ist ein Zellmechanismus, der die Reparatur und Erkennung von DNA-Schäden ermöglicht. Irreparable DNA-Schäden in der Zelle lösen einen Signalweg aus, der zur ***Apoptose*** führt. Fehler in diesen Reparatur- und Kontrollmechanismen wirken bei der Tumorigenese mit (Dewhirst, 2003; Demetri, 2002; Schartl, 1997) (Gutjahr 2004).

Im folgenden Teil der DA werden teilweise die verschiedenen endogenen und exogenen Faktoren beschrieben, die mit der Tumorentstehung/Gendefekte von Sarkomen (STS und Knochensarkomen) assoziiert sind. Die genaue Ursache des Tumorwachstums ist bisher unbekannt, allerdings weiß man heute, dass bestimmte Faktoren das Tumorwachstum fördern können.

1.3.2. Endogene (angeborene = hereditäre) und Exogene Faktoren (gentoxische Faktoren)

Manche hereditäre Syndrome und Gendefekte sind mit einem erhöhten Tumorrisiko verbunden. Aber die Tumormanifestation kann bereits im Kindes- und Jugendalter auftreten. Beispiele für hereditäre Faktoren, die mit einem erhöhtem Tumorrisiko im Kindesalter assoziiert sind, wären Fanconi-Anämie, Ataxia teleangiectasia, Lymphome, Neurofibromatose, Li-Fraumeni-Syndrom. Solche prädisponierenden Faktoren sind heterogen und zeichnen sich durch eine Instabilität des Genoms mit erhöhter Anfälligkeit aus. Solche Syndrome könne auch Ursache für die Entwicklung der Weichteilsarkome sein, wie zum Beispiel die seltenen genetische Syndrome (Li-Fraumeni syndrom, Neurofibromatosis, Werner Syndrom, bilateral Retinoblastom).

Über die genetischen Faktoren wird auch noch immer für gutartige Knochentumoren diskutiert. Trotzdem sie sind nur für einzelne auftretende benigne Tumorarten bewiesen.

Das Geburtsgewicht ist auch ein potenzieller, nur beschränkt genetisch bedingter Tumorrisikofaktor. Bei Kindern unter zwei Jahren ist ein hohes Geburtsgewicht (>4.000 gr) mit einem erhöhten Leukämierisiko assoziiert. Die biologische Ursache ist ein hoher Spiegel des „Insulin like growth factor“ (IGF-1) im Kind und als Konsequenz entsteht ein Stresseffekt, der auf die vorhandene, präleukämische Zellen ausgeübt wird (Haro-Garcia, 1998; Fajardo-Gutierrez, 1998; Dippold, 1993) (Gutjahr 2004).

Aber es gibt auch andere gentoxischen Faktoren unter allem *chemische Substanzen, ionisierende Strahlen, infektiöse Faktoren, Rauchen und Alkoholkonsum der Eltern.*

Typischerweise sind die bösartigen Tumoren im Kindes- und Jugendalters biologisch und ätiologisch heterogen. Sie entwickeln sich vorwiegend auf Grund sequenziell erworbener

(*somatische*) Genmutationen. Verschiedene **exogenen Faktoren** spielen eine Rolle in der Entwicklung von tumorigenen DNA-Modifikationen. Sowohl der Zeitpunkt der Einwirkung (intrauterin bzw. postnatal, präkonzeptionell) als auch das Ausmaß der Exposition ist eine wichtige Determinante für das Risiko. Von allen chemischen Verbindungen mit einem mutagenen (karzinogenen) Effekt sind die in der Tumorthherapie angewendeten Zytostatika zu erwähnen, deren mutagene Effekte die Entwicklung von Sekundärmalignomen fördern (Dippold, 1993) (Gutjahr 2004).

Im Allgemein treten die meisten Sarkome spontan auf. Es gibt allerdings identifizierte Risikofaktoren, die ihre Inzidenz erhöhen, wie zum Beispiel die Strahlentherapie für Brust- und Gebärmutterhalskrebs sowie auch Lymphomen. Aber auch die Exposition mit Chemikalien inkrementiert das Risiko zur Bildung von hepatischen Angiosarkomen wie zum Beispiel Vinylchloride (Mortalität von 1658 Männern/Betroffenen wurde analysiert. Relative Risks (RRs) und 95% confidence intervals (CLs) (RR=1.55; 95% CI=1.03-2.35; davon 229 Tote) Konzentration unbekannt (Pirastu, 2003)

Das Fetale Alkohol- und Hydantoin-Syndrom, sowie intrauterine Strahlenexposition und der Missbrauch von Marihuana und Kokain durch die Eltern sind mit einem erhöhten Risiko für das Rhabdomyosarkom (RMS) assoziiert (Hennekam, 2003) (Rübben 2009).

Etwa 2-4% aller Knochensarkome entstehen durch eine Bestrahlung am Ort des Tumors, wobei sich in Tierexperimenten eine Abhängigkeit der direkten angewendeten Strahlendosis und der Entstehung eines radiogenen Sarkoms auszeichnet. Die Prävalenz von strahlen-induzierten Sarkomen ist 0.17-0.21%. Über weitere **ätiologische Faktoren**, die mit der Entstehung von Knochensarkomen assoziiert sind, gibt es keine exakten Informationen. Auch durch eine chronische Fistel kann es bei Osteomyelitis zur Entwicklung von malignen Tumoren kommen (Assenmacher, 1999).

Aber viele Entitäten sind auch mit zytogenetischen Störungen assoziiert. Zum Beispiel Weichteilsarkome kommen gehäuft in hereditären Mutationen des p53-Tumorsuppressor-Gens vor. Die Ätiologie und Pathogenese bleiben in der Mehrzahl der Fälle ungeklärt. Nur wenige Tumorentitäten sind mit Primärerkrankungen assoziiert und nachgewiesen, z.B. das gehäufte Vorkommen maligner Schwanome bei Neurofibromatose Typ1 mit der Chromosomenanomalie

17q11.2. Weitere potenzielle Faktoren sind Chemikalien wie Noxen, Phenoxy-Herbizide und Dioxin und die Einwirkung von radioaktiver Strahlung (Clifford, C. 1993) (Riboli, E. 2003) (Pfeifer 2006).

1.4. Wachstumssignale und Zellwachstum in der Tumorentstehung

Zellen sind von Wachstumssignalen abhängig, um in den Zellzyklus einzutreten. Zur Zellzyklusprogression dienen Wachstumssignalen als extrazelluläre an Rezeptoren bindende Wachstumsfaktoren (Liganden) oder als intrazelluläre Signale (aktivierte Proteinkinasen). Diese Wachstumssignale aktivieren Genen (Zellzyklusgene z.B. Cycline), die für Zellteilung und Zellwachstum wichtig sind. Im Gewebe herrscht ein Gleichgewicht zwischen wachstumshemmenden und wachstumsfördernden Signalen. Tumorzellen präsentieren eine Störung dieser physiologischen Wachstumskontrolle durch folgende Mechanismen:

- *Autokriner Wachstumseffekt: Ausschüttung von Wachstumsfaktoren durch Tumorzellen*
- *Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren auf der Tumorzelloberfläche*
- *Mutationen in Wachstumsgenen (bsp. Bei Rezeptor-Tyrosinkinase =RTK), die zur verstärkten Aktivität führt*
- *Amplifikation wachstumsrelevanter Gene*
- *Verstärktes Zellwachstum bedingt durch Chromosomentranslokation mit Bildung von Fusionsgenen*

Wachstumsfaktoren sind für die Zellteilung in Bezug auf Geweberegeneration und für das Überleben von nicht-transformierten Zellen wichtig und notwendig. Normalerweise können Tumorzellen selbst Wachstumsfaktoren produzieren und sezernieren, aber sie sind auch in der Lage, durch Aktivierung von Onkogenen und durch Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen unabhängig von Wachstumsfaktoren zu proliferieren. Bei vielen Tumorerkrankungen findet eine vermehrte Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren auf der Zelloberfläche statt. Also in Tumorzellen werden durch Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren einerseits das Zellwachstum und gleichzeitig auch die Zelldifferenzierung und Apoptose gehemmt und andererseits die Metastasierung, Zellmigration und Angiogenese gefördert. (Siewert 2010).

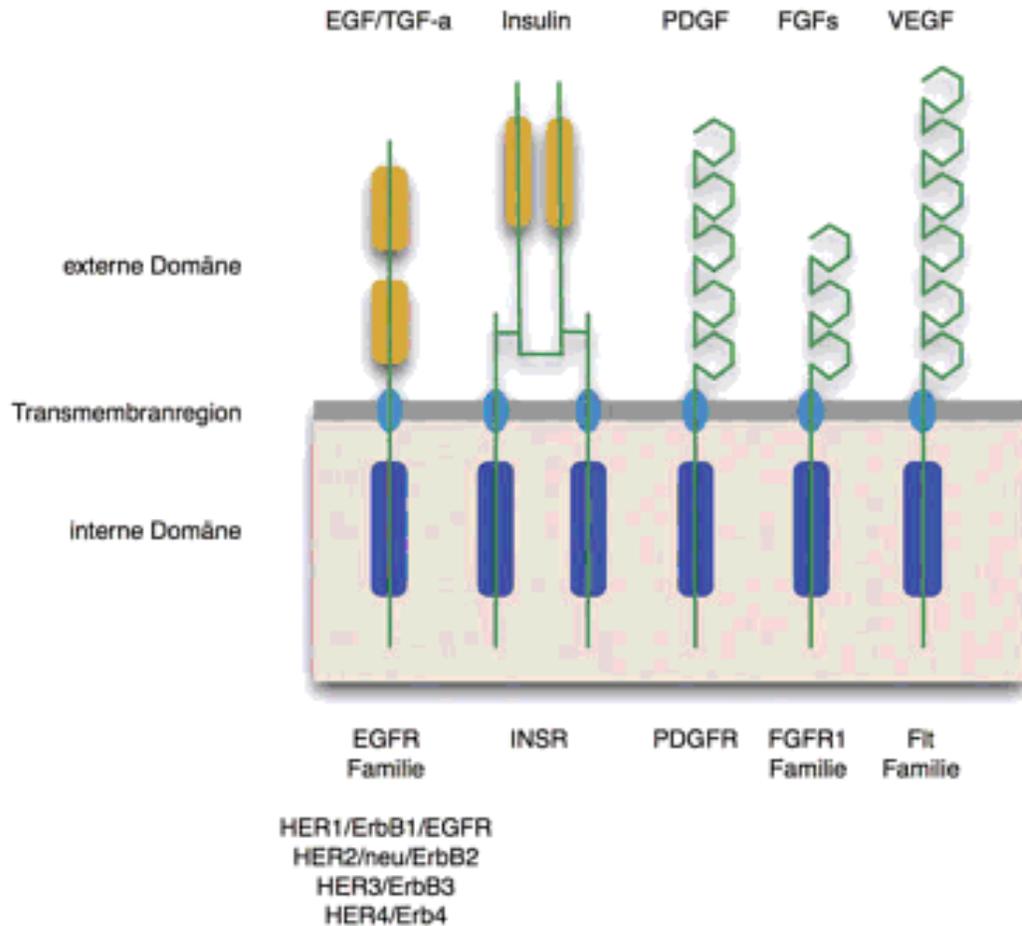


Abbildung 1.4.1.: Wachstumsfaktorrezeptoren. Diese Rezeptoren haben eine häufige und verstärkte Aktivität in Tumoren. EGF Epidermaler Wachstumsfaktor; FGF „Fibroblastwachstumsfaktor“; HER humane epitheliale Wachstumsfaktor Rezeptoren; IGF „Insulin Wachstumsfaktor“; TGF „transforming Wachstumsfaktor“; VEGF vaskuloendothelialer Wachstumsfaktor. (Siewert 2010)

Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) ist einer der ersten beschriebenen Wachstumsfaktoren. Andere wichtige Wachstumsfaktoren in Bezug auf Tumorerkrankungen sind vor allem der FGF („fibroblast growth factor“), der IGF („insulin growth factor“), der VEGF (2 vascular endothelial growth factor“) oder der PDGF („Plättchen-Wachstumsfaktor“). (Siewert 2010)

2. Fibroblastwachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren (FGFs/FGFR)

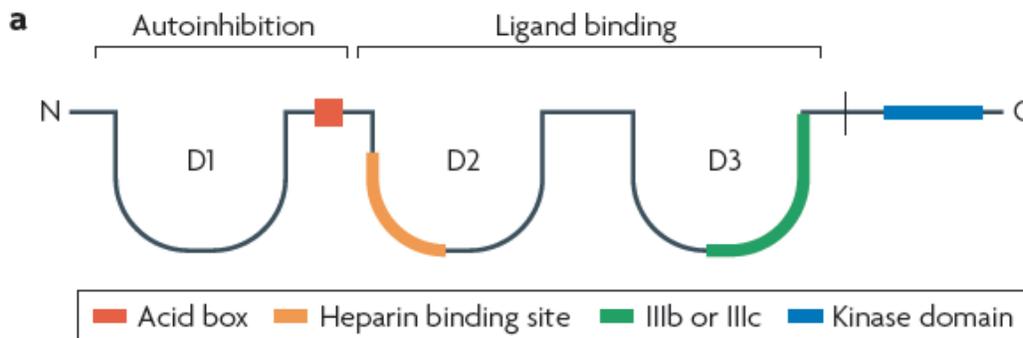
2.1. Die Familie der FGF-Rezeptoren (FGFR 1-4)

Die Superfamilie der Rezeptor-Tyrosinkinasen besteht aus etwa 15 Unterfamilien, denen jeweils verschiedene Motive in der extrazellulären Region zugeordnet sind. Die Rezeptoren der Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFR) gehören zur Klasse IV der Familie der Rezeptor Tyrosinkinase (RTK). Bezogen auf die Ähnlichkeit ihrer Strukturklasse findet man folgende Mitglieder: EGF-, INS-, PDGF- und FGF-Rezeptoren. Das, was alle dieser Rezeptoren gemeinsam haben, ist die Tyrosinkinase-Aktivität in ihrer cytoplasmatischen Domäne. Außerdem sind Rezeptor-Tyrosinkinasen notwendige Elemente für die verschiedenen Signalübertragungswege, welche in der Proliferation, Differenzierung, Migration und Metabolismus von Zellen involviert sind. Funktionen dieser sind vielfältige Rollen in der Embryonalentwicklung, sowie die Regeneration und Instandhaltung von Geweben im erwachsenen Organismus. Funktionsstörungen lösen Krankheiten wie Arteriosklerose, Retinopathie und Entstehung von Tumoren aus. Der Einfluss sowie die Funktion vieler Proteine auf den Zellmetabolismus hängen entscheidend von Veränderungen ihrer Aktivität durch exogene Stimuli ab. Rezeptoren nehmen in der Regel ein externes Signal in Form eines spezifischen Liganden wahr und vermitteln nachher die Aktivierung einer Signalkaskade in der Zelle. Bei Anwesenheit einer Mutation in einem Allel kann diese Regulationsmöglichkeit verloren gehen. Eine Fehlregulation kann es zu einer unkontrollierbaren Aktivität mit pathologischen Konsequenzen des vom normalen Allel kodierten Gens führen (Alberts, 2008).

Es gibt bisher vier bekannten FGF-Rezeptoren (FGFR 1-4) und einen fünften FGF-Rezeptor (FGFR-5), der in der Literatur als FGFR-5 bezeichnet wird aber keine Signale überträgt (Wiedemann, 2000).

2.1.1. Grundstruktur der FGFR

Alle FGF-Rezeptoren besitzen einen extrazellulären Teil mit einem N-terminalen Signalpeptid gefolgt von Cystein-reichen Domänen, die drei Immunglobulin-ähnliche Domäne (Ig-I, -II und -III) bilden, die in Abbildung 2.1.1.1. als **D1, D2 und D3** dargestellt sind. In diesem Bereich liegt auch die acid-Box (in Rot), die sich zwischen D1 und D2 befindet. Sie ist eine Gruppe von sauren Aminosäuren wie Glutaminsäure und Asparaginsäure sowie Histidin, Alanin und Valin (HAV), die dort die HAV-Struktur bilden. Hier befindet sich eine CHD (Cell adhesion molecule (CAM) homology Domain) und eine heparin-Bindungsdomäne (in Orange). FGFR-Varianten existieren als Exon-Skipping-Formen (in grün) mit oder ohne Acid box, die von D3 in FGFR 1-3 entstehen (Rebscher, 2009; Beenken, 2009)



b

	$\beta C'$				βE																						
FGFR1b	P	Y	V	Q	I	L	K	H	S	G	I	N	S	S	D	-	-	A	E	V	L	T	L	F	N	V	329
FGFR2b	.	.	L	K	V	N	-	-	.	.	.	A	330
FGFR3b	.	.	.	T	V	.	.	S	W	I	S	E	.	V	E	-	A	D	V	R	.	R	.	A	.	.	328
FGFR1c	T	A	.	V	.	T	T	.	K	E	M	.	.	H	.	R	.	.	331	
FGFR2c	.	.	L	K	V	.	.	A	A	.	V	.	T	T	.	K	E	I	.	.	Y	I	R	.	.	332	
FGFR3c	.	.	.	T	V	.	.	T	A	.	A	.	T	T	.	K	E	L	.	.	S	.	H	.	.	329	
FGFR4	V	.	.	T	A	D	E	-	-	V	.	.	Y	.	R	.	.	323	

Abbildung 2.1.1.1.. Grundstruktur der FGFR (Beenken, 2009)

- Grundstruktur der 4 FGF-Rezeptoren
- Alignment der Sequenzen von $\beta C'$ - βE Loops der sieben FGF-Rezeptoren, inklusiv $\beta C'$ und βE Strands. Die vertikale grüne Linie trennt die ungespleißte Region des Rezeptors von der gespleißten Region nach Links.

Die Transmembran-Domäne (TM) besteht aus 14 Aminosäuren. An sie schließt sich der zyttoplasmatische Bereich mit der juxtamembran Domäne und der Tyrosinkinase Domäne (TK1 und TK2) an. Letztere ist durch 14 Aminosäuren gespalten, was in Abbildung 2.1.1.1. allerdings nicht dargestellt ist. Das carboxylterminale Ende des Moleküls enthält Domänen, die die Signaldauer begrenzen (Knights, 2010).

2.1.2. Isoformen IIIb/IIIc der FGF-Rezeptoren

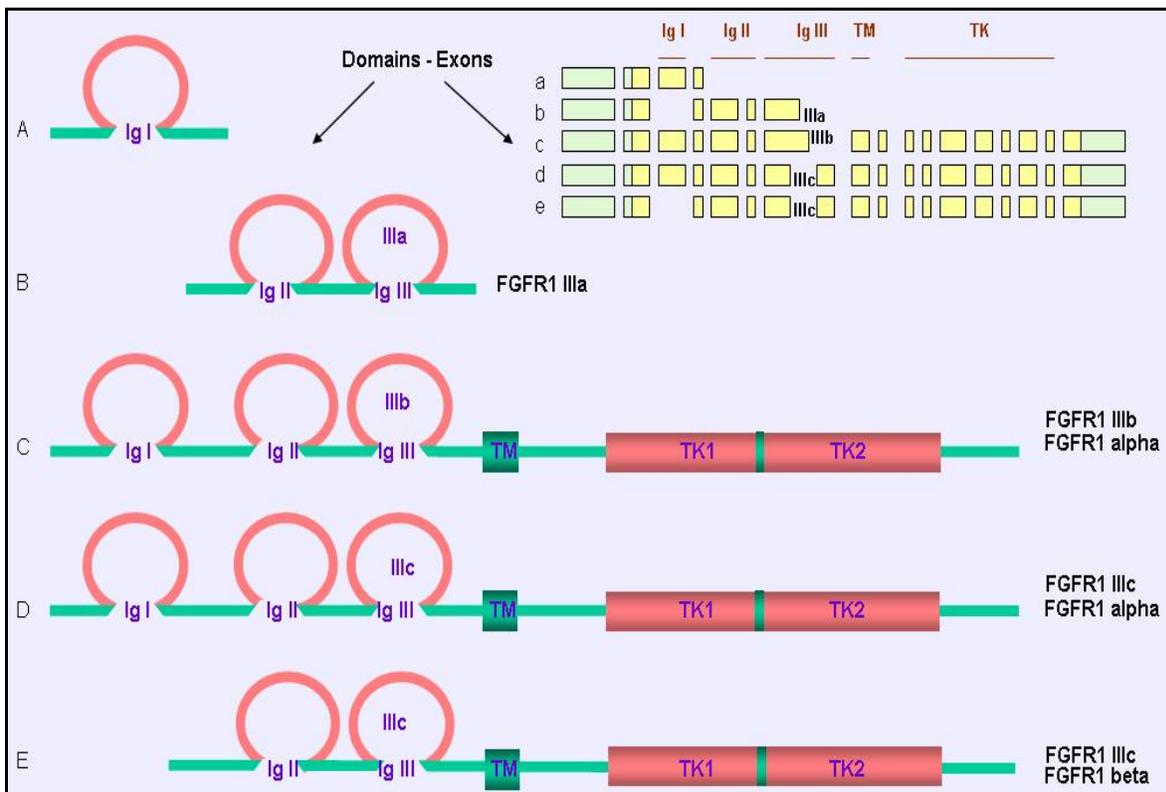


Abbildung 2.1.2.1.: Splice Formen der FGF-Rezeptor-1 (modifiziert aus Johnson und Williams, 1993) (<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/FGFR1113.html>).

Die Abbildung 2.1.2.1. beschreibt die Spleißvarianten von FGFR1, von dem die meisten Varianten beschrieben wurden. Es gibt lösliche (A, B) und in der Membran verankerte Formen (C, D, E). Die Formen IIIa (B), IIIb (C) und IIIc (D, E) betreffen die IgIII-Domäne, während die alpha- (C, D) und beta-Form mit Spleißvorgängen der zwei Exons 3 und 4 assoziiert sind. Also Spleißvarianten sind in der Lage, Isoformen mit verschiedener Spezifität bei der Liganden-Bindung zu generieren. Die löslichen Formen besitzen keine intrazelluläre Domäne

und Kinase Domäne. Die löslichen Formen ergeben sich nicht nur aus Spleißprozessen, sondern sie können auch durch Proteolyse entstehen (Groth, 2002).

Die häufigste und biologische wichtigste Form von alternativem Spleißen betrifft jedoch die zweite Hälfte der IgIII-Domäne. Diese kann alternativ von zwei verschiedenen Exons kodiert werden, wodurch Ig-IIIb oder Ig-IIIc Varianten der Rezeptoren entstehen (Plotnikov, 2000). Die biologische und physiologische Bedeutung dieser Variaten IIIb/IIIc kommt daher, dass in der Ig-III Region die Ligandenbindung stattfindet. Alternatives Splicing an dieser Stelle erzeugt daher Rezeptoren mit deutlich unterschiedlichem Ligandenspektrum und biologischer Wirkung (Olsen, 2003). Das am besten untersuchte Beispiel ist FGFR2, dessen Ig-IIIb Form als Rezeptor für den Keratinozytenwachstumsfaktor (KGF) fungiert, der als Liganden KGF und FGF-1 bindet. Hingegen die Form Ig-IIIc von FGFR2, die FGF-1 und -2 mit gleich hoher Affinität bindet, jedoch nicht KGF = FGF-7. Für die Bindung eines Liganden sind die Ig-II und Ig-III erforderlich und essentiell, während Ig-I nicht wichtig ist (Olsen, 2004)

Allgemeine Information über die alternative Verwendung von Exon 8 und 9 in IgIII ist, dass beide Exons zur Expression der Isoformen IIIb/IIIc in FGFR 1-3 führen. Diese zwei Isoformen werden in verschiedenen Geweben exprimiert. Konkret wird die Expression der IIIb-Isoform vorwiegend in epitheliale Gewebe beobachtet, während die Isoform IIIc eher stärker in mesenchymalem Gewebe zu finden ist. Die zwei Isoformen binden auch deutlich unterschiedliche Liganden (Ornitz, 2001;Zhang, 2006). Auch aus der Entfernung von IgI und Acid-Box entstehen Splice-Varianten (Sehe Abbildung 2.1.2.1.) (Mason, 2007).

Tab. 2.1.2.2. Spezifität zwischen FGFs und FGFRs

<i>FGF Subfamilie</i>	<i>FGF</i>	<i>Synonym</i>	<i>Affinität zu FGFR und Varianten</i>
FGF1 (sekretiert oder Intrazellulär)	FGF1	Acidic FGF, aFGF	Alle FGFR
	FGF2	Basic FGF, bFGF	FGFR 1c, 3c > 2c, 1b, 4Δ
FGF4 (sekretiert)	FGF4	kFGF, Kaposi FGF, hst-1	FGFR 1c, 2c > 3c, 4Δ
	FGF5		
	FGF6	hst-2	
FGF7 (sekretiert)	FGF3	Int-2	FGFR 2b > 1b
	FGF7	KGF	
	FGF10	kFGF-2	
	FGF22		
FGF8 (sekretiert)	FGF8	AIGF	FGFR 3c > 4Δ, > 2c > 1c > 3b
	FGF17		
	FGF18		
FGF9 (sekretiert)	FGF9	GAF	FGFR 3c > 2c > 1c, 3b > 4Δ
	FGF16		
	FGF20	XFGF-20	
FGF19	FGF19		FGFR 1c, 2c, 3c, 4Δ (schwach)
	FGF21		
	FGF23		
FGF11 (intrazellulär)	FGF11	FHF's	unbekannt
	FGF12		
	FGF13		
	FGF14		

Die Tabelle 2.1.2.2. fasst die Bindungspräferenzen zwischen FGFs und FGFRs (1-4) und Varianten (IIIb/IIIc) nach (Zhang, 2006).

2.1.3. Aktivierungsmechanismus

Die Mitwirkung von Heparansulfat ermöglicht die Bindung spezifischer Liganden an den extrazellulären Anteil des Rezeptors, was zu einer Homo- oder Heterodimerisierung des Rezeptors führt. Nach der extrazellulären Aktivierung geben die Rezeptoren Wachstumsfördernde Signale in den intrazellulären Raum weiter, in dem sie dank ihrer Kinasefunktion verschiedene Substrate an den Tyrosinresten phosphorylieren. Dafür werden Phosphatreste verwendet, die aus der Spaltung von Adenosintriphosphat (ATP) stammen. Diese gesamten molekularen Prozessen lösen innerhalb der Zelle zuerst die Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase und anschließend die damit verbundene Signaltransduktion aus (Speer 2005) (Siewert 2010).

An den biochemischen und physiologischen Prozessen der Signaltransduktion im Zellinneren sind verschiedene Enzymen und Botenstoffen (Second Messenger) beteiligt, die

eine sog. Signalkaskade auslösen. Die Integration von Signalen mehrerer Signalkaskaden im Zytoplasma oder im Zellkern erfolgt durch Crosstalk, wobei die Bildung von Signalnetzungen in einem Zelltyp verursacht. Insbesondere sind Botenstoffen wie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Inositoltriphosphat (IP₃) Calciumionen und Diacylglycerol (DAG) an dem Zellstoffwechsel beteiligt. Durch die Bindung von zwei FGFs an FGF-Rezeptoren wird der Signaltransduktionsweg aktiviert. Die phosphorylierten Rezeptoren sind in der Lage, mindestens zwei Typen von Signalen zu initiieren. Der erste Signaltyp wird über Ras-G-Proteine vermittelt, der zweite durch Phospholipase C (Gilbert, 2006). Rezeptor-Tyrosinkinasen der FGF-Familie können mindestens zwei bekannte Signalwege aktivieren: **MAP-Kinase-Weg** und **PI3-Kinase weg** (Alberts, 2008).

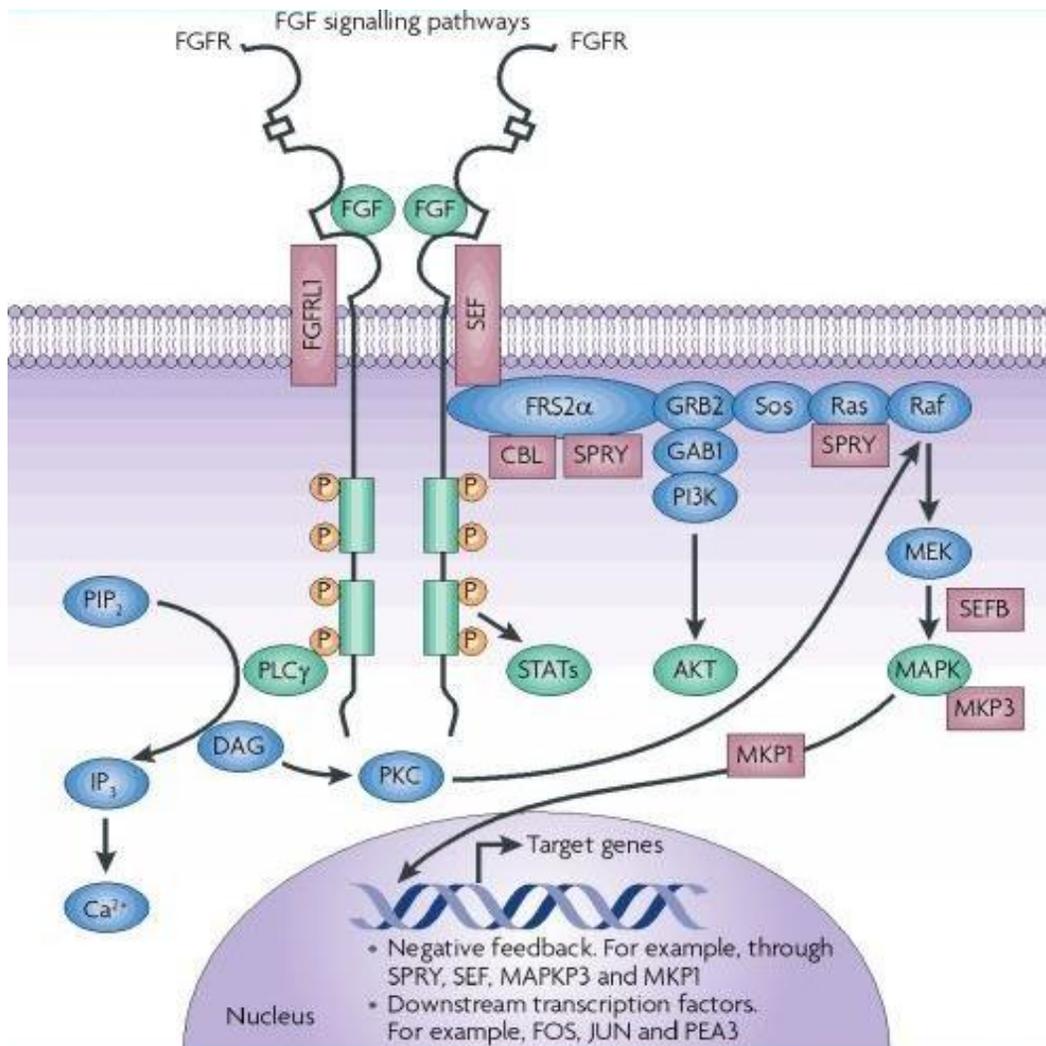


Abb. 2.1.3.1.: FGF-Signalwege (Turner, 2010)

Die Abbildung 2.1.3.1. beschreibt den externen und internen Ereignissen, die zur Aktivierung FGFR-abhängiger Signalwege führen. Die aktivierte RTK rekrutiert ein Adaptor Protein wie *FRS2*, *Shp* oder *Grb2*. Grb2 ermöglicht die Translokation von Sos an die Zellmembran, wo es Ras aktiviert. Weiter down-stream kommt es dadurch zu Aktivierung eine Reihe von MAP-Kinasen in der Abfolge Raf, MEK, MAPK. Nachher tritt MKP1 in den Zellkern hinein, um Transkriptionsfaktoren wie FOS, JUN und PEA3 zu phosphorylieren und aktivieren, wodurch Zielgene reguliert werden. Die Stimulierung der Phospholipase-C ($PLC\gamma$) durch den aktivierten Rezeptor führt zu Spaltung von PIP_2 in IP_3 und DAG, das als second messenger Proteinkinase C aktiviert. Ein dritter Signalweg kann durch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Stat ausgelöst werden. Aktiviertes STAT transloziert in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor wirkt (Gilbert, 2010;Turner, 2010).

2.1.4. Mutationen in FGFRs

FGF-Rezeptoren regulieren den Ablauf von Wachstum und Differenzierung von Zellen, indem der Rezeptor durch die Bindung eines Liganden aktiviert wird. Nur auf diese Weise ist es möglich, das Signal ins Zellinnere weiterzuleiten. Aber wenn in einem Rezeptorgen eine Mutation in Form einer Deletion oder Insertion oder eines Basenaustausches vorliegt, kann die physiologische Aktivität des Rezeptors verändert werden. Art und Lokalisierung der Mutation erzeugen unterschiedliche Konsequenzen bezüglich der biologischen Aktivität (Alberts, 2008).

Die 6-Cysteinreste der FGF-Rezeptoren stabilisieren die drei Ig-Domänen über Disulfidbrücken: Die Reste C62-C107 von FGFR2 stabilisieren Ig-I-Domäne, C179-C231 Ig-II-Domäne und C278-C342 Ig-III-Domäne (Robertson, 1998). Manche Mutationen führen zum Auftreten eines Cystein-Moleküls, was zum molekularen Aufbau einer Disulfidbrücke mit einem entsprechenden Cysteinrest eines anderen Rezeptors führt (Burke, 1998). Das ist ein Grund, warum zwei Rezeptoren „ohne Ligand-Bindung“ dimerisieren und verschiedene Signalkaskade aktivieren. Durch die ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors kommt es zur Weiterleitung des Signals in einem falschen Zeitpunkt. Es tritt dann ein physiologischer Prozess zur falschen Zeit auf.

Fibroblastenwachstumsfaktoren sind in der fötalen Morphogenese, in der Homeostase von adulten Geweben und typischerweise in der Tumorigenese involviert (Grose, 2007). Eine

sehr wichtige und charakteristische Funktion der vier FGF-Rezeptoren ist ihre Beteiligung an der Kraniofazial-Entwicklung und der Bildung von Körper- Extremitäten. Mutationen der FGFR-Gene führen daher zu Syndromen, die häufig durch eine prämaturre Differenzierung von Knochen und Knorpel charakterisiert sind (Alberts, 2008). Sie bilden daher die molekulare Basis von verschiedenen Krankheitsbildern (z.B. Apert-Syndrom) und Formen der Skelettdysplasie. Diese Erkrankungen zeichnen sich durch ein ausgeprägtes und irreguläres Wachstum der Röhrenknochen und/oder Schädelknochen aus (Speer 2005).

Über FGFR-Expression und Mutationen in den einzelnen Sarkomen (Knochen- und Weichteilsarkomen) und Subtypen gibt es noch sehr wenig konkrete Informationen. Gründe dafür sind die Seltenheit der Sarkome, ihre histologische Diversität und ihre genetische Komplexität. Bisher sind die Fortschritte dank der DNA-Chips microarray Technologie besser geworden, die sich auf die Genexpression und Charakterisierung dieser komplexen Tumorguppen fokussiert. Kürzlich wurden Studien auf eine limitierte Anzahl von Histotypen mit einer markierten Trennung zwischen Knochen- und Weichteilsarkomen durchgeführt. Diese Studien assoziieren die Genexpression der häufiger vorkommenden Gene mit den häufigeren Sarkomen in allen Altersgruppen (Baird, 2005).

2.1.5. FGF-Rezeptor 1 (FGFR1)

Synonyme für FGFR1 in älterer Literatur sind zum Beispiel: fms-related tyrosin-Kinase 2/ Pfeiffer-Syndrom, und CD331. CD331 ist ein Rezeptor-Tyrosin-Kinase, dessen Liganden zu spezifischen Mitgliedern der Familie des Fibroblastenwachstumsfaktors gehören (Itoh, 1990).

Der FGFR-1 ist einer der drei FGF-Rezeptoren (1-3), aus dem Isoformen IIIb/IIIc der Ig-III-like-Domäne entstehen können. Das FGFR1-Gen ist am Chromosom 8 (8p11.2) lokalisiert (Patnaik, 2010). Veränderungen in der Expression der FGFR-Isoformen können in der Tumorigenese zur malignen Transformation beitragen (Liu, 2007). Die Expression der Variante IIIc von FGFR-1 wurde in fast allen Geweben untersucht und gefunden, hingegen wurde die Expression der Variante IIIb nur in Haut, Gehirn, Nieren, Muskeln und Plazenta gefunden (Johnson, 1993). Die Signalkaskaden, die durch Bindung zwischen FGFs und FGFR-1 generiert werden, beeinflussen die Mitogenese und die Zelldifferenzierung. Insbesondere geht

der FGFR-1 eine spezifische Bindung mit acidic und basic FGFs (a-/bFGF) (Sehe Tab. 2.1.6.1.) ein und er ist auch an der Induktion der Gliedmaßenbildung beteiligt (Eswarakumar, 2005).

2.1.5.1. Auswirkungen von FGFR1-Mutationen

Durch drei genetische Keimbahnmutationen im Gen-FGFR-1 können unterschiedliche Erkrankungen ausgelöst werden, wie zum Beispiel das Kallman's Syndrom oder Pfeiffer's Syndrom und Osteoglophonische Dysplasie, die alle zu den Entwicklungsstörungen der Knochen gehören. In der osteoglophonischen Dysplasie findet man Missense Mutationen des FGFR-1, die den Rezeptor konstitutiv aktivieren. Das Kallman's Syndrom entsteht durch eine loss of function –Mutation in FGFR-1, was zu Hypogonadotropie, Hypogonadismus und Anosmia führt (Shankar, 2010;Dode, 2006;Dode, 2003).

Das Pfeiffer-Syndrom gehört zu den seltenen autosomal-dominant vererbten Krankheiten, sowie Apert-Syndrom, Crouzon-Syndrom, etc., welche kraniofaziale Fehlbildungen verursachen. Die Inzidenz der Betroffenen liegt bei etwa einer von 100.000 Personen. Auf molekulare Ebene kann dieses Syndrom durch Erkennung von Mutationen analysiert und festgestellt werden. Auf klinische Ebene wird das Syndrom durch einen ultrasonographischen Nachweis einer Kraniosynostose, eines Hypertelorismus mit Proptose und breiten Daumen erkannt. Aber eigentlich die molekulare Analyse wird durchgeführt, um die Diagnose zu unterstützen. Also in Konkret wird das Pfeiffer-Syndrom durch Mutationen in den Genen FGFR-1 und FGFR-2 verursacht (Vogels, 2006).

Das Kallmann-Syndrom (KS) zeichnet sich durch einen angeborenen Symptom aus, bei dem den Geruchssinn vermindert ist oder komplett fehlt. Die Vererbungsform ist autosomal dominant. Dieses ist auch mit Hoden- und Ovarialhypoplasie durch einen hypogonadotropen Hypogonadismus assoziiert. Die Ursache ist eine Loss of Function Mutation im Gen FGFR-1, die in Chromosom 8, Genlocus 8p12-p11.2 lokalisiert ist und alle Träger sind meist durch Haploinsuffizienz charakterisiert (Dode, 2003). Die Mutation im KS betrifft auch eines der Proteine, die in der Formation von spezifischen Kerngebieten des Hypothalamus und von Bulbus olfactorius während der Embryonalentwicklung involviert sind. Dabei findet eine Einwanderung von Gonadoliberin (GnRH) produzierenden Zellen aus der nasalen Plakode in das Vorderhirn statt. In diesem Prozess werden Releasing-Hormone freigesetzt, die

Gonadotropine (FSH und LH) produzieren und dadurch die Testosteron-Produktion sowie die Spermatogenese bei Männern und die Menstruation bei Frauen kontrolliert werden. Bei KS handelt es sich um eine genetisch bedingte Aplasie des Bulbus olfactorius (Wray, 2002; Pitteloud, 2005).

Eine Überexpression von FGFR-1 wurde in embryonalen Rhabdomyosarkomen (ERMS) und alveolären Rhabdomyosarkomen (ARMS) detektiert und in einer der pleomorphischen Varianten des RMS, sowie in RMS-Zelllinien getestet. Es wurde bei den primären RMS-tumoren eine Hypomethylierung einer der CpG-Insel im FGFR1-Exon1 identifiziert. Dabei wurde keine Mutation im FGFR1-Gen in den Exon- oder Intron-sequenzen gefunden (Goldstein, 2007).

Genexpressionsprofile von 177 STSs (hochgradigen STSs davon 13 histopathologischen Subtypen) wurden in klinischen Studien untersucht. Die Ergebnisse ergaben eine Einteilung in zwei Clusters, wobei der erste Cluster STS mit spezifischen Typen genetischer Alterationen beinhaltet und der andere mit einer großen Anzahl von genetischen Komplexen und pleomorphischen STS. Zum ersten Cluster zählen Synovialsarkome, myxoid/round-cell liposarcomas, und gastrointestinal stromal Tumoren, die durch Entwicklungsgene in EGFR, FGFR, Wnt, Notch, Hedgehog, RAR und KIT Signalwegen charakterisiert wurden. In Synovialsarkomen wurde die Genexpression von FGFR1 und FGFR3 detektiert. Nach Francis et al ist eine Überexpression von FGFR1 in Synovialsarkomen zu finden, die vielleicht eine Rolle in der Tumorentwicklung spielt. In GIST und Liposarkomen wurde die Genexpression von FGFR1 und FGFR3 nicht vorgefunden (Francis, 2007).

Eine hohe Genexpression vom FGFR-1 wurde auch mit Osteosarkomen assoziiert. Es gibt jedoch keine Information über Mutationen oder die Expression seiner Varianten IIIb/IIIc (Baird, 2005).

2.1.6. FGF-Rezeptor 2 (FGFR2)

Das FGFR2-Gen ist an dem langen Arm des Chromosoms 10 in der Position 26 (10q26) bei Menschen lokalisiert (Dionne, 1992). Zu der Lokalisierung der zwei Isoformen IIIb/IIIc des FGFR-2 findet man vorwiegend FGFR2-IIIb zum Beispiel in Haut und internen Organen. Hingegen findet man FGFR2-IIIc in Kraniofazial-Knochen. (Orr-Urtreger, 1993). Obwohl FGFR1- und FGFR2-Gen paralog sind und sich beide in unterschiedlichen Chromosomen befinden, zeigt jeder Rezeptor unterschiedliche Spezifität für FGFs. Genau so zeigen beide Splicevarianten IIIb und IIIc des FGFR2-Gens unterschiedliche Spezifitäten. FGFR2b dient als Rezeptor für FGF1, FGF3, FGF7, FGF10 und FGF22. FGFR2c dient als Rezeptor für FGF1, FGF2, FGF4, FGF6, FGF9, FGF16-18 und FGF20 (Katoh, 2009).

2.1.6.1. Assoziierte Störungen und Erkrankungen in FGFR-2

FGFR2 Mutationen verursachen folgenden Syndromen: Kraniosynostosis-Syndrom, Pfeiffer-Syndrom, Apert-Syndrom, Crouzon-Syndrom, Jackson-Weiss-Syndrom, Beare-Stevenson-Syndrom und Seathre-Chatzen Syndrom, während dieselben Mutationen autosomal erworben zu Krebserkrankungen beitragen. Allgemein die Anomalien in FGFR2 zeigen einem breiten Spektrum in der Krebs-Pathologie von Knochen und Haut (Katoh, 2009).

Es gibt Mutationen, die ein Syndrom mit Malformationen in der Kranialstruktur (z.B. Kraniosynostosis) auslösen (Webster, 1997). Und Mutationen in FGFR2 IIIc sind mit markierten Veränderungen in Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten assoziiert (Lee, 2010).

Studien haben gezeigt, dass Alterationen in den FGFR2-Signalwegen möglicherweise in der Entwicklung des Kraniosynostosis-Syndroms involviert sind. Die Kinase-Domäne von FGFR-2 präsentiert Keimbahnmutationen, die auch zur Entwicklung verschiedener Syndromen wie Craniosynostosis-Syndrom und Crouzon's-Syndrom geführt werden können. In dem Exon 8 (IgIIIa) oder Exon 10 (IgIIIc) sowie in der Sequenz des Intros (flankiert IgIIIc) von FGFR-2 befinden sich die meisten Mutationen, die auch die Eigenschaften der FGF-Bindung modifizieren. Wie zum Beispiel die Mutation in Exon 10 (IgIIIc), die für die Auslösung von Apert-, Crouzon- und Pfeiffer-Syndrom verantwortlich ist (Kan, 2002;Chen, 2007).

In der Tab. 2.1.6.1. sind Erkrankungen und Störungen, die mit FGFR2 assoziiert sind, wie Melanom, Squamous Zellkarzinom (SCC) und basal Zellkarzinom (BCC), die in Haut durch genetische Störungen des FGFR2 manifestiert sind.

Tab. 2.1.6.1. Genetische Variationen und Störungen in FGFR2			
Krebserkrankung	Keimbahn/Somatisch	Genetische Alteration oder Variationen	Referenz
Brustkrebs	Somatisch	hohe Kopieanzahl	Adnane et al. (1991)
	Somatisch	Missense Mutation	Stephens et al. (2005)
	Keimbahn	SNPs bei Intron-Regulation	Easton et al. (2007)
Gastralkrebs	Somatisch	hohe Kopieanzahl	Nakatani et al. (1990)
	Somatisch	Missense Mutation	Jang et al. (2001)
Endometrial Gebärmutterkrebs	Somatisch	Missense Mutation	Pollock et al. (2007)
Lungenkrebs	Somatisch	Missense Mutation	Davies et al. (2005)
Melanom	Somatisch	Missense Mutation	Gartside et al. (2009)
Syndrome	Keimbahn/Somatisch	Genetische Alteration oder Variationen	Referenz
Crouzon syndrome	Keimbahn	Missense Mutation	Reardon et al. (1994)
Jackson-Weiss syndrome	Keimbahn	Missense Mutation	Jabs et al. (1994)
Apert syndrome	Keimbahn	Missense Mutation	Wilkie et al. (1995)
Pfeiffer syndrome	Keimbahn	Missense Mutation	Rutland et al. (1995)
Beare-Stevenson syndrome	Keimbahn	Missense Mutation	Przylepa et al. (1996)
Saethre-Chotzen syndrome	Keimbahn	Missense Mutation	Paznekas et al. (1998)
Atopic dermatitis	Keimbahn	Intron marker SNPs	Park et al. (2008)
FGFR2, fibroblastwachstumsfaktor Rezeptor 2; SNP, single- nucleotid Polymorphismus			

Ein Beispiel in Bezug auf Krebs sind Einzelnukleotid Polymorphismen (SNP=single nucleotid polymorphism) in Intron 2 des Gens FGFR-2, die mit einem hohen „Brustkrebsrisiko“ assoziiert sind. Diese Genom-Wide-Association Studie (GWAS) von Brustkrebs basiert auf den Genotyp 528,173 SNPs in 1,145 postmenopausal Frauen von europäischen Vorfahren, die mit invasivem Brustkrebs und 1,142 Kontrollen assoziiert sind. Bei der Untersuchung wurden vier SNPs (SNP=single nucleotid polymorphism) in Intron 2 des FGF-Rezeptor 2 gefunden, der in manchen Brustkrebs überexprimiert ist. Diese SNPs sind sehr stark mit Brustkrebs assoziiert. Diese Assoziation wird durch 1,776 betroffene Individuen und 2,072 Kontrolle aus drei zusätzlichen Studien bestätigt. Normalerweise das Brustkrebsrisiko beträgt 10% der Lebenszeit in Frauen aus Industrieländern und erhöht sich auf 12-14%, wenn Frauen Träger dieses SNPs sind. Weit häufiger ist die Entstehung maligner Erkrankungen jedoch mit somatischen Mutationen in FGFR2 assoziiert (Hunter, 2007).

Die Ergebnisse der Studien der Genexpression des FGFR-2 in Knochensarkomen zeigen, dass das Expressionsniveau von FGFR2 in zwei Subgruppen von Osteosarkomen unterschiedlich ist. Die untersuchten Subgruppen waren osteoblasten und nicht-osteoblasten Osteosarkomen. Der FGFR2 spielt eine essentielle Rolle in der Morphogenese des Knochens und hereditäre Mutationen des FGFR2-Genes führen zur Skelett-Dysplasie. Loss of Heterozygosity von FGFR2 wurde in hoch gradigen Osteosarkomen gefunden, dessen Expression auch in Osteosarkome-Zellen der Ratte berichtet wurde. Es wurde keine Mutation in der kodierenden Region des FGFR2-Gens gefunden. Es ist möglich, dass die Hemizygotität von FGFR2 allein zur Osteosarkom-Entwicklung beiträgt oder dass Das FGFR2-Gen kryptisch durch eine hohe Modifikation oder Mutation außerhalb der kodierenden Region inaktiviert ist. Es kann noch ein unentdecktes Tumorsuppressor-Gen in dieser Region geben (Mendoza, 2005). Die FGFR2-Expression in menschlichen Osteosarkomen wird noch bestimmt (Kubista, 2011).

Mutationen in FGFR2-Gen sind auch in der intermembranösen Knochenbildung involviert, wobei FGFR2 eine abnormale Signalübermittlung in Osteogenese und Funktionen der Knochenzellen vermittelt. Aktivierende P253R (assoziiert mit Apertsyndrom), C278F (assoziiert mit Pfeiffer- und Crouzon-Syndrom) und dominant negative Mutationen des FGFR2 zeigen verschiedene Effekte auf Proliferation, Differenzierung und Mineralisation von Knochenzellen in calvarial Osteoblasten des Huhnes (Ratisoontorn, 2003). Die gleichen Mutationen spielen als somatische Mutationen bei verschiedenen Karzinomen eine Rolle (Dutt, 2008). Eine Studie hat auch Mutationen des FGFR2 nur in endometrial stromal Sarkomzelllinien nachgewiesen werden. Normalerweise sind Mutationen des FGFR2 mit endometrial Krebs assoziiert (Pollock, 2007).

Nach Baird, Davis et al. wurde eine starke Expression von FGFR2 und FGFR4 in hoch gradigen Tumoren detektiert. Konkret wurden 181 Tumorproben darunter Liposarkome, Ewing's sarkome, Synovialsarkome, alveolären Rhabdomyosarkome und Osteosarkome untersucht, wobei nur eine hohe Genexpression von FGFR 1-4 in Osteosarkomen und Rhabdomyosarkomen detektiert wurde (Baird, 2005).

Tabelle 2.1.6.2. Tyrosinkinase und ihre Rezeptoren assoziiert mit individuellen Tumorguppen (shown are the mostly highly weighted)

Tumor Type	Gene	Clone Titel	Weight	P
GIST	KIT	Platelet-derived growth factor receptor, β polypeptide	16.598318	0.000001
	LYN	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homologue	10.054924	0.000001
EWS	JAK1	Janus kinase 1 (ein protein Tyrosinkinase)	17.694458	0.000001
HPC	FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (VEGFR1)	9.646015	0.000002
OS	FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	15.948823	0.000001
	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	8.1758	0.000005
	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	7.209751	0.00001
RMS	FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4	15.539065	0.000001

Daten der Tabelle stammen von (Baird, Davis et al. 2005)

Es gibt keine Information über die Expression von FGFR2-Splice-Varianten außer für das Kaposi's Sarkom (KS), in dem Überexpression von FGFR2 IIIc detektiert wurde (Cottoni, 2009;Antman, 2000).

2.1.7. FGF-Rezeptor 3 (FGFR3)

Das FGFR3-Gen liegt auf dem Chromosom 4 in der Position 16.3 (4p16.3) (Thompson, 1991). In der älteren Literatur wird es auch als Cek2 und Flg-2 bezeichnet. Die Homologie des FGFR3-Gens zwischen Mensch und Maus ist etwa 92% in Bezug auf die Aminosäuresequenz (Perez-Castro, 1997). Bei FGFR-3 findet man ebenfalls die alternativen Formen FGFR3b und FGFR3c, die aus der IgIII-like-Domäne des Rezeptors generiert werden. Die Form IIIb ist in Epithelien zu finden, hingegen ist in mesenchymalem Gewebe eine Mischung von beiden Formen IIIb/IIIc zu finden (Scotet, 1995).

Die Bindungsaffinität variiert zwischen FGFs und FGFR3 und Varianten (IIIb/IIIc). Für die Spezifität von FGFR3 gilt FGF1, für FGFR3 IIIb gelten FGF 8 und 9. FGFR3 IIIc zeigt ein breites Bindung-Spektrum an FGF1, -2, -4,-8, -9, -18, -19, (Sonvilla, 2010;Jin, 2004) (Zhang, 2006) (Sehe Tab. 2.1.2.2.).

2.1.7.1. Mutationen in FGFR-3

Mutationen im FGFR-3 Gen sind nicht nur mit Defekten des menschlichen Skeletts assoziiert, sondern auch mit verschiedenen Krebsarten wie dem multiplen Myelom, dem Blasenkrebs und dem Zervikalkarzinom (Logie, 2005)

Keimbahnmutationen in FGFR3 sind Ursache schwerwiegender Skelettdysplasien wie Achondroplasie, thanatophore Dysplasie oder Crouzon-Syndrom auslösen, dessen Phänotypen mit Acanthosis nigricans assoziiert sind. Auch bei der Knochenentwicklung in Bezug auf Fraktur-Heilung zeigt der FGFR3 einen negativen regulatorischen Effekt auf die endochondriale Ossifikation. FGFR3 ist während der Fraktur-Heilung in prähypertropischen und hypertropischen Chondrozyten exprimiert. Studien in Maus haben gezeigt, dass Gain of Function-Mutationen in FGFR3 nicht nur die Knochenreparatur auf Grund der Inhibition der Chondrozyten-Differenzierung beeinträchtigen könnten (Su, 2008), sondern auch zu abnormalem Wachstum der Knochenmasse führen, wobei negative Effekte auf die Osteoblastogenese und Osteoclastogenese einwirken.(Su, 2010).

Somatische Mutationen wurden in mehreren Malignomen nachgewiesen. FGFR3-Mutationen zeigen eine hohe Inzidenz in Urothel Papillomen und geringen gradigen Karzinomen und sind mit einer positiven Prognose assoziiert. FGFR3 Exon 7 zeigt folgende Mutationen R248C, S249T, L259L, P260P, und V266M. FGFR3 Exon 10 und 15 zeigen folgende Mutationen A366D, H412H, E627D, D641N, H643D und N653H. Alle dieser Mutationen sind mit invertierten Urothel-Papillomen assoziiert (Lott, 2009).

Außerdem ist eine häufige Translokation t(4; 14)(p16.3;q32.3) in multiplen Myelom vorhanden, die mit einer erhöhten Expression und aktivierenden Mutationen des FGFR3 assoziiert ist (Chesi, 1997;Logie, 2005).

Aber auch FGFR3-Mutationen (zwei 1948A>G, kodieren K650E und verursachen thanatophore Displasie in Keimbahn) sind mit Seminomen (bösartiger Keimzelltumor des Hodens, der durch Entartung von Spermatogonien entsteht) assoziiert (Goriely, 2009).

Expressionsprofils von Synovialsarkomen wurden in alternativen therapeutischen Targets identifiziert. Diese Studien haben oft die Expression von Genen gefunden, die in embryonal mesenchymal Entwicklung, Retinolsäure Antwort und Wnt/b-Catenin Signaling, sowie verschiedene Rezeptor Tyrosinkinasen - darunter auch FGFR3, EGFR, KIT und ERBB2 - involviert sind. Die Expression dieser Gene wurde auf Proteinniveau validiert. In Vitro Modellen von Synovialsarkomen wurden Inhibitoren von FGFR (SU5402) und humanisierte inhibitorischen Antikörper von FGFR3 (FGFR-001) getestet. SU5402 ist Effektiv zur Inhibition des Wachstums von Synovialsarkomen in Zellkultur und in xenograft Modellen. Humanisierte Monoklonale Antikörper gegen FGFR3, welche intravenös eingesetzt wurden, zeigen minimale Nebenwirkungen beim Zellwachstum von Weichteilsarkomen in in Vitro Modellen. Aber es sind noch Versuche erforderlich, wo die mögliche Effekte in der Induktion der Immunantwort getestet wird (Lubieniecka, 2005).

FGFR3 wird auch in Knochensarkomen exprimiert - da besonders in Giant Tumorzellen (GCT). Die Expression von FGFR3 wurde durch Immunhistochemie auf Proteinniveau bestätigt und wurde auch in Bindegewebe-Subpopulationen von primären GCTs nachgewiesen. Darüber hinaus, wurde FGFR3 Expression auch in humanen Chondrosarkomen beschrieben. Diese Studie bestätigt die Expression von FGFR3 in multinuclear und mononuclear Zellpopulationen bzw. in primären und rekurrent GCTs. Aber signifikanten Unterschiede zwischen Tumortypen konnten nicht beobachtet werden. Es gibt auch keine Information über die Expression von Varianten IIIb/IIIc des FGFR3 in GCTs (Guenther, 2005).

Eine Studie von stammzell-artigen rhabdomyosarkom-initiiierenden Zellen (RICs) in humanen Rhabdomyosarkom-Zelllinien, konnte in dieser kleinen Zellpopulation aus FGFR3-positiven Zellen besteht. Einzelne FGFR3-positive RMS-Zellen haben das Potential, Tumoren in Vivo zu bilden (Hirotsu, 2009).

2.1.8. Der FGFR4-Rezeptor-4 (FGFR4)

Das FGFR4-Gen ist auf dem langen Arm (q) des Chromosoms 5 in der Position 35.1 lokalisiert (Armstrong, 1992). Im Vergleich mit den anderen FGFR-Genen (1-3) umfasst das FGFR4-Gen nur 18 Exons im Vergleich zu 19 oder 20 Exon bei anderen FGFR-Genen. Auch bei FGFR4 werden alternative Spleiß-Formen beobachtet, es besteht keine Evidenz für die Existenz von IIIb/IIIc alternativen Formen wie die den anderen drei Mitglieder der Genfamilie (Agnes, 1997). Vorwiegend bindet dieses Mitglied acid- Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF-1)(Ornitz, 1996). Aber er bindet auch andere FGFs wie FGF-2, -6, -8, -17; für einen besseren Überblick bezogen auf Bindung-Affinität zwischen FGFs und FGFR4 siehe Tab. 2.1.6.1. (Zhang, 2006).

2.1.8.1. Mutationen in FGFR-4

Es wurden auch aktivierende Mutationen des FGFR-4 in Rhabdomyosarkomen (RMS) des Menschen identifiziert. Rhabdomyosarkom kommt vor allem in Kinder vor. Es tritt in Skelett-Muskulatur auf. FGFR4 ist sehr hoch in RMS während der Myogenese (= Formation des Muskelgewebes während der Embryonalentwicklung) exprimiert, aber nicht in skelett-Muskulatur. Dieses Ereignis spielt eine Rolle in der Tumorgenese. Mutationen in der Tyrosinkinase-Domäne des FGFR-4 wurden in primären menschlichen RMS-Tumoren detektiert. Taylor, Cheuk et al. 2009 haben die Hypothese erstellt, dass die konstitutive Aktivierung von FGFR4 durch Überexpression oder durch Mutation einen aggressiven Phänotyp in RMS fördert. Nach James G. Taylor stellt das mutierte FGFR4-Gen in humanen RMS-Tumoren ein Onkogen dar. In der Studie wurde eine hohe FGFR4-Expression in RMS-Tumoren mit fortgeschrittener Krebsphase und geringer Überlebensprognose assoziiert. In vitro reduziert FGFR4-Knockdown das Tumorwachstum in Xenotransplantaten einer humanen RMS-Zelllinie und wie auch die Metastasierung in die Lungen (Taylor, 2009).

Fibroblastwachstumsfaktor-Rezeptor 4 (FGFR4) hat eine starke Expression in einigen menschlichen Krebsarten und Tiermodellen. Insbesondere wurden Studien durchgeführt, in denen ein Single Nucleotid Polymorphismus (SNP) im Gen FGFR-4 entdeckt wurde. Dieser Polymorphismus bewirkt den Austausch von Glycin zu Arginin in Position 388 des Proteins. Das Vorhandensein eines FGFR-4 Arg 388 Allels ist mit schlechter Prognose von Patienten mit

hochgradigen Weichteilsarkomen, Brust- und Kolorektal Karzinomen sowie in Kopf und Hals Plattenzellkarzinomen (eng.: HNSCC=Head and Neck squamous cell carcinoma), assoziiert (Morimoto, 2003;da Costa Andrade, 2007;Seitzer, 2010).

2.1.9. Therapeutisches Potenzial von FGF-Rezeptoren

Wegen der häufigen Beteiligung von FGFRs an malignen Erkrankungen ist die Inhibition der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) für FGFRs eine wichtige Strategie in der Krebstherapie. **Su5402**, **PD173074** und **nordihydroguaiaretic** sind FGFR-Inhibitoren, die auf das Wachstum von multiplen Myelom Zelllinien einwirken, welche eine deregulierte FGFR3-Expression präsentieren (Grand, 2004). **PD173074** auch ein RTK-Inhibitor induziert Zellzyklus-Arrest von endometriose Krebszellen, die mit Mutationen in FGFR2 assoziiert sind (Byron, 2008). **Brivanib alaninate** ist ein dual Inhibitor für vaskular endothelial Wachstumsfaktor Rezeptor-Tyrosinkinase und FGFR-Tyrosinkinasen, der das Wachstum von menschlichen hepatozellulären Karzinomen in Mausmodellen inhibiert (Huynh, 2008). Die ektopische Expression und Deregulation des FGFR3 ergibt sich aus einer t(4; 14) chromosomalen Translokation, die etwa 15% der Patienten mit multiplen Myelomen (MM) präsentieren. **CHIR-258** ist ein RTK-Inhibitor mit antimyelom-Aktivität, der in MM-Mausmodellen angewendet wurde und positive Ergebnisse rausgekommen sind (Xin, 2006). Die inhibitorische Effekten des anti-FGFR3 Antikörpers (PRO-001) sind zytotoxisch auf t(4;14) multiple Myelom-Zellen, aber es verursacht auch die Apoptose in Mausmodellen mit MM und Blasenkrebs (Trudel, 2006).

2.2.FAMILIE DER FIBROBLASTWACHSTUMSFAKTOREN

Bisher existieren 18 Mitglieder der FGF-Familie in Säugertieren (FGF1-FGF10 und FGF16-FGF23), die in 6 Subfamilien gruppiert sind. Diese Gliederung ist auf Unterschiede durch Sequenz, Homologie und Phylogenie basiert: **FGF1** und **FGF2**; FGF3, FGF7, FGF10, FGF22; **FGF4**, FGF5 und FGF6; **FGF8**, FGF17 und FGF18; **FGF9**, FGF16 und FGF20; und **FGF19**, FGF21 und FGF23. FGF11 bis FGF14 haben eine hohe Sequenz-Homologie zu der FGF-Familie, die aber nicht auf FGFRs aktivierend wirken. Dadurch werden sie nicht allgemein als Mitglieder der FGF-Familie betrachtet. FGF15 der Maus zeigt eine Orthologie mit FGF19 des Menschen. FGFs sind auch als parakrine Faktoren betrachtet. FGFs, zumindest

die ersten fünf Subfamilien, sind in Gewebewechselwirkungen in der Organogenese während der Embryogenese involviert (Beenken, 2009).

Auf zellulärer Ebene kontrollieren FGFs und Rezeptoren eine große Anzahl von biologischen Funktionen wie die Regulation der Proliferation, Migration, Differenzierung und Überleben von Zellen. Störungen in der Regulation von FGF-Signalübertragung können zur Tumorigenese führen. FGF-Signalling als ein therapeutisches Ziel für Krebs in Kombination mit anderen Rezeptor Tyrosinkinasen (FGFRs) hat neue Evidenzen in Bezug auf die Rolle der FGF-Signalübertragung in der Pathogenese von verschiedenen Tumortypen beigetragen. In verschiedenen Zusammenhängen kann die FGF-Signalling einerseits Schutzfunktionen von Tumoren vermitteln, um so andererseits Mechanismen, die diesen verschiedenen Effekten unterliegen, zu identifizieren. Ein Beispiel darüber wäre, der Sonic hedgehog (Shh) und FGF Signalweg, der das Wachstum und Differenzierung einiger Regionen des Nervensystems reguliert. Dabei wurde die Beziehung zwischen Shh und FGF Signalweg in granula-zellen-Vorläufern (GCPs) beobachtet, welche die meisten vorkommenden Nervenvorfahren (=neural progenitors) im Kleinhirn (=Cerebellum) und die putative Zellen des Ursprungs für den Kindheitsgehirntumor Medulloblastom sind. Shh induziert eine starke proliferative Antwort, die durch Koinkubation mit basic FGF verhindert werden kann. FGF inhibiert auch die Transkription von Shh-target-Genen und vermeidet die Aktivierung eines Gli-responsiven Promotor in Fibroblasten, der vermutlich Shh-Signalweg upstream der Gli-vermittelten Transkription blockiert. FGF-vermittelte Inhibition der Shh-Antworten benötigen die Aktivierung der FGF-Rezeptoren und von ERK und JNK-Kinasen auf dem Grund, dass es durch Inhibitoren dieser Enzymen blockiert werden kann. Schließlich fördert FGF Differenzierung von GCPs in Vitro und in Vivo und unterbricht die Proliferation von Tumorzellen aus patched mutant Maus, ein Modell für Medulloblastom. Das ist wichtig, um ein besseres Verständnis zu entwickeln, wie FGF-Signalling am besten therapeutisch gezielt angewendet werden kann (Tulin, 2010;Turner, 2010).

genannt wurden. So können FGFs im Bindegewebe gespeichert werden. Bei jeder Form der Gewebeschädigung, wie zum Beispiel bei Hypoxie und Ischämie (Up-Regulierung) werden die FGFs aus diesem Speicher freigesetzt (Vlodavsky, 1996;Asplund, 2009)

Alle Moleküle der FGF-Familie binden spezifisch an FGF-Rezeptoren an der Zelloberfläche. Dabei haben Heparansulfatketten eine unterstützende Wirkung und bilden den „Ternary Complex“, der aus zwei identischen FGF-Liganden, zwei FGF-Rezeptor-Einheiten und einer oder zwei Heparansulfat-Ketten besteht. Dieser Vorgang bewirkt die Dimerisierung und Phosphorylierung der FGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinase. Nach der Bindung zwischen FGF und FGFR wird ein Signalkomplex an der Zellmembran produziert, der die Signale weiterleitet (Ornitz, 2001;Schlessinger, 2000).

Die Bindungsspezifität der FGFs und FGFRs ist sowohl durch Unterschiede der primary-Sequenzen zwischen den 18 FGFs und den 7 Formen der FGFRs (FGFR1b,-1c, -2b, -2c, -3b, -3c und FGFR4) als auch durch räumliche und zeitliche Expressionsmuster von FGFs, FGFRs und HSGAGs reguliert. Wie schon bereits erwähnt (im FGFR-Kapitel) die alternativen Isoformen der FGFRs sind gewebspezifisch. Liganden sind entweder in Epithelium oder in Mesenchym produziert und aktivieren spezifische Rezeptoren des jeweils anderen Gewebes. Also Liganden, die in Epithelium produziert werden, aktivieren die Rezeptoren in Mesenchym und umgekehrt. Störungen in dieses Expressionsmusters Krebsfällen ermöglichen eine Überaktivierung durch FGFs, die dieses Gewebe nicht stimulieren sollten (Grose, 2005). Studien von FGF1, -2, -8 und -10 zusammen mit den FGFRs zeigen eine Diversität der Sequenzen am FGF-N-Terminus, eine Variation in der Länge von β 1 Strand und eine alternativ gespleißte Region in D3, welche ihre Bindungsspezifitäten bestimmen (Beenken, 2009).

3. Spleißen (Splicing)

Splicing ist Teil der Prozessierung der Ribonukleinsäuren (RNA), die im Zellkern von Eukaryoten stattfindet. Während der Transkription wird eine prä-mRNA gebildet, die noch aus Introns und Exons aufgebaut ist wobei Exons die kodierenden Sequenzen und Introns die „intervening Sequences“ sind. Splicing bewirkt die Entfernung der Introns aus der RNA-Sequenz, wobei die Exons miteinander zur fertigen mRNA verbunden werden (Sehe Abbildung 3.1.). Als cotranskriptionelle RNA-Prozessierung und RNA-Fabrik bezeichnet man Splicing zusammen mit Capping des 5'-Endes und Polyadenylierung des 3''-Endes. Ein Gen kann über 60 Introns enthalten. Splicing ist eine Charakteristik höherer Zellen und tritt in Mitochondrien, Archaea, Viren, etc. nicht auf (Alberts, 2004)

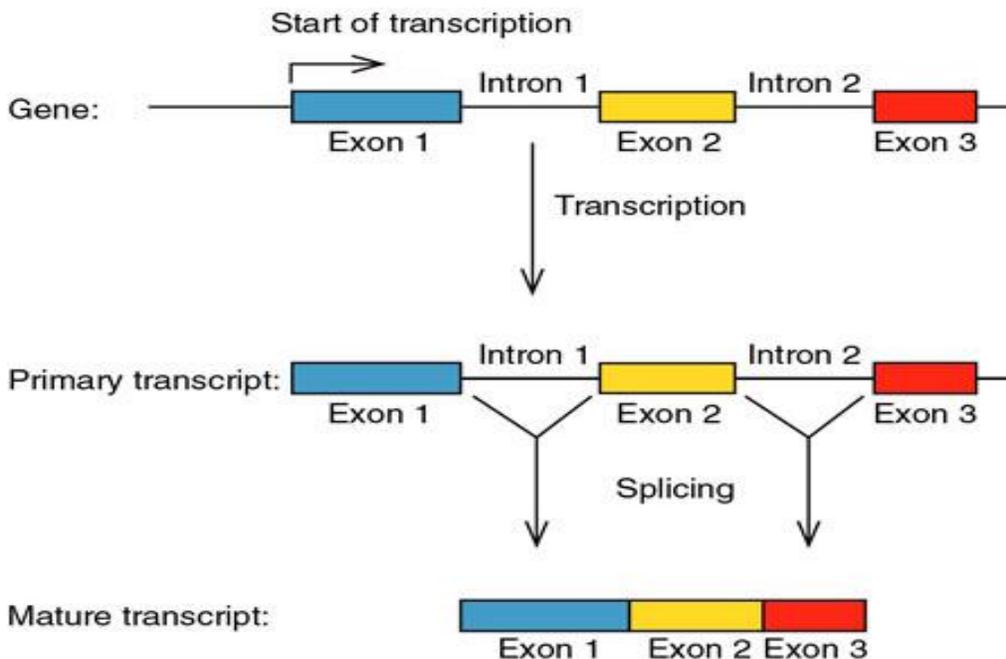


Abbildung 3.1.: Splicing

(http://www.sansilvestre.net/senior/Science/Contenido/Form_VIIB/Biology/Lessons/2010/Nucleicacids/02DNAstructureHL.html)

Die prä-mRNP und andere Proteine binden an Branchpoint Motive, (wo das 2'-hydroxyl der Adenosine das Schneiden der prä-mRNA 5'-Spliceseite fördert), SF1 (Splicing Factor 1), Py_n, U2AF₆; -5 (Unit2 auxiliary factor 6; -5) und die terminale 3'-Spliceseite. Die 5'-Spliceseite besitzt zahlreiche GU Dinukleotide. Drei snRNPs rekrutieren U4/U6-U5, in dem U4 und U6 snRNAs und assoziierte Proteine an U5 snRNP binden, was zur Bildung der lassoartigen Lariat-Struktur kommt.

(b) Zwei Transesterifikationen des Splicing: Der erste Schritt ist der Angriff von branch point Adenosin (A in der Abbildung 3.1.1.1.b) auf die 5'-Splice Site, das die Freisetzung des 5'-Exons und die Degradierung des Introns auslöst (Dank der lassoartigen Struktur Lariat genannt). Der zweite Schritt stellt die Verbindung der freien 3'-OH-Gruppe des 5'-Exons Zwischenstufen mit der 3'-Spliceseite des lariat intermediate Exons dar, was schließlich zur Freisetzung des Intron-Lariats führt (Rymond, 2007). Zum Schluss findet der Export der reifen mRNA durch die Kernpore aus dem Zellkern in das Zytosol statt. Dieser Prozess ist mit der Translokation verbunden, die genutzt wird, Proteine zu synthetisieren (Patel, 2003).

3.1.2. Self-Splicing oder autokatalytisches Splicing

Dabei handelt es sich um die chemische Aktivität der RNAs oder Ribozyme, die Introns ohne Spliceosom entfernen können. Sie nutzen die Hilfe RNA-bindender Proteine aus, um eine richtige Faltung zu ermöglichen. Durch konservierte Sequenzelemente der RNA und Reaktionsmechanismen können zwei Arten von self-Splicing differenziert werden, und zwar Gruppe I und II von Introns (Alberts, 2004).

Gruppe-I-Introns: Die Entfernung des Introns erfolgt durch Zweischnittmechanismus. Dabei wird ein Guanosin-Cofaktor benötigt, der einen nucleophilen Angriff auf die 5'-splice-site durchführt, indem die 3'-Hydroxygruppe des 5'-gelegenen Exons als Nucleophil die 3'-splice-site attackiert. Dadurch werden beide Exons miteinander verknüpft und das Intron freigesetzt. Bei der nächsten Reaktion handelt es sich nur um das Intron, wobei dieses sich zu einem Ring schließt.

Gruppe-II-Introns: Durch die Struktur der RNA wird ein Adenosin upstream der 3'-splice-site in die Lage gebracht, die 5'-splice-site nucleophil mit seiner 2'-Hydroxy-Gruppe

anzugreifen. Somit entsteht eine 2'5'Phosphodiesterbindung und dadurch eine Lariat-Struktur des Introns. Bei der zweiten Reaktion greift die 5'-splice-site die 3''splice-site nucleophil an, was zur Verbindung der zwei Exons und zur Freisetzung des Introns führt (Boudvillain, 1998;Alberts, 2004).

3.1.3. Splicing der tRNA

tRNA-Splicing ist eine andere seltene Form von Splicing. Diese Art von Splicing involviert unterschiedliche biochemische Reaktionen im Vergleich zu Spliceosom- und self-Splicing. Hier spielen Ribonukleasen eine wichtige Rolle bei der Spaltung der RNA sowie auch die Ligasen, die die Exons miteinander ligieren (Sehe Abb.3.1.3.1.)

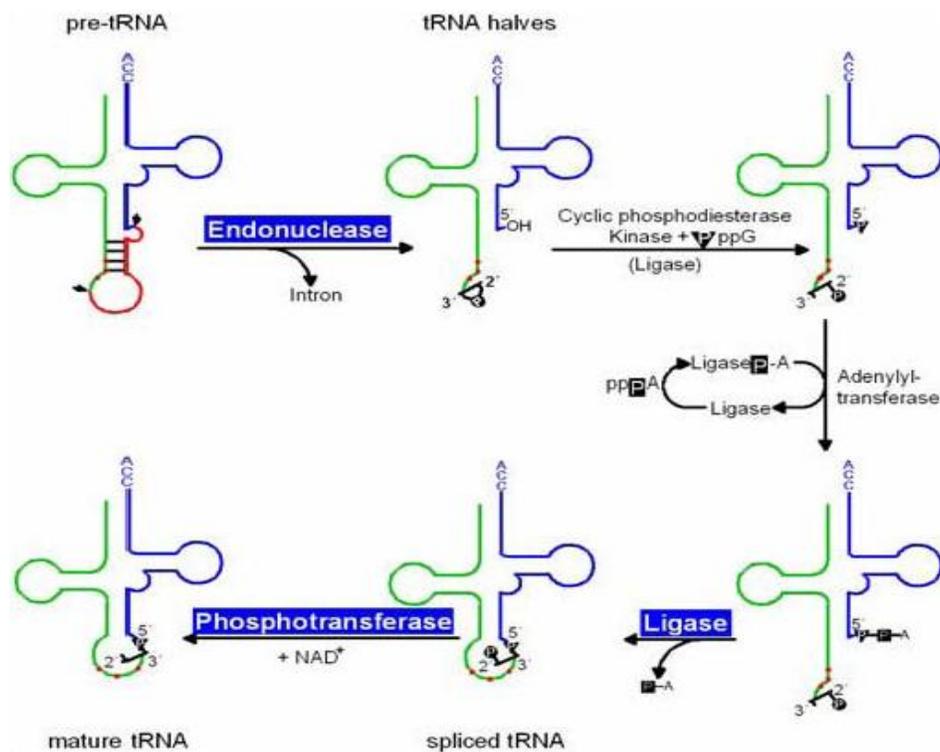


Abbildung 3.1.3.1.: Splicing der prä-tRNA (<http://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/fileadmin/REPORT/BIOCH/bioch007.htm>)

Bei dem enzymatischen Splicing von tRNA werden Introns in tRNA nach einem autokatalytischen Mechanismus prozessiert. Die meisten Introns befinden sich in der Anticodonschleife direkt 3' des Anticodons und bestehen aus circa 14 bis 60 Basen. Im Gegensatz zum Splicing werden die Introns von prä-mRNAs durch eine spezielle Struktur des Gesamtmoleküls erkannt und nicht über ihre Sequenz. Die prä-tRNA wird zweimal durch eine

Endonuklease geschnitten, indem sie das Intron und zwei tRNA-Halbmoleküle freisetzt. Dabei entsteht das 2'3'-Phosphat des 5'-Halbmoleküls, das zu einem 2'-Phosphat und einer 3'-OH-Gruppe hydrolysiert wird. Und die 5'-OH-Gruppe des 3'-Halbmoleküls wird unter GTP-Verbrauch phosphoryliert. Nur unter ATP-Hydrolyse durch RNA-Ligase ist eine Ligation möglich. Im letzten Schritt wird das 2'-Phosphat entfernt (Greer, 1983;Alberts, 2004).

3.1.4. Alternatives Splicing von mRNA

Unter „Alternativem prä-mRNA Spleißen“ (AS) versteht man einen genetischen, regulatorischen, zentralen Mechanismus bei verschiedenen Spezies wie Eukaryoten, Säugtieren, etc. Dieser Mechanismus stellt einen besonderen Vorgang in Bezug auf die Transkription dar, weil auf diese Weise multiple Isoformen von Proteinen generiert werden. Die meisten Studien des alternativen Splicings wurden in *C. Elegans* durchgeführt, aber auch in Metazoen, *Drosophila* und anderen Spezies.

Beim Menschen vermuten manche Studien, dass etwa 40 bis 60 % der menschlichen Gene alternativ gespleißt werden, wobei andere regulatorische Mechanismen auch in der Expression dieser Gene involviert sind. Die Funktionsweise dieser Mechanismen ist auf die Typen des alternativen Splicings basiert. Erstens weil während des alternativen Spleißvorgangs entschieden wird, welche DNA-Sequenz Exons oder welche Introns sind. Für die Regulation sind Splice Faktoren wie hnRNP (heterogenes nuclear Ribonucleoprotein), SF1 (Splicing Factor 1), etc. erforderlich, die einerseits Signale auf der RNA erkennen und andererseits die Auswahl der Spliceseite beeinflussen (Black, 2003;Zahler, 2005;Caceres, 2002).

3.1.5. Typen von alternativem Splicing

Manche Gene werden spezifisch auf eine regulierte Art und Weise in bestimmten Geweben alternativ gespleißt, daher gibt es zusätzliche Mechanismen, die die Genexpression und die Generation von verschiedenen Proteinen regulieren. Die Typen von alternativem Splicing (siehe Abb.3.1.5.1.) steuern diese regulatorische Mechanismen und spielen eine essentielle Rolle in verschiedenen Zellprozessen, wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zelltod (Chen, 2009)

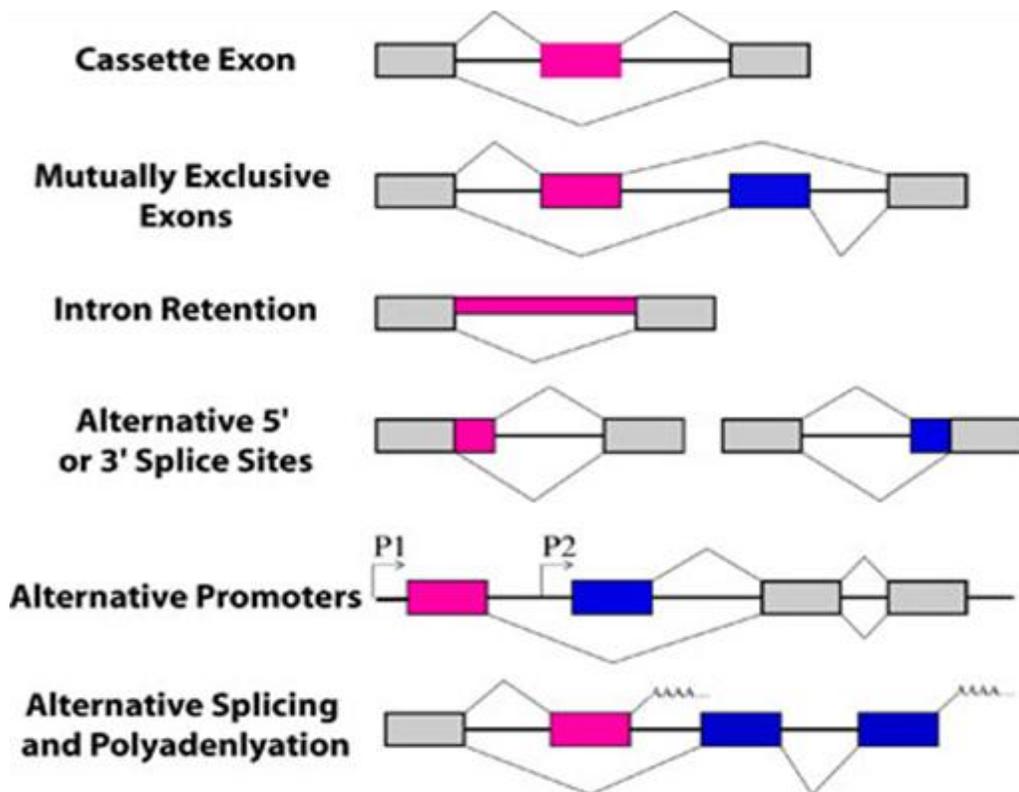


Abbildung 3.1.5.1.: Formen von alternativem Splicing: Exons sind durch Boxes und Intros durch Linien dargestellt. Konstitutive Exons sind in Grau gefärbt und Exons, die mit alternativem Splicing zu tun haben, sind in Blau und Rosa gefärbt. Promotoren sind mit Pfeilen und Polyadenylierungs-Seiten mit AAAA angegeben (Zahler, 2005).

Kassettenexons oder multiple Kassettenexons: Bei den Kassettenexons werden einzelne Exons oder multiple Exons in eine mRNA gespleißt. Dabei kann das Exon (in Rot) entweder aus dem primären Transkript ausgelassen (Exon Skipping) oder beibehalten werden (Zheng, 2005).

Intron Retention/Beibehalten von Introns: Dabei können Sequenzen zwischen zwei Exons, die man als Intron bezeichnet, entweder herausgeschnitten werden oder in der mRNA verbleiben.

Benutzung unterschiedlicher 5' oder 3' Spleißübergänge (alternative 5'/3' splice site): Exons besitzen 5'/3' Spleißübergänge. Dabei werden alternative Promotoren oder alternative Polyadenylierungsstellen benutzt (Zahler, 2005; Black, 2003).

3.1.6. Splicing Faktoren: SR-Proteine und Enhancers/Silencers

Während des alternativen Splicings ist es entscheidend, welches Exon entfernt und welches in der RNA inkludiert wird. Die Auswahl wird durch RNA sequenz-Elemente und Protein-Regulatoren bestimmt. Aber das ist von der Position und Funktion von cis-regulatorischen Elementen abhängig, die in 4 Kategorien geordnet sind: exonic oder intronic splicing Enhancers (ESE, ISE), die zu einer Verstärkung der Transkription führen, oder Silencers (ESS, ISS), die zur Hemmung der Transkription führen. Andere Elemente sind SR-Proteine, die an ESEs durch ihre RNA Bindungsdomäne binden, wobei das Splicing durch die Rekrutierung von spliceosomalen Elementen anhand der Protein-Protein-Interaktion zwischen ihren arginin-serin-reichen Domänen gefördert wird. **ESEs** werden normalerweise von Mitgliedern der SR-(ser-Arg)-Proteinfamilie gebunden (Long, 2009). **ISSs und ESEs** sind typischerweise an heterogene nuclear RNPs (hnRNPs) gebunden, welche eine oder mehrere RNA-bindungsdomäne und Protein-Protein Interaktionsdomänen haben (Dreyfuss, 2002). **ISEs** werden nicht wie die anderen drei Typen von Elementen charakterisiert, obwohl vor kurzem mehrere Proteine wie hnRNP-F, hnRNP-H, neuro-oncological ventral antigen 1 und 2 (NOVA1 und -2), FOX1 und FOX2 (auch bekannt als RBM9) entdeckt wurden, die die ISEs binden und dadurch das Splicing stimulieren (Chen, 2009) In der Box 3.1.6.1. sind einige SR-Proteine, RS-domäne-containing Proteine gelistet, die in alternativem Splicing involviert sind.

BOX: 3.1.6.1. SR Proteine und Ribonukleotide

SR-(Ser-Arg)-Proteine sind eine Familie von Kernfaktoren, die eine wichtige Rolle beim alternativen Splicing der mRNA spielen. Sie sind in einigen Schritten der Regulation des Splicings durch Bindung der ESEs anhand ihrer RNA recognition motifs (RRMs) und vermittelnder protein-protein und perhaps protein-RNA Interaktionen, welche nur durch ihre RS-(Arg-Ser repeat-containing)-Domäne möglich ist, involviert. Die meisten SR-Proteine haben eine ähnliche Struktur mit einer oder zwei ribonukleoprotein-partikeln-(RNP)-typ-RNA-bindung-Domäne am amino Terminus und einer variablen-lange-Domäne am carboxyl Terminus (RS-Domäne), die an Arg-Ser-Dipeptiden reich ist, die weitgehend phosphoryliert sind. Sie funktionieren als Aktivatoren und Regulatoren in multiplen Aspekten des mRNA-Metabolismus, wie z.B. bei nonsense-mediated mRNA decay (NMD) und Translation (Sanford, Gray et al. 2004; Zhang and Krainer 2004; Chen and Manley 2009)(Long, 2009).

SR-Proteine			
Name	Domäne	Bindungssequenz	Zielgen
ASF/SF2 (SFRS1)	RRM, RRMH und RS	RGAAGAAC	HIPK3, CAMK2D, HIV RNAs
SC35 (SFRS2)	RRM und RS	UGCUGUU	ACHE und GRIA1–GRIA4
SRp20 (SFRS3)	RRM und RS	GCUCCUCUUC	SRP20, CALCA und INSR
SRp75 (SFRS4)	RRM, RRMH und RS	GAAGGA	FN1, E1A und CD45
SRp40 (SFRS5)	RRM, RRMH und RS	AGGAGAAGGGA	HIPK3, PRKCB und FN1
SRp55 (SFRS6)	RRM, RRMH und RS	GGCAGACCUG	TNNT2 und CD44
9G8 (SFRS7)	RRM, zinc finger und RS	(GAC) _n	TAU, GNRH und SFRS7
SRp30c (SFRS9)	RRM, RRMH und RS	CUGGAUU	BCL2L1, TAU und HNRNPA1
Involvierte Ribonukleotide in prä-RNA Splicing			
Name	Domäne	Bindungssequenz	Zielgen
hnRNP A1	RRM, RGG und G	UAGGGA/U	SMN2 und RAS
hnRNP A2	RRM, RGG und G	(UUAGGG) _n	HIV tat und IKBKAP
hnRNP C1/AUF1	RRM	U reich	APP
hnRNP F	RRM, RGG und GY	GGGA und G reich	PLP, SRC und BCL2L2
hnRNP G	RRM und SRGY	AAGU	SMN2 und TMP1
hnRNP H/DSEF1	RRM, RGG, GYR und GY	GGGA und G reich	PLP, HIV tat und BCL2L1
hnRNP I/PTB	RRM	UCUU und CUCUCU	PTB, nPTB, SRC, CD95, CALCA
hnRNP L	RRM	C und A reich	NOS und CD45
hnRNP LL/SRRF	RRM	C und A reich	CD45
hnRNP M	RRM und GY	NB	FGFR2
hnRNP Q	RRM und RGG	CC(A/C)	SMN2
RRMH, RRM homologie; NB, nicht bestimmt. (Long, 2009)			

3.1.7. Effekte von Mutationen in alternativem Splicing

Erst vor kurzem wurde entdeckt, dass die meisten humanen Gene durch alternatives Splicing mehr als eine mRNA exprimieren. Dadurch entsteht eine große Diversität von Isoformproteinen, deren Expressionsmuster durch verschiedene regulatorische Programme gesteuert werden. Auf diese Weise ist das alternative Splicing eine der wichtigsten Niveaus der Genregulation, die bei allen Differenzierungsprozessen höherer Organismen eingreift. Im Laufe der Zeit hat sich herausgestellt, dass Defekte im Spleißmechanismus Ursache oder Verstärker bei einer Varietät menschlicher Krankheiten - darunter Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen - sind. Mutationen an einer Spleißstelle, die eine richtige Trennung von Exon- und Intronssequenz verhindern, sind zum Beispiel Ursache für genetische bedingte Krankheiten wie beta-Thalassämie, die durch eine Störung der Hämoglobinsynthese verursacht wird. Auch die Schwere kombinierte Immundefizienz (SCID), die durch eine Fehlsteuerung der Lymphozytenentwicklung verursacht wird (Faustino, 2003).

Mutationen in der Sequenz von Exons und Introns könnten die korrekte Prozessierung der mRNA durch Störung der Spleißseite 5'-3', ESE, ESS, ISE oder ISS beeinträchtigen. Im Fall von nonsense Mutationen wird vermutet, dass Defekte des Splicings in ESE und ESS mit zwei anderen möglichen Mechanismen assoziiert sind. (1) Nonsense mediated decay (NMD) bewirkt bei Vorliegen eines prä-termination Stopcodons (PTC) Degradation der gesamten mRNA. Wenn nun infolge dieses Vorgangs könnte die Anzahl einer exon geskippten Isoform vergrößert werden. Der zweite Mechanismus – das Nonsense Altered Splicing (NAS) - ist widersprüchlicher. Bisher ist es unklar, mit welcher Häufigkeit diese Mutationen beim Splicing am Angriff der Krankheiten beteiligt sind. In einer Studie, wo die Mutationen nur auf die standard consensus Spliceseite beeinträchtigen, ergab 15% der Punktmutationen in einer human genetischen Krankheit durch RNA Splicing-Defekten. In Studien von Neurofibromatosis Typ 1 (NF1) und Ataxia Telangiectasia (ATM), die auf DNA- und RNA-Niveau analysiert wurden, zeigten, dass ungefähr 50% der untersuchten Patienten auf Grund von Mutationen erkrankt waren, und dass diese Mutationen aus Defekten in Splicing resultiert haben. Von diesen Mutationen 13% und 11% wurden nur als framshift, missense oder nonsense Mutationen mis-Klassifiziert. Die missense oder selbst die sense Mutationen könnten als Verantwortliche für den Aminosäuren-Austausch betrachtet werden, der dramatische Effekte auf die Prozessierung der prä-mRNA hat. Nun es

könnte wahrscheinlich sein, dass ein signifikantes Prozent der Mutationen in vielen anderen Genen in der Alteration des Splicings involviert ist. In dem Fall von familiärem Ovarial- und Brustkrebs sind etwa 4% der genetischen Varianten in der BIC-Database (Breast Cancer Information Corfe) als Alterationen der Spliceseiten berichtet. Allerdings zahlreiche Variationen in missense-Sequenzen (verantwortlich für 25% aller berichteten Mutationen) sind mit der Predisposition zu Brustkrebs assoziiert, noch ist die funktionelle Signifikanz der Mehrheit dieser Mutationen unbekannt (Baralle, 2005).

Alternativ gespleißte Exons sind oft durch kurze und degenerative Spleißseiten charakterisiert. Diese Seiten reflektieren die reduzierte Affinität für splicesomal Proteine. Die Erkennung von alternativen Exons ist durch eine zusätzliche Ebene von Information moduliert, die von den cis-acting-Elementen (non splice site RNA sequence elements) stammt. Ein Beispiel ist SRp55 und sein Antagonist hnRNP I/PTB, der das Splicingsprofil von FGFR-1 kontrolliert. Das Skipping des α -Exons ergibt die Produktion von FGFR1- β -Isoformen, welche eine hohe Affinität für FGFs haben. Eine häufige Eigenschaft von Krebszellen ist die Deregulation des Splicings, welche zur Expression von tumorspezifischen Varianten führt. Die Deregulation ist meistens durch Änderungen in Signalwegen und durch Variationen in Konzentration, Lokalisierung und Aktivität von trans-acting-Regulatoren gefördert. Veränderungen des Splicingsprofils ist ein einfaches „noise“-Event in Krebszellen und hat eine direkte Rolle in der Tumorigenese. Veränderte Splicingsprofile könnten auf Grund der Inaktivierung von onkosuppressor- Genen oder gain of function von Proteinen in Krebskrankheiten und in Tumorprogression involviert sein (Ghigna, 2005).

Cis-Acting Mutationen sind hereditäre oder somatische Mutationen, die das Splicing beeinträchtigen. Nach ihrer Position und Effekt auf Splicing könnten diese Mutationen in zwei Subklassen katalogisiert werden: Subklasse I (60% der Fälle) basiert auf Splicingsmutationen in unvarianten Spleißseiten. Diese Mutationen sind mit multiplen Erkrankungen assoziiert. Subklasse II ist oft mit einem relativ milden Phänotyp und Mutationen in den varianten Motifs (sowie alternativer splicing poly-pyrimidin Trakt) und mit Intron-Mutationen, die kryptische Donor- und Akzeptor-Seiten generieren, assoziiert. Ein Beispiel dafür ist das Tumorsuppressor p53-Gen, das sehr oft in humanen Krebserkrankungen vorkommt. Stille Mutationen im p53-Gen stellen Spleißseiten in der Mitte eines Exons her, was zur Beeinträchtigung des Splicings kommt. Aber es gibt auch

Mutationen in nicht kodierenden Regionen, die das Splicing von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen beeinträchtigen. Mutationen im APC-Gen verursacht die familiäre adenomatöse Polyposis coli (FAP). Kürzlich wurde von einer APC-Mutation berichtet, die durch eine Insertion eines einzelnen T zwischen der zweiten und dritten Position des Introns 4 des APC-Gens Skipping von Exon 4 und Expression von verkürzten Proteinen führt. Mutationen in splicing regulatorischen Elementen ESE und ESS-Sequenzen können auch das Splicingsprofil stören. Ein Beispiel sind Mutationen im tumorsuppressor-Gen BRCA1, die in Ovar- und Brustkrebs vorkommen. Hier wird nachgewiesen, dass eine hereditäre nonsense Mutation innerhalb des Exons 18 ein ESE-Element (die Bindungsseite für SR-Factor SF2/ASF) stört und das Exon-Skipping auslöst. Manche nonsense Mutationen in der kodierenden Region sind mit Exon-Skipping assoziiert. Eine doppelte Punktmutation in Exon 7 des neurofibromatosis 1 (NF1)-Gen stört die konsensus Bindungsseite für SR-Faktoren, SC35 und SF2/ASF, wobei das Exon-Skipping gefördert wird. Ähnliche Beobachtungen wurden mit einer großen Anzahl von anderen tumor-assoziierten Genen wie *BRCA2*, *FHIT*, *KIT*, *MLH1*, *MDM2*, *MSH2* und *LKB1* beobachtet. Splicingsdefekten könnten als ein Weg betrachtet werden, in dem Genmutationen die Tumorigenese auslösen (Ghigna, 2005).

Die Expression von HDMX-S, eine Spleißform von HDMX (oder MDM4)-Gen, wurden als ein unabhängiger Prognostic-Faktor für geringes Überleben in Patienten mit Weichteilsarkomen vorgeschlagen und Δ NP73, eine Splicing Isoform des P53-Homologs P73, scheint ein negativer unabhängiger prognostischer Marker in Patienten mit Neuroblastomen zu sein (Bartel, 2005; Romani, 2003).

Vor kurzem wurde das Vorhandensein eines Splicing-Codes beschrieben, der eine Kombination von hunderten charakteristischer RNAs nutzt, um abhängige Modifikationen in Geweben beim alternativen Splicing für tausende von Exons zu prognostizieren. Der Code bestimmt ganze Klassen von Splicingsmustern, identifiziert sogar verschiedene regulatorische Programmen in unterschiedlichen Geweben. Der Code detektiert auch eine Klasse von Exons, deren Inklusion die Expression in Geweben von adulten Organismen durch Aktivierung des nonsense mediated messenger RNA decay (NMD)-Mechanismus stilllegt, aber dessen Exklusion die Expression während der Embryogenese fördert. Das könnte hilfreich sein, um alternativ gespleißte Gene in Krebserkrankungen zu detektieren. In

Konkret erleichtert der Code die Entdeckung und ausführliche Charakterisierung der Regulation des alternativen Splicings auf eine genom-weit Skala (Barash, 2010).

3.2. Minigenen für die Studie des alternativen Splicing

Im Laufe der Zeit wurde eine neue Technologie entwickelt, um verschiedene internen regulatorischen Zellprozessen in Vivo und in Vitro zu beschreiben, in dem Minigene (umgebaute Plasmide/Vektoren) eingesetzt wurden. Minigene kodieren für fluoreszierende Proteine und ermöglichen somit die direkte Beobachtung von alternativen Spleißvorgängen in lebenden Zellen und Tieren. Diese Art von Reportersystemen wurde in transgen-Mäusen angewendet, um die Regulation des Splicings in verschiedenen Geweben und Zelltypen zu visualisieren. Einer der Gründe für die Konstruktion dieser fluoreszierenden Reportersysteme ist die Studie von Trennungsmechanismus zwischen Exons und Intronsequenzen sowie auch den Funktionsmechanismen von regulatorischen Elementen in alternativem Splicing unter anderen. Daher wurden Gene von Interesse in ein Minigen eingebaut, das das „Control-Exon-Prinzip“ zur Identifizierung von cis-acting-Elementen nutzt, welche die Aktivität von konstitutiven und alternativen Exons steuern, mit dem Vorteil unbekannte trans-acting-Faktoren zu detektieren, die an diese Elemente binden und das Splicing modulieren (Cooper, 2005;Bonano, 2006;Bonano, 2007).

3.2.1. Fluoreszierende Reportersysteme (Minigene)

Der Grund für die Konstruktion der fluoreszierenden Reportersysteme war die Studie der Regulation des alternativen Splicings und der daran beteiligten internen Splicingelemente (Cooper, 2005). Ein elegantes Beispiel für die Regulation dieser Isoform-Diversität ist die Produktion von FGFR2-Transkripten, die zur Produktion von zwei Isoformen FGFR2 (IIIb) und (IIIc) führen. Das Isoformprodukt braucht eine koordinierte Regulation der alternativen Inklusion von Exon IIIb und IIIc. Dieser Vorgang ist durch flankierte intronic splicings Silencers und Polypyrimidin Trakt-Bindungsprotein (PTB) vermittelt. Zur Visualisierung des Splicings in Vivo wurde ein Konstrukt entwickelt, das aus der enhanced GFP-Gensequenz (EGFP) zur Produktion von grün fluoreszierenden Proteinen aufgebaut ist. Er liefert Information über das Silencing des Exons IIIb. Als Kontrolle wurde ein rot fluoreszierender Proteinreporter gebaut, der aus dem DsRed-Gen besteht, der mit dem gleichen Prinzip wie der EGFP-Reporter funktioniert. Beide Reportersysteme haben gezeigt, dass für das Silencing von Exon IIIb in verschiedenen Organen und Zelltypen das intronic

silencer Element erforderlich ist. Das Silencing von Exon IIIb ist von dem kombinierten Effekt zwischen einem exonic splicing Silencer (ESS) und zwei flankierten intronic splicing Silencers (ISS) abhängig. Die ISSs, upstream intronic splicing Silencer (UISS) und intronic control Element (ICE), und die Bindungsseite für PTB, sind für das vollständige Silencing des Exons erforderlich. Die Rekrutierung von diesen Seiten führt zum Skipping (Exklusion) von Exon IIIb. In Neuronen beispielsweise, wo PTB nicht exprimiert wird, wurde eine starke silencer-abhängige Repression von Exon IIIb beobachtet, was zu der Vermutung gekommen ist, dass die Nervenparalogie (=neural paralog), Gehirn PTB, diese Funktion übernehmen kann (Bonano, 2006).

Diese zwei Reporteren (Gint und Rint) waren die Basis für die Konstruktion eines bi-fluoreszierenden Plasmides, der eine seltsame Eigenschaft von fluoreszierenden Protein kodierenden Regionen benutzt, um zwei verschiedene fluoreszierende Proteine RFP und GFP aus einem einzelnen alternativen Splicing Event zu exprimieren. Es gibt mono- und bichromatische fluoreszierende Reportersysteme. Ein monochromatisch fluoreszierendes Plasmid erzeugt die Emission eines einzelnen Lichtstrahles bei einer bestimmten Wellenlänge. Bichromatisch fluoreszierendes Plasmid ist Fähig, zwei einzelne Lichtstrahlen gleichzeitig bei verschiedenen Wellenlängen zu produzieren (Orengo, 2006; Orengo, 2006). In Addition Gewebefaktoren spielen auch eine entscheidende Rolle in der Regulation des Silencings von Exon IIIb oder IIIc. Für Studie des Silencings von Exon IIIb und IIIc in Vivo bzw. in transgen Mäusen wurde fluoreszierende Reportersysteme adaptiert, die enhanced GFP-Expression als eine Indikation für das Silencing entweder von IIIb oder IIIc nutzen (Bonano, 2007; Bonano, 2006).

3.2.2. Grundstruktur

Die Basis für die Konstruktion *monochromatischer* fluoreszierenden Plasmide sind Vektoren wie pcDNA6/V5/His und pEGFP-N1, die aus CMV-Promotors, MCS-Seiten, Resistenzkassette, unter anderen (CMV, cytomegalovirus; MCS, multiple cloning sites) bestehen. Es wurden auch Cloning-Strategie angewendet, um die Grundstruktur dieser Plasmide bzw. die EGFP-und dsRed-Gensequenz zu modifizieren und dadurch in die modifizierte Segmenten des Plasmides eine MCS zu inserieren (Bonano, 2007).

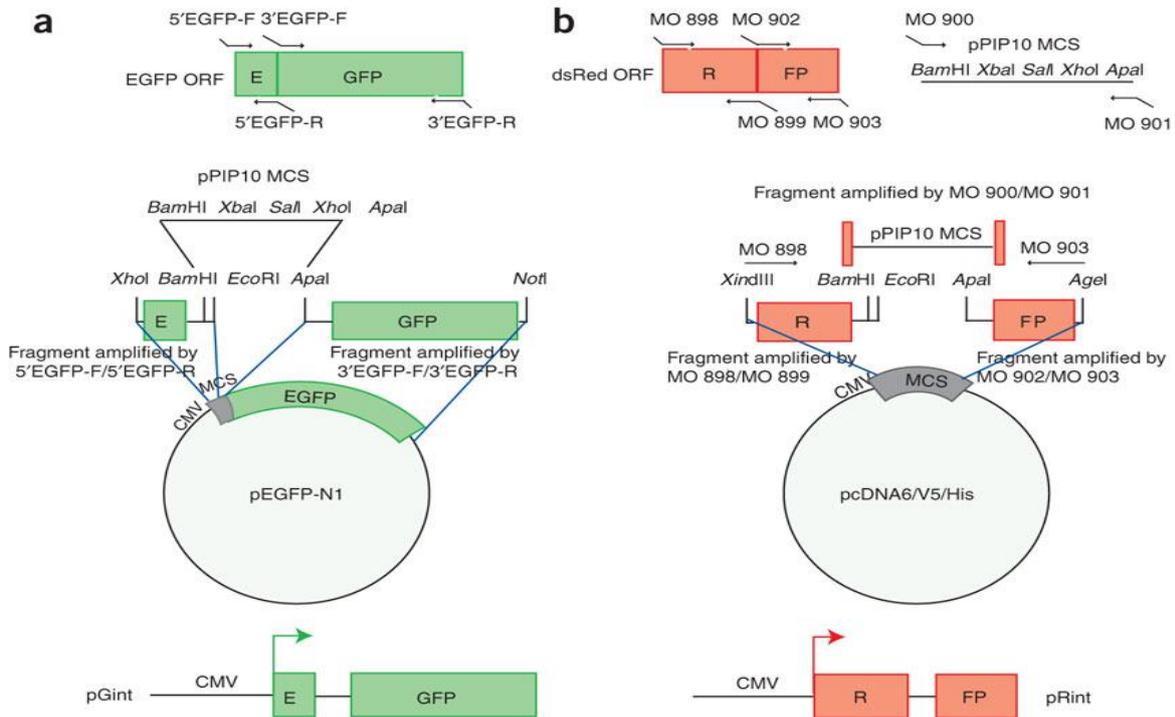


Abbildung 3.2.2.1.: Cloning Strategie zur Herstellung von monochromatischen fluoreszierenden Gint und Rint –Reporters (Bonano, 2007)

a) Schematisches Diagramm der angewendeten Strategie für die Konstruktion des Gint-Reporters, um die intron-Region innerhalb des open reading Frames (ORF) des enhanced GFP (EGFP) zu inserieren. 5' und 3'-Spleißseiten, branch point und polypyrimidin Trakt wurden in der Position 146 von EGFP-ORF mittels PCR-Amplifikation und Primer (siehe Abb. 3.2.2.1.) inseriert. Multicloning Site (MCS) wurde innerhalb des zuerst inserierten Intron durch Restriktionsverdauung eingebaut.

b) Insertion der Intronsequenz innerhalb des DsRed-ORF für die Konstruktion von Rint-reporter. Es wurde das gleiche Verfahren wie mit Gint durchgeführt nur mit anderen Primern (siehe Abb. 3.2.2.1. (b)). Konsensus 5' und 3'-Spleißseiten, branch point und polypyrimidin Trakt wurden in der Position 369 des DsRed ORF durch PCR-Amplifikation inseriert (Bonano, 2007).

Die Basis für die Konstruktion *bichromatischer* fluoreszierenden Plasmide (RG6, pRGIIIc, etc.) waren drei Vektoren pEGFP-N1, pcDNA3.1HisC und pCX-dsRed. Aus pEGFP-N1 wurde mittels PCR das EGFP-Fragment bis zum Translations-Initiations Codon von EGFP amplifiziert. Der EGFP-ORF wurde in pcDNA3.1HisC gelegt, in dem der Xpress Tag durch den FLAG-epitop-Tag und ein downstream Nuclear Localization Signal (NLS)

ersetzt wurden (siehe Abb. 3.2.3.1. B). Der Teil NLS dient zur Erhöhung der Konzentration des fluoreszierenden Proteins im Zellkern, um ihre Lokalisation und somit Detektion zu erleichtern. Der DsRed-ORF wurde aus pCX-dsRed außerhalb seines Initiation Codons mittels PCR amplifiziert. Die DsRed-Sequenz wurde vor das EGFP gelegt, so dass der alternierte ORF von dsRed im Leserahmen mit dem abwärts gelegenen EGFP war. (Siehe Abb. 3.2.2.2.) (Orengo, 2006).

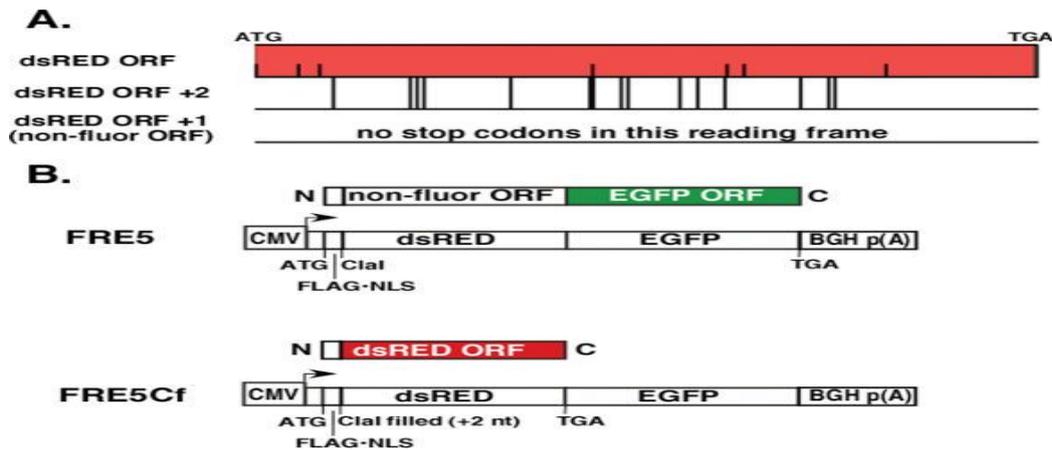


Abbildung 3.2.2.2.: Grundstruktur von FRE5 und FRE5Cf Plasmid (Orengo, 2006)

FLAG-tag oder FLAG-octapeptide ist ein polypeptide-Protein-Tag, das in Studien für chromatographische Affinität angewendet werden. Es kann auch in der Isolierung von Proteinkomplexen mit multiplen Untereinheiten genutzt werden. Ein FLAG-Tag kann in verschiedenen Assays angewendet werden, die die Erkennung durch einen Antikörper erforderlich ist. Wenn es keinen Antikörper gegen das zum analysierenden Protein gibt, ist es möglich, eine spezifische Sequenz zu addieren, die die Erkennung der FLAG-Tag-Sequenz ermöglicht. Beispiele sind zelluläre Lokalisationsstudien durch Immunfluoreszenz oder Detektion durch SDS-Page Protein-Elektrophorese. Es kann in Zusammenhang mit anderen Tags zum Beispiel einem Polyhistidine Tag (His-Tag), HA-Tag oder myc-Tag benutzt werden. Die Struktur der FLAG-tag wurde so optimiert, dass kompatible Proteine daran hängen können, die mehr Hydrophil sind als andere vorkommende Epitope-Tags. Deswegen ist es weniger wahrscheinlich, Proteine zu denaturieren oder zu inaktivieren, an denen es befestigt sind. Es kann mit dem C-Terminus oder dem N-Terminus eines Proteins fusioniert werden (<http://en.wikipedia.org/wiki/FLAG-tag>).

3.2.3. Aufbau und Funktion bichromatisch fluoreszierender Plasmiden

3.2.3.1. Vektor FRE5

In der Abbildung 3.2.2.2. (A und B) ist eine schematische Darstellung des Vektors FRE5 zu sehen. Zum Testen und zum Bestimmen, ob der individuelle Leserahmen des erwarteten Proteins exprimiert wird, wurden zwei einzelne Expressionsplasmide für den Leserahmen von DsRed oder von EGFP generiert und zwar FRE5 (EGFP) und FRE5Cf (DsRed). Bezogen auf die Abbildung 3.2.2.2. (A) sind drei verschiedenen ORFs von DsRed zu sehen: die ersten zwei Bezeichnungen „dsRED-ORF und dsRED-ORF +2nt“ gehören zum modifizierten FRE5Cf-Plasmid und dsRED-ORF +1 gehört zum originalen Plasmid FRE5. Dieser dsRED-ORF +1 ist der alternierende Leserahmen, der mit dem ORF von EGFP fusioniert ist. In den mRNAs beginnt die Translation von dem gleichen Startcodon in der Position 90 der mRNA und beide Proteine enthalten einen N-Terminal FLAG-epitope-Tag für die Detektion anhand Western Blot und einen NLS-Anteil, um die Lokalisierung der fluoreszierenden Proteine im Zellkern zu erleichtern. Das erwartete exprimierte Protein von FRE5 enthält den alternierenden Leserahmen von DsRed (231 Aminosäuren), der mit EGFP fusioniert ist, was ein Proteinprodukt von 498 As (MW=55.7 kDa) ausmacht. FRE5Cf-Plasmid wurde aus dem FRE5 durch das Ausfüllen in einer einzigen Restriktionsstelle ClaI zwischen FLAG-NLS und dem ORF von dsRed (MW=29.4kDa) entwickelt, in dem 2 Nukleotide addiert wurden. (Sehe Abbildung 3.2.3.1.1.)

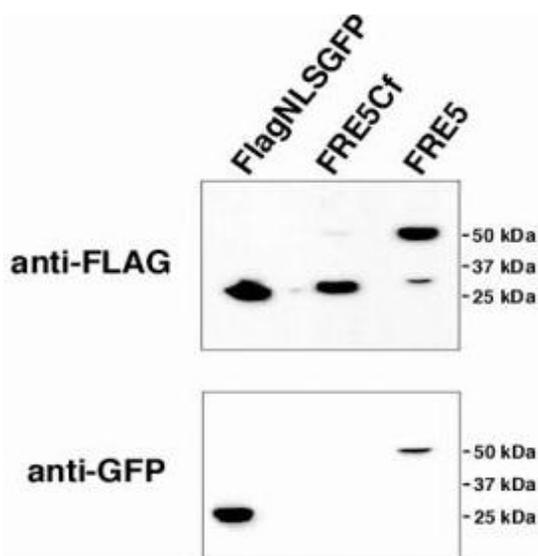


Abbildung 3.2.3.1.1.: Expression von DsRed und EGFP aus den mRNAs von FRE5 und FRE5Cf zusammen mit den alternierenden open reading Frames (ORFs). Die Western Blot Analyse zeigt eine effiziente Expression von FRE5 (EGFP) und FRE5Cf (DsRed) FLAG-gezielten Proteinen. FlagNLSGFP ist eine FLAG-gezielte Version von GFP, in dem es als positive Kontrolle genutzt wurde (Orengo, 2006).

Diese Modifikation um 2 nt schaltet den Leserahmen auf DsRed um. Beide Plasmide wurden einzeln in COSM6-Zellen transfektiert. Die Western Blot-Ergebnisse zeigen die

Nutzung von FLAG-Antikörper zur Detektion der Expression von FRE5 und FRE5Cf durch generierte FLAG-tag-Proteine, die erwartete Größe haben. Es wurden auch andere Proteine entdeckt, die mit der Expression einer minimalen Menge an lange (FRE5Cf) und trunkierte (FRE5) Proteine und mit dem FLAG-epitope assoziiert sind. Das kleine FRE5-Protein war länger als GFP (Sehe Abb. 3.2.3.1.1. in anti-GFP). Die Antikörper für EGFP haben nur das erwartete Protein aus dem FRE5-Plasmid detektiert. Dies beweist, dass das kleine Protein nicht an die Initiation aufwärts von EGFP beteiligt war und es keine Interferenz auf die Fluoreszenz von GFP produziert (Orengo, 2006).

3.2.3.2. Aufbau und Funktion von RG6

RG6 wurde aus dem FRE5-Plasmid durch die Insertion von PCR-generierten Fragmenten entwickelt, die die Introns 4 und 5 des chicken cardiac troponin T-Gens beinhalten. Die cTNT-Genfragmente besteht aus den natürlichen Introns 4 und 5, einem künstlichen Exon, der den natürlichen Exon5 des cTNT-Gens ersetzt wurde (Sehe Abbildung 3.2.3.2.1.), und einer 3'-Spliceseite des Intron 5, der 35 zusätzliche Nukleotide des Exons 6 beinhaltet. In den 35 nt des Exons 6 befinden sich Purin-reichen Elementen, welche die Funktion eines exon-splicing-Enhancer (ESE) ähneln (Xu, 1993;Orengo, 2006).

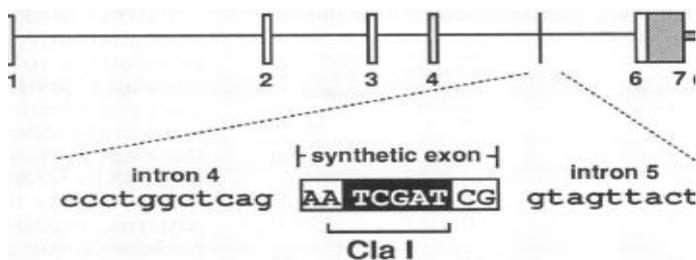


Abbildung 3.2.3.2.1.: Synthetischer Exon ist zwischen Intron 4 und 5 dargestellt, der den normalen Exon5 des cTNT-Gens ersetzt (Xu, 1993)

Der künstliche Exon ist durch Restriktionsseite flankiert, die nur in RG6 vorkommen. Um die Funktion von RG6 zu testen, wurden zuerst zwei zusätzliche Plasmide generiert: RG6ME (minus Exon) und RG6PE (plus Exon). Beide Vektoren wurden mit der cDNAs von RG6 gebaut, die aus den mRNAs von zwei Expressionsvorgängen „Inklusion (RG6PE) oder Skipping des Exons“ (RG6ME) gewonnen wurden. Die XbaI/AgeI-Fragmenten aus den amplifizierten PCR-Produkten, die aus den gespleißten RG6-mRNAs hergestellt wurden, in denen den alternativen Exon inkludiert oder abgebaut ist, wurden in der XbaI/AgeI-Stelle des RG6-Plasmiddes kloniert (Sehe Abbildung 3.2.3.2.3. A) (Orengo, 2006)

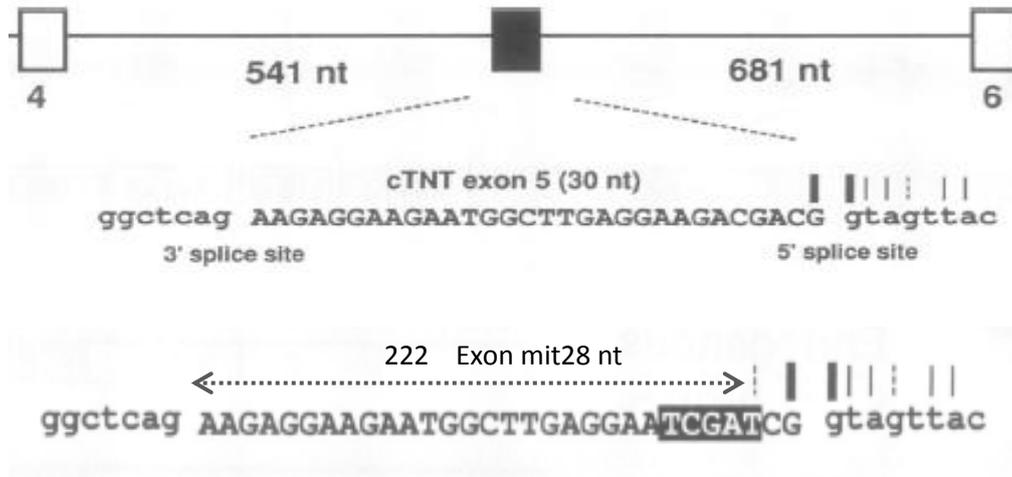


Abbildung 3.2.3.2.2.: Darstellung der Ersetzung von cTNT-Exon5 (30 nt) durch einen künstlichen Exon (28 nt) (Xu, 1993).

Das Splicing von cTNT-Exon5 ist mit einer starken Ko-Expression von CUB-BP und ETR-3-Like Faktoren (CELF) und muskel-blind-like 3 (MBNL)-Proteinen verbunden, welche die Inklusion und Skipping des Exons fördern. Der natürliche cTNT alternative Exon ist 30 nt lang und würde den Leserahmen aufrechterhalten. Dadurch wurde den normalen Exon durch einen künstlichen Exon von 28 nt ersetzt (Sehe Abb. 3.2.3.2.2.), der den Leserahmen von DsRed (Exon Skipping) auf EGFP (Exon Inklusion) verschiebt oder umschaltet (Sehe Abb. 3.2.3.2.3. A). Der alternative Exon besitzt spezifische Restriktionsstelle, die eine einfache Manipulation der Region während des Splicing erlaubt. Die Länge sowie die Komposition des alternativen Exons wurden mit dem Zweck gebaut, das Splicing auszubalancieren. Die Äquivalenz der Expression von Inklusion oder Skipping von Exon wurde in COSM6-Zellen analysiert (Orengo, 2006).

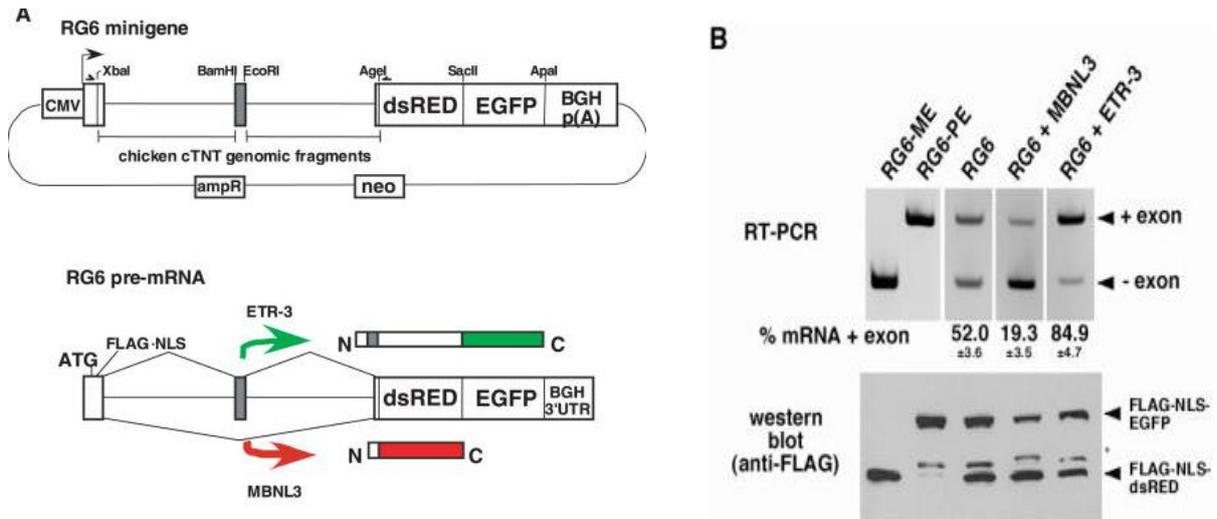


Abbildung 3.2.3.2.3.: Bichromatischer Reporter für cTNT. **A)** Alternatives Splicing von 28 nt Exon aus RG6, dabei ist die Verschiebung des Leserahmens zwischen DsRed und EGFP dargestellt. Restriktionsstellen XbaI/AgeI sind auch in RG6 gezeichnet. **B)** Transfektion von RG6 in COSM6-Zellen entweder alleine oder ko-exprimiert zusammen mit Xpress-ETR-3 (fördert Exon-Inklusion) oder mit FLAG-MBNL3 (fördert Exon-Skipping). RT-PCR-Analyse zeigt die Exon-Repression durch MBNL3 und Aktivierung durch ETR-3. Western-Blot-Analyse durch Anwendung von anti-FLAG-Antikörper zeigt die Expression von FLAG-gezielten EGFP- und DsRED-Proteinen. RG6PE und RG6ME sind Expressionsvektoren für die gepleißte mRNAs, in denen sich entweder das alternative Exon (RG6PE) oder keines (RG6ME) befindet. Die zusätzliche Bande in der RG6+MBNL3-Lane ist FLAG-MBNL3 (Orengo, 2006).

Die Bezeichnungen RG6ME (minus Exon) und RG6PE (plus Exon) bedeuten das Skipping des Exons im Fall von RG6ME oder die Inklusion des Exons (RG6PE). RG6 und die anderen Konstrukte RG6+MBNL3 und RG+ETR-3 wurden in spezifischen Zelllinien (C2C12 Myoblast-Kultur aus dem Skelettmuskel der Maus) transfiziert, wo entweder nur das Skipping von cTNT (durch Zugabe von MBNL3) oder seine Inklusion (durch Zugabe von ETR-3) oder beide in der Zelllinie COSM-6 stimuliert wurden. (siehe Abbildung 3.2.3.2.3 B). Nach Orengo, Bundman et al. 2006 enthält der Vektor RG6 den Exon 5 des cTNT-Gens, kann nur *in vitro* angewendet werden (Orengo, 2006).

3.2.3.3. Aufbau und Funktion von pRGIIIc

Der Konstrukt pRGIIIc ist der Strukturbasis von RG6 ähnlich. Die angewendeten Exon IIIc und Introns für die Konstruktion von pRGIIIc stammen von dem FGFR2-Gen der Ratte, die durch Amplifikation aus dem pRIIIc²-Minigen (Oltean, 2006) gewonnen wurde.

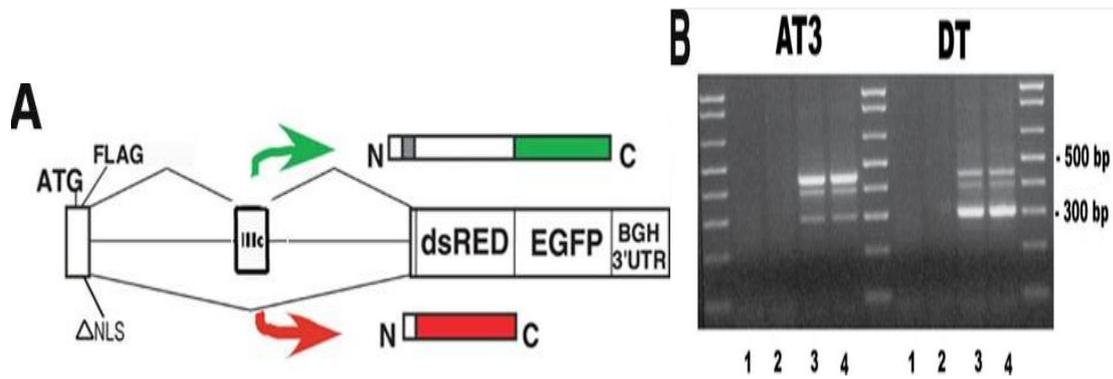


Abbildung 3.2.3.3.1: A) pRGIIIc-Konstrukt stellt die Inklusion des Exons IIIc von FGFR2 vor, in dem ein fusioniertes Protein im Rahmen mit EGFP synthetisiert wird. Aus dem Skipping des Exons IIIc von FGFR2 aus dem pRGIIIc resultiert die Synthese des rot fluoreszierenden Proteins (RFP) durch DsRed-Expression. **B)** RT-PCR-Analyse der total RNA von AT3- und DT-Zellen nach der stabilen Transfektion mit pRGIIIc zeigen unerwartete Produktsgrößen (446 bp für das Produkt, das Exon IIIc inkludiert und 301 bp für das Produkt, das Exon IIIc skippt). Die Band zwischen 446 und 301 bp repräsentiert ein Produkt, das den mini Exon IIIc beinhaltet, in dem die letzten 50 Basen des Exon IIIc fehlen. Lanes: 1 und 2 sind Kontrollen mit naiven Zellen der Ratte. Lanes 3 und 4 duplikates von Reaktionen aus AT3-RGIIIc oder DT-RGIIIc-Zellen (Oltean, 2008).

Diese wurden zwischen den XbaI und AgeI Seiten vom RG6 inseriert. pRGIIIc funktioniert nach dem Exon-Skipping-Prinzip, wo entweder ExonIIIc+EGFP oder nur RFP (DsRed) exprimiert wird. Dabei wurden zwei Zellmodellen ausgewählt. Eine ist Mesenchym-Like (AT3) und die andere ist Epithelium-Like (DT) Das Plasmid wurde in AT3- und DT-Zelllinie transfektiert, die Prostata-Tumorzellen der Ratte sind. DT-Tumorzellen exprimieren FGFR2(IIIb) gleich wie im normalen Prostata-Epithelium. AT3-Zellen schalten zur Isoform FGFR2(IIIc) um. DT- und AT3-Zellen könnten nützliche Systeme sein, um die epithelial-mesenchymal-Transition EMT und MET in Bezug auf Prostatakrebs zu evaluieren. pRGIIIc funktioniert durch das Prinzip „Exon-Skipping“ (Oltean, Febbo et al. 2008).

Die pRGIIIc-Transkripte, in denen den Exon IIIc von FGFR2 in AT3-Zellen (mesenchym-ähnlich) inkludiert sind, kodieren vorzüglich für EGFP (Sehe Abbildung 3.2.3.3.1. A und B). Die RT-PCR-Analyse haben zwei unterschiedliche Exon IIIc aus pRGIIIc detektiert: den normalen Exon IIIc und den mini-Exon IIIc. Der Unterschied liegt an der Länge des Exons. Exon IIIc hat eine normale Größe von 146 bp und mini-Exon IIIc ist 50 bp kürzer. Die obere schwache Band (446 bp) in DT (epithelium-like) vertretet eine geringe Expression von EGFP-Transkripten, in denen IIIc inkludiert ist. Die untere

schwache Band (301bp) in AT3 (mesenchym-like) vertrete die geringe Expression von DsRed-Transkripten, in denen Exon IIIc geskippt ist (Sehe Abbildung 3.2.3.3.1 B). Die geringe Expression von Exon IIIc in DT-Zellen (epithelium-like) stellt die Frage über die Mechanismen zur Transition von mesenchymal auf epithelialen Phänotyp. (Oltean, 2008).

Nach Oltean, Febbo et al. 2008 die Fähigkeit zur epithelial-Plastizität der DT- und AT3-Zelllinie ist nicht nur mit den Expressionsmustern der Transkripten assoziiert, sondern auch mit dem Phänotyp der Tumorzellen. Vor allem die DT-Zellen hat die Tendenz zu Metastasieren und in anderen Organen zu proliferieren, in dem diese Zellen ihren eigenen Phänotyp (Ephitelium-Like) umstellen. Deswegen kann die Anwendung von pRGIIC in Prostatakrebs-Zellen als Sensor für die EMT/MET-Plastizität betrachtet werden (Oltean, 2008).

4. Zielsetzungen der Diplomarbeit

Zur Rolle der Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR 1-4) in der Entwicklung von Weichteilsarkomen liegen nur begrenzte Informationen vor. In dieser Diplomarbeit soll daher ein Gesamtüberblick über die Expressionmuster der FGFR (1-4) in verschiedenen Weichteilsarkomen erarbeitet werden. Im Zuge dieser Analysen soll auch das alternative Splicing von FGFR2 in den Tumorzellen untersucht werden. Dafür soll ein Reporter-System eingesetzt werden, das mittels zweier fluoreszierender Reportergene das IIIc-„Exon-Skipping“ anzeigt (Oltean, Sorg et al. 2006).

Im Einzelnen sollten folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

1. Erstellung von Genexpressionsmustern aus STS von Menschen und Hunden sowie normaler Fibroblasten mittels RT_PCR.
2. Expression des Reportersystems pRGIIIc des FGFR-2 der Ratte für das IIIc-„Exon-Skipping“ in STS-Tumorzellen in *in Vitro*.
3. Suche nach ortho- und paralogen FGFR 2 IIIb/IIIc Sequenzen zwischen Mensch, Ratte und Reporter durch In Silico Analyse.

IV MATERIAL UND METHODEN

1. Zelllinien und Plasmide

Die angewendeten Zelllinien wurden aus dem ATCC erhalten und in der unteren Tabelle aufgelistet.

Tabelle 1.1. Zelllinien				
Name	Eigenschaften	Morphologie	Quelle	Medium
HTB-82	Rhabdomyosarkom	Epithelial	Gewebezucht Eisenbauer	McCoy's 5a
HTB-91	Fibrosarkom	Fibroblast	Gewebezucht Eisenbauer	Leibovitz's L-15
HTB-92	Liposarkom	Fibroblast	Gewebezucht Eisenbauer	Leibovitz's L-15
HTB-93	Synovialsarkom	Gemischt 60%	Gewebezucht Eisenbauer	Leibovitz's L-15
HTB-94	Chondrosarkom	Fibroblast	Gewebezucht Eisenbauer	Leibovitz's L-15
HT1080	Fibrosarkom	Epithelial	Gewebezucht Eisenbauer	EMEM+NEAA2
FCHT	Fibrosarkom	Epithelial	Gewebezucht Eisenbauer	RPMI + 10% FBS3
F2000	Fibroblasten	Fibroblast	Prof. Berger	RPMI + 10% FBS3
Wi38	Fibroblasten	Fibroblast	Prof. Sutterlüty	EMEM+NEAA2
HAUT	Fibroblasten	Fibroblast	Prof. Berger	RPMI + 10% FBS3
SW480	Kolorektalkarzinom	Epithel	Gewebezucht Sampl	MEM mit 10% FCS
CoFSA	Fibrosarkom (Hund)	Fibroblast	Prof. Hauck	DMEM+ 10% FBS 4
MBSa	Fibrosarkom (Hund)	Fibroblast	Prof. Hauck	DMEM+ 10% FBS 4
PSTS				Prof. Hauck
1. EMEM=Eagle's Minimum Essential Medium mit Non essential Amino Acids				
2. RPMI=Roswell Park Memorial Institut Medium mit 10% Fetal Bovine Serum				
3. DMEM=Dulbecco's Minimum Essential Medium mit 10% Fetal Bovine Serum				
Diese Liste stammt teilerweise aus der Diplomarbeit von (Steinhoff, H.A. 2009)				

1.2. Angewendete Vektoren

Alle Zelllinien wurden mit folgenden Vektoren transfektiert und sind in der unteren Tabelle aufgelistet.

Tabelle 1.2.1. Vektoren			
Vektor	Größe (bp)	Resistenz	Information
pDsRed2-N1	4.7 Kb	Kan/Neo	Clontech: Cat. Nr:632406
pEGFP-C1	4.7 Kb	Kan/Neo	Clontech: Cat. Nr:6084-1
pEGFP-F	4.8 kb	Kan/Neo	Clontech: Cat. Nr:6074-1
pRGIIIc12	8.3 kb	Amp/Neo	Garcia-Blanco (Labor: Dr. Klaus Holzman)

1.3. Materialliste

- Zellkulturschalen: Petrischalen mit Durchmesser von 6 cm und 10 cm; 24- und 96-well-Platten (Falcon Lincoln Park, New Jersey, Sarstedt), Sonic Seal Slides (Nalge Nunc International, Naperville IL)
- Trypsin/EDTA: Stammlösung = 20mM Trypsin, 2mM EDTA pH 7.4 (Gibco). Aus Stammlösung wird eine 1:10 Verdünnung in PBS hergestellt.
- PBS: Phosphatgepufferte Saline: 0,2/l KCL, 0,2 g/L KH₂PO₄, 0,049 g/l MgCl₂, 8 g/l NaCl; 1,15 g/l Na₂HPO₄
- PBS/EDTA: 10mM ETA in PBS
- Mediumzusätze: FCS: fötales Kälberserum (Frau Eisenbauer)
BSA: Rinderserumalbumin (Frau Eisenbauer)

Tabelle 1.3.1 Dichte der Zelle

Kulturschalen	Zelldichte
10 cm	1.3 x 10 ⁶
6 cm	5 x 10 ⁵
3 cm	2 x 10 ⁵
12 well-Platte	5 x 10 ⁴
24 well-Platte	2 x 10 ⁴
96 well-Platte	3 x 10 ³

Tabelle 1.3.2: Liste der verwendeten Primer zur Herstellung der entsprechenden FGFR und Isoformen

Gen	Spleißvarianten	Sequenz (forward, reverse)	Produktlänge (bp)	Primer
FGFR1	IIIb+c	TCCAGTGGCTAAAGCACATC ATCTGGCTGTGGAAGTCACTC	376	FR 5 FR 6
FGFR2	IIIb+c	AACGGGAAGGAGTTTAAGCAG CCACCATACAGGCGATTAAG	600	FR 11 FR 14
FGFR3	IIIb+c	AACGGCAGGGAGTTCCGCGGC GTCAGCCTCCACCAGTCTCCTC	531	FR 17a FR 17b
FGFR4	Isoformen 1-3	GATGGACAGGCCTTTCATGG TGCTGCGGTCCATGTGGGGTCTCCTC	525	FR 25 FR 26
FGFR5	Isoformen 1-3	CCGGACAGGCCGAGATGACG AGCCGCACGGAGCTACCCAC	523	FR 27 FR 28
Gen	Spleißvarianten	Sequenz (forward, reverse)	Produktlänge (bp)	Primer
FGFR1	IIIb	TCCAGTGGCTAAAGCACATC CCGCATCCGAGCTATTAATC	125	FR 5 FR 7
	IIIc	TCCAGTGGCTAAAGCACATC CGCCAAGCACGTATACTC	170	FR 5 FR 8
FGFR2	IIIb	AACGGGAAGGAGTTTAAGCAG CTCGGTCACATTGAACAGAG	417	FR 11 FR13
	IIIc	AACGGGAAGGAGTTTAAGCAG TGGCAGAAGTGTCAACCATGC	508	FR 11 FR 12
FGFR3	IIIb	AACGGCAGGGAGTTCCGCGGC CCCGTCCCGCTCCGACACATTG	429	FR 17 FR 19
	IIIc	AACGGCAGGGAGTTCCGCGGC CCCGGCGTCTCAAAGGTG	435	FR 17 FR 20
GAPDH		GCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAATGG CTGGGTGGCAGTGATGGCATGGACTG	356	II/78 II/79

¹ Bezeichnung der Primer in den Beständen der Arbeitsgruppe Prof. Holzmann
Diese Primerliste steht auch in der Diplomarbeit von (Steinhoff, H.A. 2009)

Tabelle 1.3.3.: Liste der verwendeten Primer zur Bestimmung folgender Vektoren (pRGIIIc, pEGFP-C1 und pEGFP-F)					
Vektor/Gen	Genexpression	Primer (forward/reverse)	Sequenz der Primer	Kombination der Primer (nach ClonManager V.9)	Größe der Amplikon in bp
pRGIIIc/FGFR2	Isoform IIIc der Ratte und EGFP	T7-Labor-Primer	GTAATACGACTCACTATAGGG	Vic_For_2 + Vic_Rev_2	208 bp -I, -IIIc; + NLS, ATG 354 bp -I; + IIIc, NLS, ATG 1645 bp + I, IIIc, NLS, ATG
		T7-Primer	TAATACGACTCACTATAGGG	T7_Labor_Primer + Vic_rev_2	212 bp -I, -IIIc; + NLS, +ATG 367 bp -I; + IIIc, NLS, ATG 1658 bp + I, IIIc, NLS, ATG
		Vic_For_2	GGATTACAAGGATGACGATGAC		T7_Labor_Primer + GFP6
		Vic_Rev_2	ACCTTGAAGCATGAAC		
		M13_F_Primer	GTAATACGACTCACTATAGGG	CFP_for + GFP6	797 bps nur EGFP
pEGFP-C1/pEGFP-F	EGFP	CFP_For	CCAGGTCAGGGTGGTCACGA	CFP_for + GFP6	434 bps
		GFP6	TCCTTGCTCAGGGCGGAC		

I=Intron, - oder + Introns=ohne oder plus Introns
 Bezeichnung der Primer in den Beständen der Arbeitsgruppe Prof. Klaus Holzmann

2. FGFR-Genexpression

2.1. RNA Isolierung

Es wurde nach den Protokollen vom Labor des Prof. Klaus Holzmann vorgegangen.

Material:

- Chloroform
- Isopropanol
- 75% EtOH
- RNaseInhibitor
- RNase freies H₂O

Jedes Pellet wurde aus einer T25 Flasche gewonnen und mit 0.5 ml Trizol lysiert (Invitrogen, Cat.No.15596-026). Trizol ist ein Reagenz, das Phenol und Guaninisozyanat hält. Es zerstört die äußere Zellwand sowie die interne Kernzellwand. Der Inhalt der Zelle wird freigesetzt. Wichtig ist es hier, dass steril gearbeitet wird, damit die RNA nicht durch RNasen abgebaut wird.

100µl Chloroform/ 500µl Trizol zum Zelllysate geben, die Eppis gut verschrauben, kurz vortexen und danach bei Raumtemperatur (RT) 2-3min. inkubieren.

Danach werden die Proben bei 12000g/15min./2-8°C abzentrifugiert, dadurch sind drei Phasen sichtbar: die unterste (organische) Phase, die Interphase und die oberste wässrige Phase, die die RNA enthält.

Dadurch ist es möglich, sowohl genomische DNA, als auch total-RNA und Proteinen zu extrahieren.

Fällung der RNA:

Die wässrige Phase wird möglichst vollständig (aber OHNE Interphase!) in ein neues Eppi überführt und der Rest für weitere DNA und Proteinisolierung aufbewahrt. Um die RNA zu fällen, werden der wässrigen Phase 250µl Isopropanol und 500µl Trizol zugefügt, gemischt und 10-15min. bei RT inkubiert. Die gefällte RNA wird dann

zentrifugiert (12000g/10min./2-8°C) und der Überstand abgenommen (RNA-Pellet meist gut sichtbar).

Waschen der RNA:

Das RNA-Pellet wird mit 75%EtOH// und 500µl Trizol gewaschen indem die Probe kurz gevortext und dann abzentrifugiert wird ((7500g/5min./2-8°C). Der Überstand wird vollständig abgenommen (wenn nötig downspinnen und letzten Rest des Überstandes wegnehmen).

Lösen der RNA:

Pellet bei RT ca. 10-30min. trocknen lassen. Zum Lösen der RNA inzwischen RNase freies H₂O mit RNaseInhibitor vorbereiten (200ml H₂O + 2µl RNase Inhibitor). Wenn das Pellet vollständig getrocknet ist, dann wird es in 30µl H₂O + RNaseInhibitor gelöst.

2.2. DNA-Isolierung

Material:

- 100% Ethanol
- 0,1M Sodium citrate in 10% Ethanol
- 75% Ethanol
- 8mM NaOH
- 0,1M HEPES
- 15mM EDTA

Die Isolierung der DNA erfolgt aus dem Trizolüberstand. Nachdem die wässrige Phase vollständig vom Trizolüberstand abgenommen wurde, wird die DNA aus Interphase und organischer Phase isoliert.

DNA-Fällung:

Die DNA wird mit 100%igem Ethanol gefällt. Pro 1 ml eingesetztem Trizol werden 0,3ml 100%iges Ethanol eingesetzt und durch invertieren gemischt. Probe(n) wird 2-3min. bei 15-30°C stengelassen und die DNA anschließend durch Abzentrifugieren (2000g für 5 min.) sedimentiert.

DNA waschen:

Überstand wird abgenommen und das DNA pellet zweimal in einer Lösung von 0,1M Na citrat in 10%igem Ethanol gewaschen.

1ml Lösung wird pro 1ml eingesetztem Trizol verwendet. 30 min bei 15 – 30°C auf dem Thermoschüttler gewaschen und anschließend in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert (2000g für 5min). Anschließend diesen Schritt wiederholen. Danach wird das Pellet in 75%igem Ethanol gelöst. Dazu verwendet man 1,5 – 2 ml pro 1 ml eingesetztem Trizol. 10-20 min. auf dem Thermoschüttler bei 15-30°C. Und wieder Zentrifugieren (2000g für 5 min.).

Lösen der DNA:

Der Überstand wird abgenommen und das Pellet lässt man luftrocknen. Wenn das Pellet trocken ist, wird es in 8mM NaOH gelöst. Das Lösen der DNA in einer schwachen Base ist vorteilhaft, da sich die

DNA in Wasser oder Tris Puffer nur sehr schwer löst. Danach sollte der pH- Wert mit HEPES auf pH 7-8 eingestellt werden. Anschließend wird mit EDTA auf eine Endkonzentration von 1mM gebracht. Wenn der pH-Wert eingestellt ist, kann die DNA bei -20°C oder 4°C gelagert werden.

2.3. cDNA-Synthese aus total-RNA

(RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas)

Die RNA muss immer auf Eis gehalten werden. Es muss immer während der Arbeit mit RNA Handschuhe getragen werden. Nach jedem Auftauen und auch vor der c-DNA-Synthese müssen die RNA Proben ca. 10 min bei 55-60 °C gelöst werden. Problem der Bildung von Aggregaten!

Alle Reaktionsansätze werden in PCR-Tubes (0,5 ml) auf Eis zusammenpipettiert.

1.Schritt

- FW und RW Primer werden mit total-RNA und ddH₂O im folgenden Verhältnis gemischt.
- Das PCR-Gerät (Omn-E, Hibaid) muss richtig (Temperatur) Programm 01_cDNA eingestellt werden.

+ 1 µg total-RNA (von allen RNAs sollte möglichst 1 µg eingesetzt werden)
+ 1 µl Random Hexamer Primer
+ X µl Nuclease Free Water (Kit)
= 12 µl

Es wurde hier nur 6 µl der t-RNA und 10,4 µl H₂O verwendet.

- Die Proben werden gevortext, kurz runterzentrifugiert und in PCR-Gerät gestellt.
- Sie werden danach 5 min bei 70 °C erhitzt. Dann werden sie 5 min auf Eis abgekühlt und kurz runterzentrifugiert.

2.Schritt

- Master Mix wird vorbereitet, um 8µl davon pro Probe hinzufügen.

+ 4µl 5xReaction Buffer
+ 1 µl Ribonucleaseinhibitor 20 U/µl (Kit)
+ 2µl dNTPs 10mM mix
+ 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase
= 8µl

- Das Gesamtvolumen pro Ansatz beträgt 20 µl.
- Die Ansätze werden kurz gevortext und runterzentrifugiert.
- Sie werden 15 min bei 28 °C inkubiert.
- Danach werden sie 60 min bei 42 °C inkubiert.
- Zum Schluss werden sie 10 min bei 70 °C erhitzt und 5 min auf Eis gestellt und runterzentrifugiert.

c-DNA wird je nach Verwendung mit autoklaviertem H₂O verdünnt. Das Verhältnis der Verdünnung ist 1:10. Bsp. 480 µl ddH₂O + 20 µl c-DNA.

2.4. Standard Polymnerase Ketten Reaktion (PCR)

Dieses Prinzip beruht auf total RNA Genexpression aus einem Gen von Interes und kann durch die Polymerase Ketten Reaktion qualifiziert und semiquantifiziert werden. Deswegen muss zuerst die total-RNA geerntet werden, damit es auf cDNA umgeschrieben werden kann. Bei der PCR werden aus allen Transkripts mehrere stabile doppelte stranded DNA hergestellt, die keine Introns-Sequenzen haben.

Die cDNA wird zuerst durch Erhitzen denaturiert, sodass die doppelte Strands getrennt werden. Durch die Reduktion der Temperatur können kleine Oligomeren, di sogenannten Primer an spezifische Stellen von einem Gen binden. Die Primer flankieren eine definierte Sequenz von einer definierten Länge eines Genes von Interes. Die Temperatur wird dann wieder erhöht, damit die Taq-Polymerase, welche eine hitze stabile Polymerase ist und aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt, stabil funktioniert. Sie kann an Primer binden und die Strand von 5' – 3' Richtung elongiert werden. Dieser Zyklus (Denaturierung, Anneling und Elongation) wird vielmals wiederholt werden.

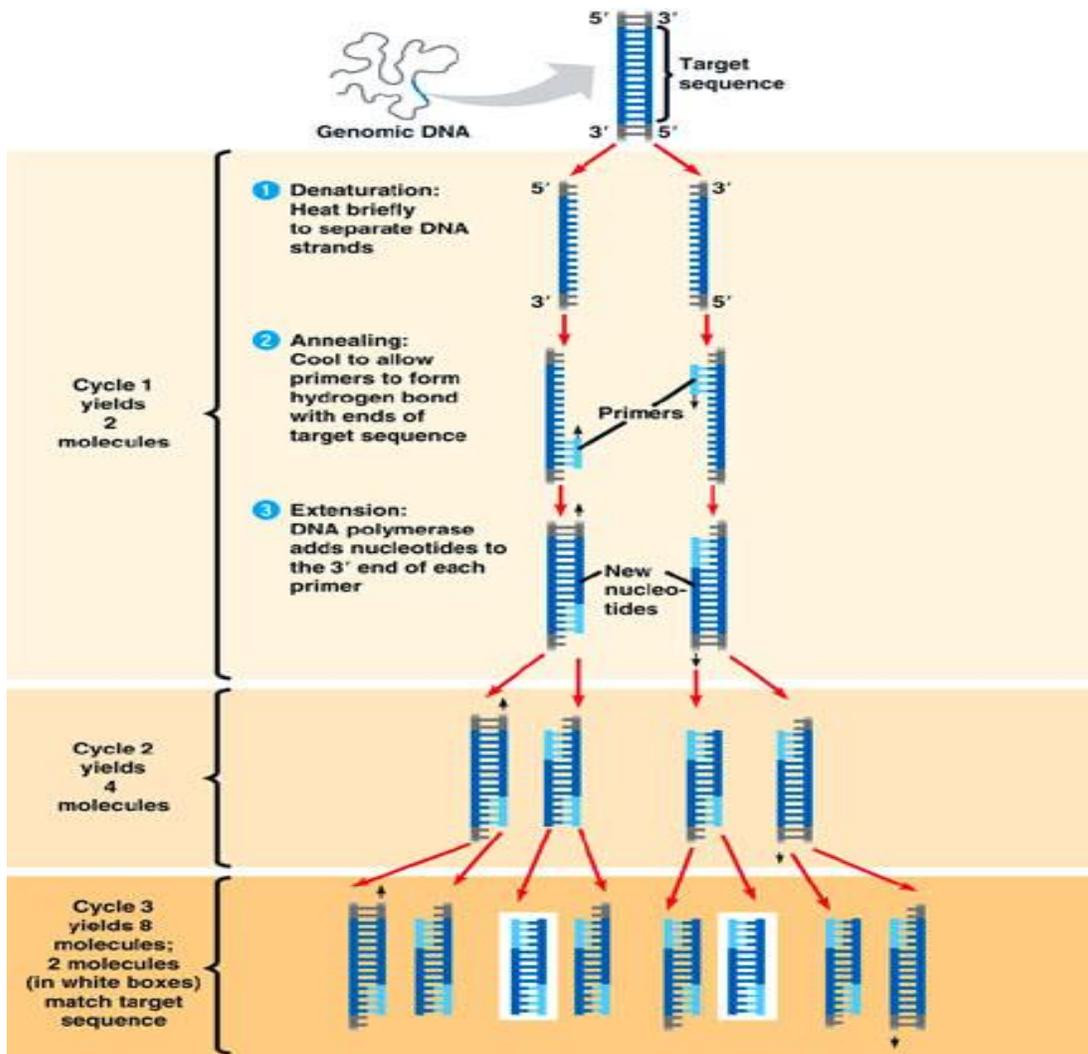


Abbildung nach Orac, 2007

(http://scienceblogs.com/insolence/2007/06/the_autism_omnibus_the_difference_betwee.ph
p)

PCR wird auf den "iCycler" durchgeführt werden (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Alle Komponenten von PCR werden in den Strips pipettiert. GapDH wird als Referenz angenommen

2.5. Real Time Polymerase-Kettenreaktion RT-PCR

Das Prinzip der Realtime PCR basiert auf dem Prinzip der standard Polymerase-Ketten-Reaktion, wobei es hier möglich, die Anzahl der Reaktionsprodukte nach den einzelnen Zyklen durch einen flourezierenden Farbstoff zu vermessen. Dieser Farbstoff weist die amplifizierten Produkten nach.

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wird die DNA durch das Enzym Polymerase vervielfältigt. Die Endprodukte eines Zyklus stehen dem nächsten Zyklus zur Verfügung und dadurch wird eine exponentielle Vervielfältigung erreicht. Außerdem benötigt das Enzym Primer, die an die DNA-Produkte spezifisch binden. Dies führt dazu, dass die Polymerase die Startposition des Gens auf der DNA markiert, wobei ein Primer auf dem 3´Strang und der andere an anderer Stelle am 5´Strang binden. Die Synthese der neuen Stränge braucht eine Mischung der vier Nukleotide (dGTP, dATP, dTTP und dCTP), um mit der PCR zu beginnen. Allgemein läuft eine PCR immer gleich mit einer bestimmten Anzahl von Zyklen ab, welche mit der Hilfe von einem Thermocycler durchgeführt werden.

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie man Real Time-PCR-Produkte vermessen kann, und zwar mit der Nutzung von fluoreszierenden Farbstoffen TaqMan und SybrGreen. In dieser Diplomarbeit wurde nur SybrGreen angewendet. Je mehr PCR-Produkt generiert wird, umso mehr Farbstoff mit der DNA interkaliert und umso mehr Licht emittiert wird. Um zu verhindern, dass unspezifische Licht-Emissionen zum Beispiel durch die Bildung von Primer-Dimeren kann eine Schmelzkurve nach jedem PCR-Verfahren analysiert werden. Normalerweise werden die PCR-Produkte mit einer höheren Temperatur als die Primer-Dimere verschmelzt und aus diesem Grund können sie einfacher differenziert werden.

Nach jedem Zyklus wird die Intensität des interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoffes vermessen und dadurch wird eine Amplifikationskurve aufgezeichnet.

Die Threshold-Linie in der exponentiellen Phase der Amplifikation ist die Amplifikationskurve am Schnittpunkt des Thresholds und es wird als C_T -Wert abgelesen.

Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas) Alle Primer wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Holzmann generiert und für alle Experimente angewendet. Jeder Versuch wurde so gezeichnet, dass alle Proben auf eine 96-Well-Platte für fast Real Time Arrays passen sollen. Die Quantifizierung der Genexpression wurde mit dem Gerät ABI PRISM 7500 und mit dem entsprechenden Software durchgeführt. Die Genexpression wurde auf ein Housekeeping-Gen GAPDH normiert.

Komponenten

4µl	Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas)
0,3µl	3' Primer
0,3µl	5' Primer
0,1µl	cDNA
3,3µl	nuclease free water

Bedingungen

Initiale Denaturierung	10 min	95°C
Denaturierung:	15 sec	95°C
Annealing/Elongation:	1 min	60°C
Zyklen:	40	

2.6. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Visualisierung der vervielfältigten Gene werden je 10 µl PCR-Produkts mit 2 µl loading buffer auf ein 6%iges Acrylamidgel aufgetragen. Der Gellauf erfolgt bei einer Spannung von 95 V. Die Bandengrößen werden mit Hilfe eines DNA-Längenstandards bestimmt.

6% Acrylamidgel für die PCR-Produktanalyse:

(Mengen für 2 Gele)

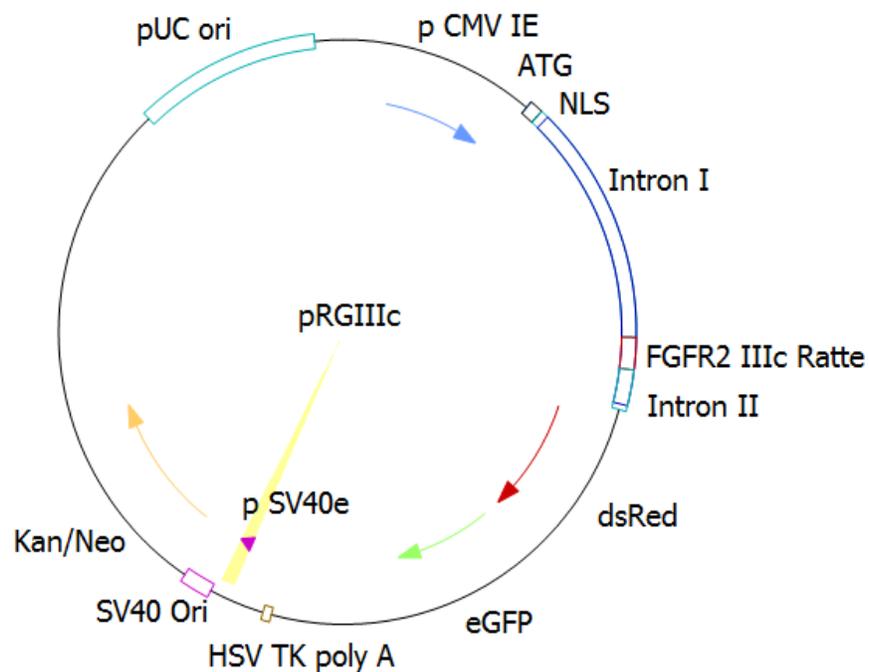
*300µl.....50 x TAE
2,25ml.....40% Acrylamid
12,35ml....H₂O bidest
10µl.....TEMED
50µl.....10% APS*

Das Gel wird für 5min in Ethidiumbromid gefärbt und anschliessend kurz gewaschen, um überschüssiges Ethidiumbromid zu entfernen. Das Gel wird unter UV-Licht Anregung betrachtet und in einem Gel-Doc eingescannt (Programm:Quantity One/GelDoc).

3. Gewinnung der DNA des fluoreszierenden Reporter-Systemes pRGIIIc

3.1. pRGIIIc

Dieser Reporter kann angewendet werden, um alternatives Spleißen in einzelnen Zellen zu quantifizieren sowie auch Zellen, die ein spezifisches Muster von Spleißvarianten exprimieren (Orengo, 2006). In dieser Diplomarbeit wird das alternative Spleißen von FGFR 1-3 IIIb/IIIc-Exons in Zelllinien etabliert aus Weichteilsarkomen untersucht.



pRGIIIc besteht aus einem human cytomegalovirus (CMV) early promotor (Position: 251-818), einem enhanced grün fluoreszierendem Protein (EGFP; Position: 3267-3833)-Gen, einem Discosoma sp. Rot fluoreszierenden Protein (DsRed2)-Gen (Position:2508-3164), zwei Resistenzkassetten (Amp^r und Kan^r/Neo^r); einer pUC plasmid replication origin Sequenz (Position: 6526-7169); einer Expressionkassette FGFR2 IIIc Ratte (Position:2102-2246), die aus einer NLS-Sequenz, zwei Introns und einer Startcodon ATG-Sequenz besteht. Es gibt zwei wichtigen Stopscodons TGAs, der erster ist am Ende der DsRed-Sequenz und der letzter am Ende der EGFP-Sequenz lokalisiert. Beide Stopscodons sind wichtig für die Produktion von entsprechenden fluoreszierenden

Proteinen (Oltean, Febbo et al. 2008). Das Plasmid pRGIIC wurde von VBC Genomics sequenziert, um diese Sequenzen mit jenen bekannten aus der Datenbank zu vergleichen. Die wichtigsten sequenzierten Teile für diese Arbeit sind: die Exon IIIc Sequenz (Länge: 145 bp; Position: 2102-2246); Intron I (Länge: 1118 bp; Position: 983-2101) und Intron II (Länge: 186; Position: 2247-2433) (Oltean, Sorg et al. 2006).

3.2. Vermehrung von pRGIIC

pRGIIC kann in kompetenten E.coli-Zellen vermehrt werden, da es eine eigene Resistenzkassette (Kanamycine=Kan^r) besitzt. Dafür sind Top-10-E.colis notwendig. Dieses Kanamycin-Resistenzgen ist in dem Top10-E.colis-Genom nicht integriert. Auf diesem Grund müssen die E.colis den Vektor pRGIIC aufnehmen, um in einem Medium mit Kanamycin überleben zu können. Der SV40 early Promotor ist in E.coli nicht aktiv, diese Aufgabe übernimmt ein eigener bakterieller Promotor (P) ebenfalls upstream des Resistenzgens (Quelle:Clontech)

3.3. Transformation der kompetenten Zellen

Ich bin nach dem Labor-Protokoll (Sem-Transformation; Version 2) der AG von Prof. Holzmann vorgegangen. Anweisungen sind in dem Protokoll zu finden.

3.4. DNA-Extraktion

Maxi und Mini Preps wurden laut der Protokolle folgender Kits in der Arbeitsgruppe von Prof. Holzmann (IKF) durchgeführt.

Qiagen-Endofree Plasmid Maxi-kit; Katalog nr. 12362 für die Maxi-Preps

Wizard-Plus SU MiniPreps DNA-Purifikation (Promega lot nr: 212026) für Mini-Preps

Für die Reinigung wurde das **QIAEX II-Protokoll „Desalting and Concentrating DNA“** des Kits (kat. Nr.: 127865; Qiagen) angewendet.

3.5. Herstellung des Inserts

Geplant ist es, die Expressionskassette von pRGIIC bzw. ATG, NLS, Intron I, IIIc-FGFR2 der Ratte, Intron, DsRed und EGFP in einem der zwei Vektoren pENTR/D-Topo

oder pCRII-Topo zu inserieren. Aus pRGIIIc wurde die gesamte Expressionskassette mit dem Restriktionsenzym PmeI gewonnen.

Für die Reinigung der Expressionskassette wurde das **QIAEX II-Protokoll „Desalting and Concentrating DNA“** des Kits (kat. Nr.: 127865; Qiagen) angewendet. Anweisungen der und Schritten sind im Protokoll zu finden.

4. Transfektion der STS-Zelllinien

4.1. Transfektion mittels chemischer Methode

Alle Zelllinien wurden mit den Transfectionsmitteln „TransFectin™ Lipid Reagent (Biorad)“ „Lipofectamine 2000 (Invitrogen)“ transfektiert. Es gibt unterschiedliche Methoden von Gentransfer. Über physikalische, chemische und virale Methoden wird in dieser Diplomarbeit nur den chemischen Weg betrachtet. Durch Lipofektion wird die DNA in Lipidtröpfchen verpackt, welche problemlos an die Zelloberfläche binden kann und die DNA wird mittels Endozytose in die Zelle transportiert. Die Zelle sollten eine Konfluenz von circa 50 bis 90% haben, bevor die Transfektion stattfinden kann. Weitere Anweisungen befinden sich in den Protokollen von Invitrogen und Biorad.

Mehr Information über das Protokoll und Vorgehensweise sind in dem Labor von Prof. Klaus Holzmann zu finden.

Invitrogen: Cat. Nr.:

Link: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/lipofectamine2000_man.pdf

BioRad: Cat Nr.

Link: http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2873.pdf

4.2. Passagieren der Zellen

Alle Zelllinien wurden mit einer Konfluenz von circa 80 bis 90% gesplittet. Das Medium wurde zuerst vorgewärmt. Die Zellen werden dann nachher mit 5 bis 10 ml von PBS/EDTA (10mM) gewaschen. Danach wird PBS/EDTA von den Zellen entfernt. Dann werden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin behandelt und dann 5 bis 10min. bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden nachher in 10 ml Medium überführt und in einer neuen T25-Flasche passagiert. Schnell wachsende Zellen wurden 1:10 und langsam wachsende Zellen 1:5 gesplittet.

4.3. Selektion von Klonen

Nach der Transfektion wird die DNA in das Genom der Zellen integriert. Um stabile Klone selektieren zu können, muss der zum transfektierenden Vektor zusätzlich das Gen von Interesse einen Selektionsmarker besitzen, der als Resistenzgen gegen Antibiotika (G418=Geneticin) dienen. Durch die Anwendung des passenden Antibiotikums werden untransfizierte Zellen abgestorben. Das heißt, dass bei diesen toten Zellen kein Plasmid oder Vektor in das Genom der Zellen integriert ist. Bevor man das Antibiotikum anwendet, muss die Letaldosis (LD=Menge an Antibiotikum in mg/ml für Selektion von Klonen) aus einer Dosis-Wirkungskurve ermittelt werden, sonst kann man nur falsche Klone züchten.

4.3.1. Neutralrot

Der Neutralrottest dient der Bestimmung der Zellzahl in Zellkulturen. Die Methode beruht auf dem Einbau des Farbstoffes Neutralrot in die Lysosomen lebender Zellen. Der Einbau des Farbstoffes ist proportional zur Zellzahl (Berger, 2005).

4.3.2. FACS-Analyse (FACS=fluorescence activated cell sorting)

Durchflusszytometrie (Zytometrie = Zell-Vermessung) beschreibt ein Messverfahren, welches in der Biologie und in der Medizin zur Anwendung kommt. Bei einer Form der Durchflusszytometrie werden Fluoreszenz-markierte Zellen je nach Färbung in unterschiedliche Reagenzgefäße sortiert. Es ermöglicht die Analyse von Zellen, die in hoher Geschwindigkeit an einer elektrischen Spannung oder einem Lichtstrahl vorbei fließen. Je nach Form, Struktur und/oder Färbung der Zellen werden unterschiedliche Effekte produziert, aus welchen die Eigenschaften der Zelle abgeleitet werden können.

Entsprechende Geräte werden als flow sorter (auf Deutsch: Fluss-Sortierer) oder als FACS (=fluorescence activated cell sorting) bezeichnet. (Nebe-von-Caron, 2000).

5. GFP-Detektion – Western blot

Während des Western-Blots werden Proteine isoliert, welche durch die Anwendung von spezifischen Antikörpern detektiert werden. Western Blot oder Immunblot (engl. Immunoblot) bezeichnet die Übertragung (engl. Blotting) von Proteinen, die über unterschiedliche Reaktionen detektiert werden können, wie auf eine Trägermembran. Die

Übertragung kann auf unterschiedliche Weise mittels Diffusion, Kapillarwirkung oder Elektrophorese durchgeführt werden. Der Western Blot wird vor allem in der molekularbiologischen und medizinischen Forschung sowie in der Diagnostik angewendet.

Diese Methode wurde von (Renart, 1984) für Diazobenzylloxymethyl-Papier eingeführt, und von H. Towbin (Towbin, 1988) auf Nitrocellulose umgestellt. Gleiche Mengen von Protein-Lysat werden auf Polyacrylamid-Gel übertragen, welches Sodiumdodecylsulfate (SDS) enthält. Proteine besitzen sekundäre und tertiäre Strukturen wie Hydrogenbindungen und Disulfid-Brücken, die durch Addition von SDS und β -Mercaptoethanol in den Lysaten und durch Erhitzung vor der Gel-Elektrophorese aufgelöst werden. Durch SDS ist es möglich, die Proteine negativ zu laden, damit sie via Gel-Elektrophorese wegen ihrer Größe abgetrennt werden können. Die Proteine werden dann auf eine polyvinylidene fluoride (PVDF)-Membrane übertragen und anschließend mit den spezifischen Antikörpern inkubiert. Die sekundären Antikörper werden enzymatisch gelabelt. Es ist eine Peroxidase, die ein chemisch luminizierendes Substrat oxidiert. Ein Film, der Photosensitiv ist, kann die Lichtemission detektieren.

5.1. Protein Isolierung

Die Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen, welcher phosphatase Inhibitoren (1 μ l/ml Na₃VO₄ und 10 μ l/ml 1M NaF) enthält und anschliessend wurden sie mit Hepes-Lysis-Buffer lysiert. Das Zell-lysate wird durch eine Nadel mit einem 0.6-mm-Durchmesser homogenisiert, wobei man das Lysat circa dreimal ab- und ausgesaugt werden soll und anschliessend in Eppendorfer Tubes übertragen. Alle Lysaten werden auf Eis gestellt und Dreimal werden sie alle 15 min gevortext. Danach werden alle Tubes auf Ultraschall für 10 min exponiert und nachher bei 15000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Supernatant wird in einer neuen Tube transferiert (Sonvilla, 2008).

Hepes lysis buffer

1ml	1M Hepes
3ml	1M NaCl
2ml	Glycerol
40 μ l	0,5M EDTA Lösung
200 μ l	1M NaF Lösung

100µl	1M NaVO ₄ Lösung
200µl	Triton X
30µl	1M MgCl ₂ Lösung
2 Tabletten	Komplet
13,43ml	bidestilliertes H ₂ O

5.2. Quantifizierung der Proteinkonzentration: Coomassie

Die Standardkurve sowie die Proteinsample werden in Doppelbestimmungen durchgeführt. BSA-Lösung (1µg/µl) und Hepes-Lysis-Buffer wurden für die Standardkurve in einer 96-well-Platte pipettiert. Die Reihenfolge der Pipettierung ist in dem unteren Schema zu sehen:

BSA [µg/µl]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ddH ₂ O [µl]	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Hepes buffer [µl]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
BSA [µl]	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gesamtvolumen [µl]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Für jedes Sample wurden 1µl Protein-Lysat und 9 µl bidestilliertes Wasser in einer 96-well-Platte gemischt. Für die Standardkurve werden 150µl von Coomassie Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Biorad) Lösung pro Well und Proteinsample zugegeben.

Die Absorption wird bei 590 nm vermessen und die Proteinkonzentration wird dann erst mit der entsprechenden Standardkurve kalkuliert.

5.3. Herstellung von SDS-Polyacrylamid Gel Electrophoresis (PAGE)

Zuerst wird das Trenn-SDS- Gel vorbereitet und die obere leere Stelle wird mit Ethanol aufgefüllt. Nach 45 min ist das trenn-Gel polymerisiert, wobei das Ethanol mit einem Filterpapier entfernt wird. Die obere leere Stelle wird mit einem SDS Sammel-Gel aufgefüllt. Bevor die Proteinproben, die eine Konzentration von 40µg haben, auf das Gel aufgetragen werden und mit 4x Sample Puffer gemischt werden, werden sie auf 80 °C für 5 min erhitzt. 5µl protein Ladder (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas,

Burlington, Canada) werden auch beladen. Das Gel wird mit Elektrophoresis-Buffer zuerst für 15 min bei 60 Volt und dann für 1 Stunde bei 125 Volts gelaufen.

<u>SDS Trenn- gel</u>	7%	10%
40% Acrylamid	0.875 ml	1.5 ml
1,5M Tris pH 8,8	1.25 ml	1.75 ml
Aqua bidest	2.8 ml	2.15 ml
10% SDS	50 µl	50 µl
10% APS	25 µl	25 µl
TEMED	2.5 µl	2.5µl

<u>SDS Sammel-Gel</u>		<u>2x Sample buffer</u>	
40% Acrylamid	0.25 ml	SDS	4%
1,5M Tris pH 6.8	0.313 ml	Glycerol	20%
Aqua bidest	1.9 ml	2-mercaptoethanol	10%
10% SDS	25 µl	Tris/HCl pH 6.8	0.125 M
10% APS	12.5 µl	Bromphenolblue	traces of

Electrophoresis buffer

Glycin	72g
Tris	15g
SDS	5g
Bidestilliertes H ₂ O	Auffüllen bis zu 500ml

5.4. Western Blot

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF Membrane transferiert, wobei das Blotsystem von der Firma Biorad benutzt wurde. Das Blotting-Sandwich wurde in der entsprechenden Reihenfolge vorbereiten:

- Dichte Beilage (Im Kit vorhanden)
- 3x Filterpapier (Selbst schneiden)
- PVDF-Membrane (es wurde mit Methanol aktiviert)
- Gel
- 3x Filterpapier
- Dichte Beilage

Der Blot wurde mit 25V übernacht bei 4°C in 1x blotting Buffer laufen lassen. Die negative Ladung wandert zu der positiven Elektrode, wobei die aufgetragene Proteinen auch auf das Gel zu der positiven geladenen Membran mitwandert.

Nach dem Blotting wird die Membran in ddH₂O gewaschen. Die Membran wurde dann mit Methanol abgetrocknet und kann nachher bei 4°C aufbewahrt werden.

<u>1x Blotting Buffer</u>		<u>10x Blotting Buffer</u>	
10x Blotting Buffer	10%	Glycin	72gr
Methanol	20%	Tris	15gr
Bidestilliertes Wasser	70%	SDS	1gr

Die angewendete Flasche für die Herstellung des 1x blotting Buffer wurde auf 500ml gefüllt.

5.5. Ponceau S Färbung

Der Farbstoff dient beim Western Blot zum Überprüfen, ob Proteine auf die Membran übertragen wurden. Ponceau S bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine. Damit alle Proteine auf der Membran sichtbar gemacht werden, werden diese in Ponceau S Lösung für circa 10 min. inkubiert. Die Ponceau-S-Färbung ist sehr leicht mit Wasser zu waschen, um die Membran für Immundetektion mit Antikörpern weiter anzuwenden.

5.6. Immunologische Detektion von Proteinen

Die Membran wird zuerst Übernacht mit dem ersten Antikörper Lösung bei 4 °C inkubiert (Antikörper wird in 1% nonfat dry Milk in PBST versetzt). Am nächsten Tag wird die Membran 3 bis 5-mal alle 10 bis 15 min in PBST (PBST=PBS + Tween) gewaschen, bevor die Inkubation mit dem zweiten Antikörper bei Raumtemperatur beginnt. Nachdem man die Membran gewaschen hat, wird sie mit Detektionslösung aufgedeckt (ECL-Plus_Western-Blotting Detection-System, AmershamTM, GE-Healthcare) und danach auf X-Ray (Röntgenstrahlen)-Filme ausgedrückt. Alle Banden werden durch Scanning und durch das Programm ImageQuant 5.0 semiquantifiziert.

Waschen mit Buffer (PBST)

1x PBS	auf 1 liter
Tween	1ml oder 0.5ml

Folgende rabbit-polyclonalen Antikörper wurden verwendet:

- 1. Antikörper: Anti-GFP Mouse Cat. Nr.: 11814460001 (Roche)
- 2. Antikörper: Stabilized Goat Antikörper HRP-Conjugated Cat.Nr.: 1858413 (PIERCE)

Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 0,4 µg/ml eingesetzt. Als zweiter Antikörper wurde ein Peroxidase-konjugiertes Anti-rabbit-IgG angewendet.

Inkubation mit dem 1. Antikörper: Der Antikörper wird in Waschpuffer mit 1% Milchpulver und 0.00% NaN₃ (für eine längere Aufbewahrung im Kühlschrank der Lösung) verdünnt und auf die Membran pipettiert (Membranen mit Antikörper einschweißen und auf eine Glasplatte kleben). Inkubation erfolgt über Nacht im Kühlschrank.

Bevor die Membran mit dem 2. Antikörper inkubiert wird, muss sie zuerst 3x für mindestens 10 min in Waschpuffer gewaschen am Schüttler.

Inkubation mit dem 2. Antikörper: es erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach 3 bis 5 maligem Waschen können die Proteine detektiert werden. Maximal 1,5 ml/Membran einer 1:1 Mischung des „Super Signal Chemolumineszenz Substrat“ Reagens A und B werden auf die Membran aufgetragen. Nach 5 min.-Wirkung des Substrats wird ein Röntgenfilm exponiert und entwickelt. Die sichtbaren Banden zeigen jede Proteine, an die der spezifische Antikörper gebunden hat.

V ERGEBNISSE

1. Expression der FGF-Rezeptoren (1-5) und ihrer Varianten in STS-Zelllinien aus Mensch und Hund mittels RT-PCR

Diese RT-PCR-Ergebnisse wurden gemeinsam im Rahmen einer Diplomarbeit von Dr.med.univ. Heinrich Steinhoff (MUW) erhoben. Rohdaten und Ergebnisse sind teilweise darin beschrieben (Steinhoff, H.A., 2009). Die Expression der FGFR (1-5) und ihrer Varianten wurde in dreizehn Zelllinien untersucht. Es geht um sechs Weichteilsarkom-Zelllinien von Menschen (Rhabdomyosarkom HTB82, Fibrosarkom HTB91, Liposarkom HTB92, Chondrosarkom HTB94, Fibrosarkom HT1080, Fibrosarkom FCHT), um drei Fibroblasten-Zelllinien von Menschen (Fibroblasten F2000, Wi38 und HAUT), um drei STS-Zelllinien des Hundes (Fibrosarkom CoFSA, MBSa und PSTS).

Die Expressionsstärke der Varianten IIIb und IIIc des FGFR-2, die ursprünglich nur in den Weichteilsarkomen des Menschen und des Hundes untersucht wurde, wurde als Referenz genommen, um bestimmte Zelllinien in weiteren Experimenten zu selektieren, mit denen mögliche Zellmodelle für den pRGIIIc-Reporter und vielleicht neue Reporter etabliert werden können. Alle FGFR (1-5), sowie die Varianten der ersten drei FGFR (1-3) 1-IIIb/IIIc, 2-IIIb/IIIc und 3-IIIb/IIIc wurden für die Studie durch RT-PCR in Gruppen zusammengefasst.

Alle Gene wurden mit allen Sonden in dreifacher Wiederholung gescreent, um eine möglichst genaue Mittelwertsbildung der C_t -Werte und RQ-Werte zu reproduzieren. In allen Experimenten dieser Diplomarbeit wurde das Gap-DH als Haushaltsgen-Referenz verwendet, da dieses in allen Zelllinien konstant exprimiert wurde. Nur mit einer konstanten Expression des Housekeeping-Gens ist es möglich, die gemessene Werte der FGF-Rezeptoren mit denen von Gap-DH zu korrelieren (Steinhoff, H.A. 2009).

1.1. Ergebnisse der Expression der FGFR (1-5) und ihrer Varianten (IIIb/IIIc) durch RT-PCR

Das Programm 7500 Software v.2.0.2 fasst alle diese Werte automatisch in einem QC-Summary zusammen (Sehe Anhang 3). Die PCR-Produkte bzw. Amplikons wurden auf PAGE-Gelen analysiert. Die Gel-Bilder sowie die Bedingungen befinden sich in Anhang 1 und 2.

Auffallend dabei sind die 47 Übertretungen der Standardabweichung der 500 Messwerte (entspricht ca. 9% der Werte) von mehr als Faktor 0,7 (Markierung HIGHSD). Hierbei wird es sich um Abweichungen in der Reaktionschemie handeln, die auf Pipettierungenauigkeiten zurückzuführen sind.

Die Markierung EXPFAIL zeigt diejenigen Proben an, die keine exponentielle Phase aufweisen. NOAMP bedeutet, dass der Algorithmus des Programms keine Amplifikation detektieren konnte. Diese beiden Werte zeigen in dieser Studie vor allem nicht exprimierte Rezeptoren, sind aber auch für nicht gelungene Amplifikationen typisch.

Die Markierung AMPNC zeigt an, dass es in einer Non-Template-Kontrolle (negative Kontrolle, ohne cDNA) zu einer Vermehrung eines Produktes vor Zyklus 35 und damit einer Kontamination der Reaktionskomponenten gekommen ist. Diese Flagge hat nur bedingte Aussagekraft. Ein positiver NTC ist nur dann als positiv zu werten, wenn er im Amplifikation-Plot in der Nähe des Produktes der Probe liegt ($\Delta CT < 5$).

Eine Auflistung der Proben, die in oben genannte Kriterien gefallen sind und von der Studie ausgeschlossen wurden, ist im Anhang 8 der DA von Heinrich Steinhoff zu finden.

Die Untersuchungen zeigen, dass die FGF-Rezeptoren 1-5 und die Varianten, bis auf Ausnahmen, in allen untersuchten Zelllinien exprimiert sind. Für die in der Tabelle 1.1. aufgeführten Proben konnte keine Amplifikation nach 40 Zyklen nachgewiesen werden. Diese Seite stammt aus der Diplomarbeit von Heinrich Steinhoff Seite 39 (Steinhoff, H.A. 2009)

Die Tabelle 1.1 zeigt die verwendeten RT-PCR Bedingungen. Das Haushaltgen GapDH wurde auch mitamplifiziert.

GEN	Primer > upstream > downstream	PCR-Produktgröße (bp)	Anealing Temp. (°C)
FGFR1	TCCAGTGGCTAAAGCACATC ATCTGGCTGTGGAAGTCACTC	376	60
FGFR1 IIIb	TCCAGTGGCTAAAGCACATC CCGCATCCGAGCTATTAATC	125	60
FGFR1 IIIc	TCCAGTGGCTAAAGCACATC CGCCAAGCACGTATACTC	170	60
FGFR2	AACGGGAAGGAGTTTAAGCAG CCACCATACAGGCGATTAAG	600	60
FGFR2 IIIb	AACGGGAAGGAGTTTAAGCAG CTCGGTCACATTGAACAGAG	417	60
FGFR2 IIIc	AACGGGAAGGAGTTTAAGCAG TGGCAGAAGTGTCAACCATGC	508	60
FGFR3	AACGGCAGGGAGTTCCGCGGC GTCAGCCTCCACCAGCTCCTC	531	60
FGFR3 IIIb	AACGGCAGGGAGTTCCGCGGC CCCGTCCCGCTCCGACACATTG	525	60
FGFR3 IIIc	AACGGCAGGGAGTTCCGCGGC CCCGGCGTCCTCAAAGGTG	523	60
FGFR4	GATGGACAGGCCTTTCATGG TGCTGCGGTCCATGTGGGGTCTC	525	60
FGFR5	CCGGACAGGCCGAGATGACG AGCCGCACGGAGCTACCCAC	523	60
GapDH	GCTGAGAACGGGAAGCTTGTCAATGG CTGGGTGGCAGTGATGGCATGGACTG	316	60
Die Bezeichnung der Primer befinden sich in den Bästenden der Arbeitsgruppe von Prof. Klaus Holzmann / Diese Primer Liste steht auch in der Diplomarbeit von (Steinhoff, H.A. 2009)			

Die Proben wurden auf dem 7500 Fast Realtime-PCR Gerät von Applied Biosystem mit SYBR-Green Reagenzien gemessen und mit der 7500 Software v.2.0.2. ausgewertet. Für die Screeningsversuche wurde das Reagenz (Mastermix: Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X) von Fermentas; Cat#:K0222) verwendet. Einstellung des Programmes: 10min 95°C, 40x (15sec 95°C und 1min 60 °C), 1x Schmelzkurve.

1.2. Gemessene Expressionswerte aller FGF-Rezeptoren und Varianten (Ct=Values) und die quantitative Expression der FGFR 1-5

Pfaffl-Rechmodell für die Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens mit der eines nicht regulierten HKG (Housekeeping Gene) normalisiert. Dabei werden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder -konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen bezogen. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) erfolgt über die sog. $\Delta\Delta C_T$ Methoden nach Pfaffl. Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der C_T Wert des Referenzgens vom C_T Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta C_T = C_T$ Zielgen – C_T Referenzgen). Nach dieser Normierung wird vom ΔC_T Wert der experimentell behandelten Proben der ΔC_T Wert einer Kontrolle abgezogen ($\Delta\Delta C_T$); man kommt zum sog. „delta-delta C_T “ Berechnungsmodell. Der relative Expressionsunterschied (Ratio) einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Steinhoff, H.A. 2009) (Pfaffl 2001)

$$\begin{aligned}\Delta C_T &= C_T [\text{FGFR}] - C_T [\text{GAPDH}] \\ \Delta\Delta C_T &= \Delta C_T [\text{untersuchte Zelle}] - \Delta C_T [\text{HTB82}] \\ \text{Relative Quantity (RQ)} &= 2^{-\Delta\Delta C_T} \text{ (Pfaffl 2001)}\end{aligned}$$

Alle ΔC_T -Werte von allen FGFR Rezeptoren und Spleißvarianten aller Biogruppen wurden mit der Formel von Pfaffl ausgewertet und auf GAPDH normiert. Daraus wurde der Mittelwert (MW) der einzelnen ΔC_T -Werten der FGFR Rezeptoren 1-5 und Spleißvarianten IIIb/IIIc und von GAPDH errechnet. Das gilt für alle Biogruppen. Als Biogruppe werden Zelllinien der gleichen Spezies und dem gleichen Phänotyp betrachtet, wie es in der Tab.1.2.5. (Biogroups) zu sehen sind. Diese sind in dieser Arbeit drei Zelllinien des Hundes und die restliche Zelllinien des Menschen. In den folgenden Abbildungen und der Tabelle 1.2.5. ist die Expression auf Basis der C_T -Werte der FGFRs und GAPDH dargestellt.

Abbildung 1.2.1.: Ct-Werte von FGFR 1 und Varianten (IIIc und IIIb) in STS-Canin, STS-Human und Fibroblasten.

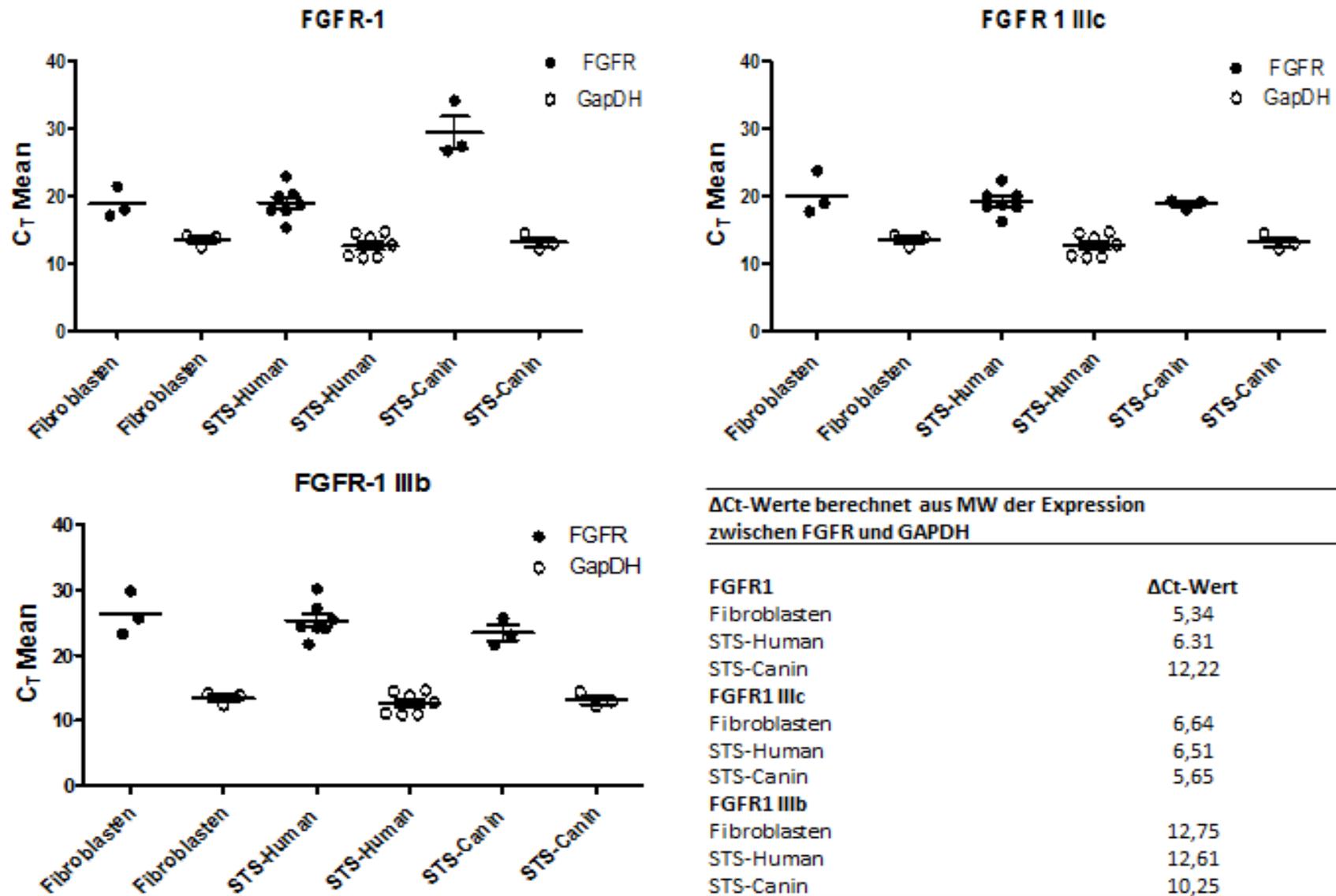
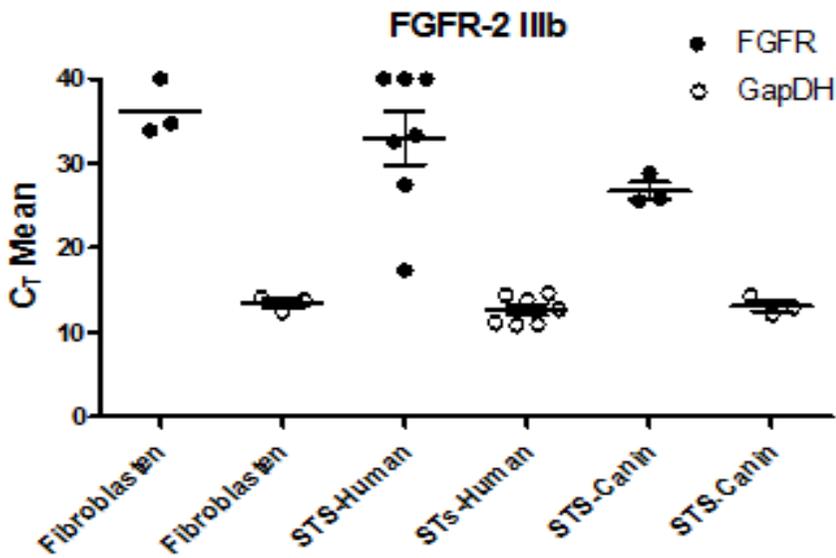
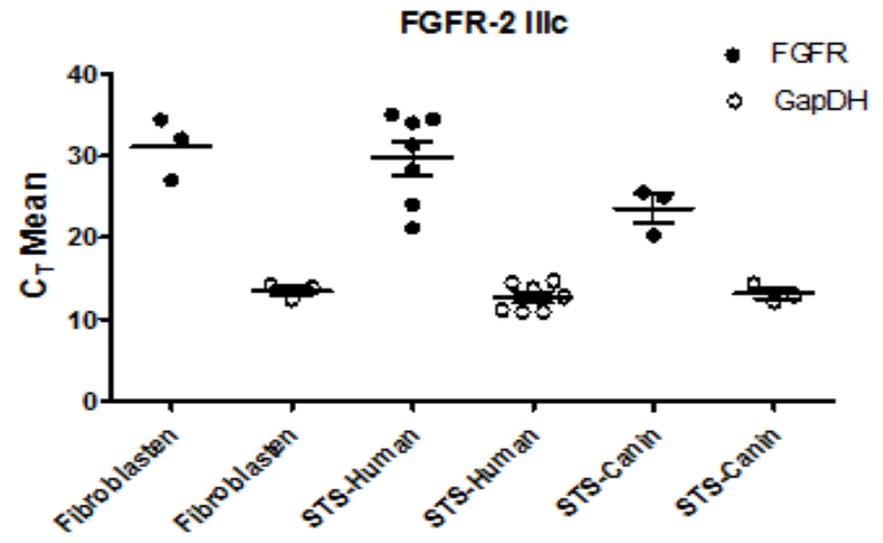
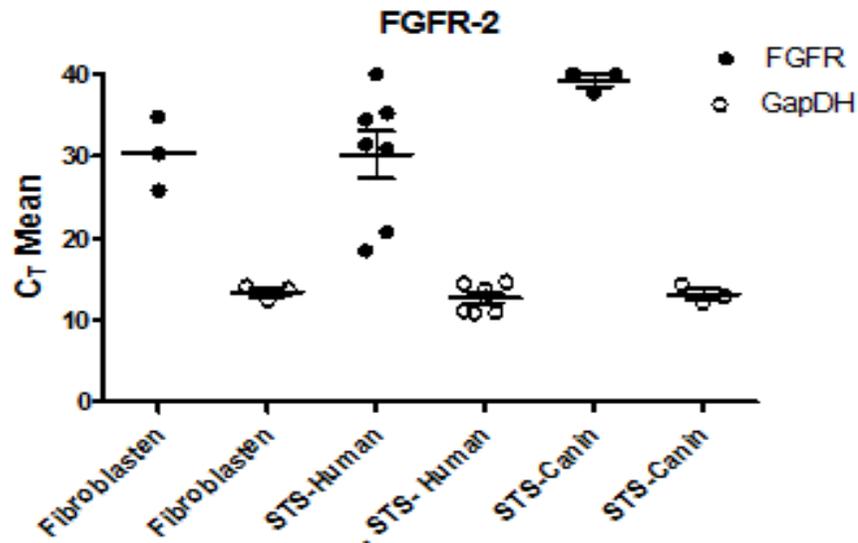


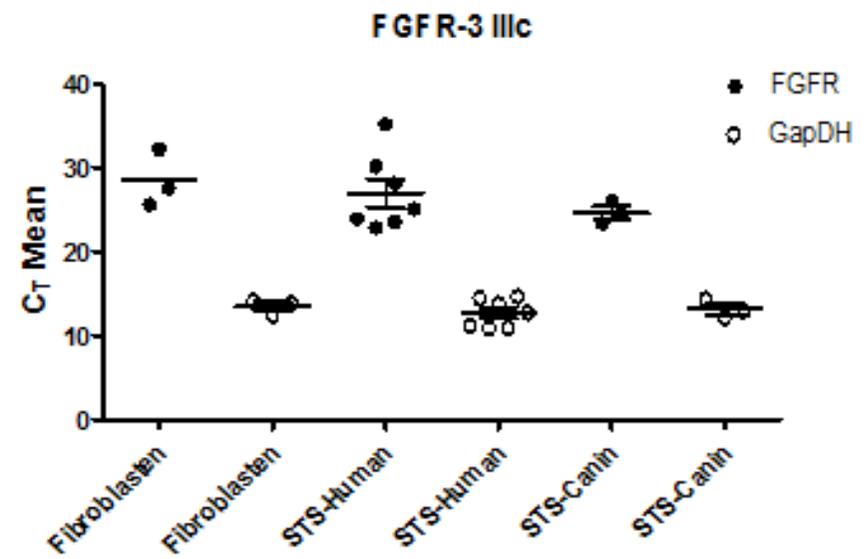
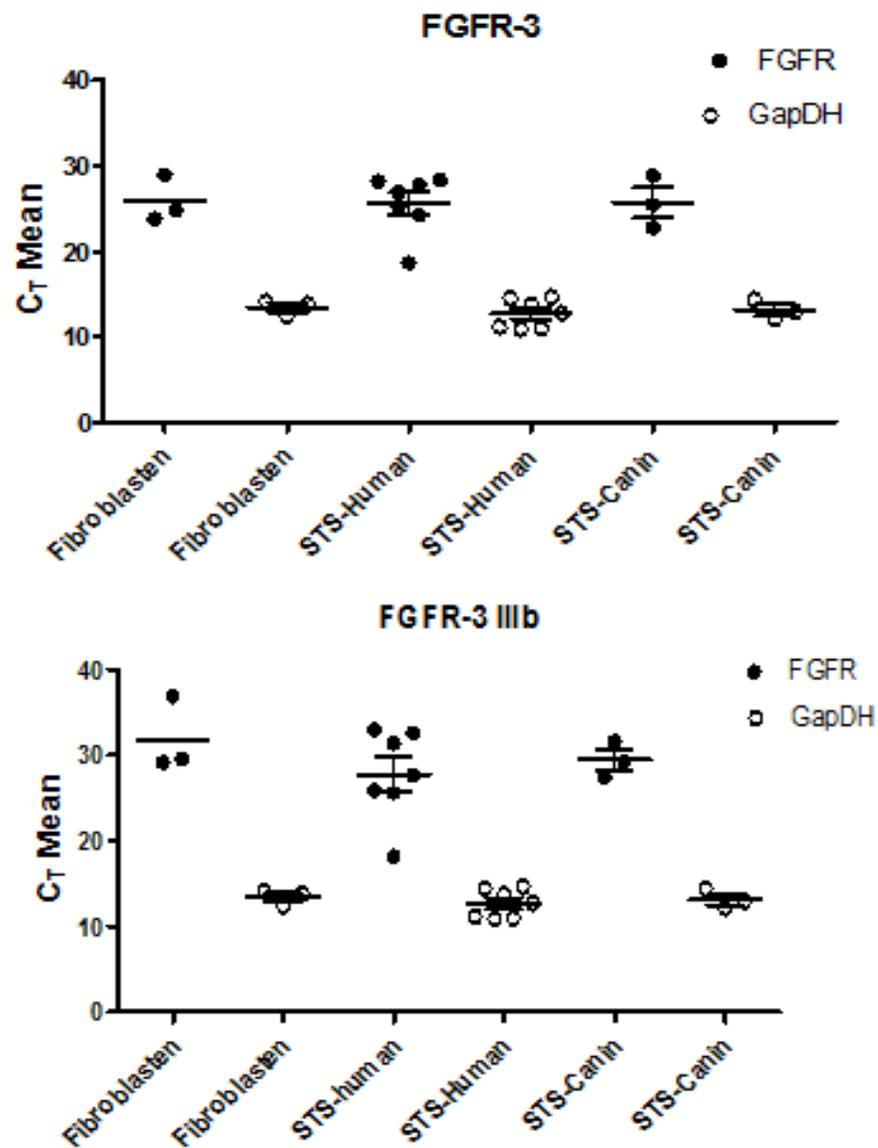
Abbildung 1.2.2.: Ct-Werte von FGFR 2 und Varianten (IIIc und IIIb) in STS-Canin, STS-Human und Fibroblasten.



Δ Ct-Werte berechnet aus MW der Expression zwischen FGFR und GAPDH

Gene	Δ Ct-Wert
FGFR2	
Fibroblasten	16,89
STS-Human	17,54
STS-Canin	26,11
FGFR2 IIIc	
Fibroblasten	17,73
STS-Human	17,13
STS-Canin	10,44
FGFR2 IIIb	
Fibroblasten	22,77
STS-Human	20,30
STS-Canin	13,61

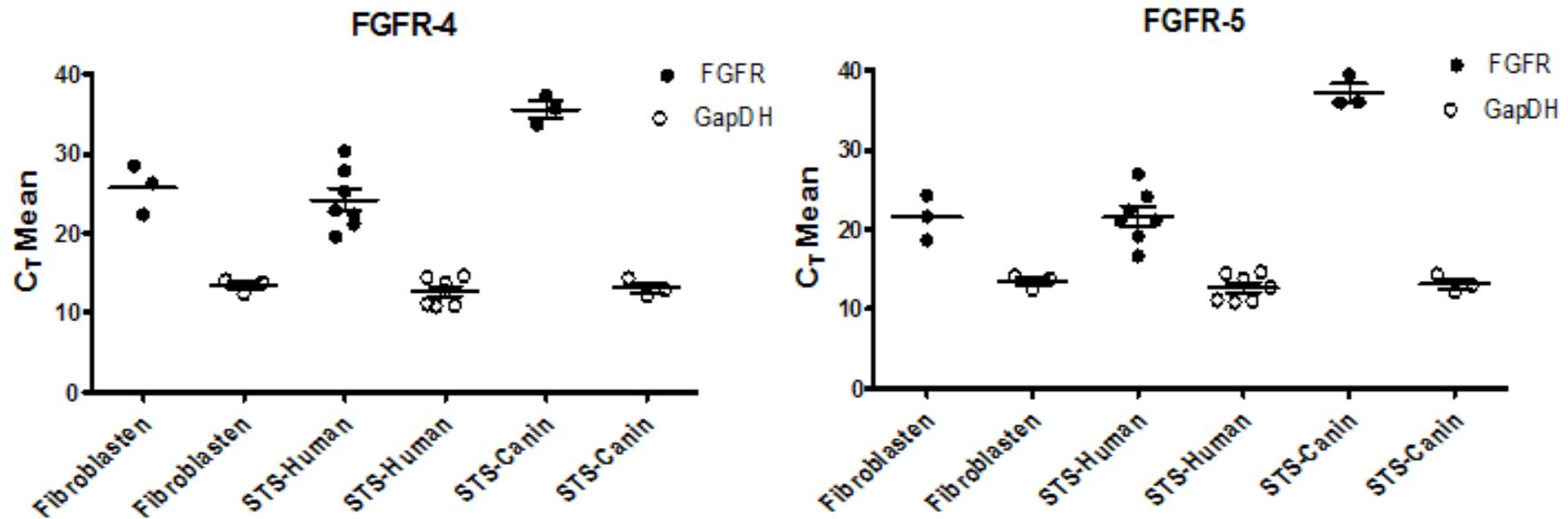
Abbildung 1.2.3.: Ct-Werte von FGFR 3 und Varianten (IIIc und IIIb) in STS-Canin, STS-Human und Fibroblasten.



Δ Ct-Werte berechnet aus MW der Expression zwischen FGFR und GAPDH

Gene	Δ Ct-Wert
FGFR3	
Fibroblasten	12,40
STS-Human	12,98
STS-Canin	12,56
FGFR3 IIIc	
Fibroblasten	15,03
STS-Human	14,33
STS-Canin	11,50
FGFR3 IIIb	
Fibroblasten	18,41
STS-Human	15,09
STS-Canin	16,30

Abbildung 1.2.4.: Ct-Werte von FGFR 2 und Varianten (IIIc und IIIb) in STS-Canin, STS-Human und Fibroblasten.



Δ Ct-Werte berechnet aus MW der Expression
zwischen FGFR und GAPDH

FGFR4	Δ Ct-Wert
Fibroblasten	12,30
STS-Human	11,57
STS-Canin	22,49
FGFR5	Δ Ct-Wert
Fibroblasten	8,08
STS-Human	8,97
STS-Canin	24,04

Tabelle 1.2.5.: Darstellung aller gemessenen FGFR Transkripte und von GAPDH semi-quantitativ über die Rohdaten (Ct-Werte)

Biogroup	STS-Canin			Fibroblasten			STS-Human						
	CoFSA	MBSa	PSTS	F2000	HAUT	Wi38	HT1080	FCHT	HTB82	HTB91	HTB92	HTB93	HTB94
FGFR-1	++	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
IIIc	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
IIIb	+++	+++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++
FGFR-2	-	-	+	+	++	+	+	+	+++	+	-	-	++
IIIc	+++	++	+++	+	++	+	++	+++	+++	+	+	+	+++
IIIb	++	++	++	+	++	-	+	-	+++	+	-	-	++
FGFR-3	++	++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	++	++	++	++
IIIc	++	+++	+++	+	++	++	+++	++	+++	+	+++	+	++
IIIb	++	+++	+++	+	++	++	+++	++	+++	+	+++	+	++
FGFR-4	+	+	+	+++	++	++	++	+++	+++	+	+++	++	+++
FGFR-5	+	+	+	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
GAPDH	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

1.2.5. Semiquantitative Darstellung der Expressionsstärke:

* (-) nicht detektierbar nach 40 Zyklen PCR, (+) mean $C_t = 30 - 40$; (++) mean $C_t = 25 - 30$; (+++) mean $C_t = 0 - 25$

2. Expression von pRGIIIc in STS-Zelllinien

In den nächsten Versuchen wurden STS-Zelllinien ausgesucht, welche hohe und geringe Expression der Isoform IIIc des FGFR 2 zeigen. In diesen Zellen wurde die Expression von pRGIIIc untersucht, um Zellmodelle für weitere Untersuchungen zu etablieren. Die ausgewählten Zelllinien waren: HTB92 mit einem Ct-Wert von 31.2; HTB94 mit einem Ct-Wert von 21.3; HTB82 mit einem Ct-Werten von 28.2. und HTB91 mit einem Ct-Wert von 24. Als Kontroll-Plasmide haben pEGFP-F und pEGFP-C1 für die GFP-Expression und DsRed2-N1 für die RFP-Expression gedient.

2.1. Mikroskopische Analyse

Die folgenden Fotos zeigen die Morphologie der Zelllinien, die für die Transfektion-Versuche angewendet wurden.

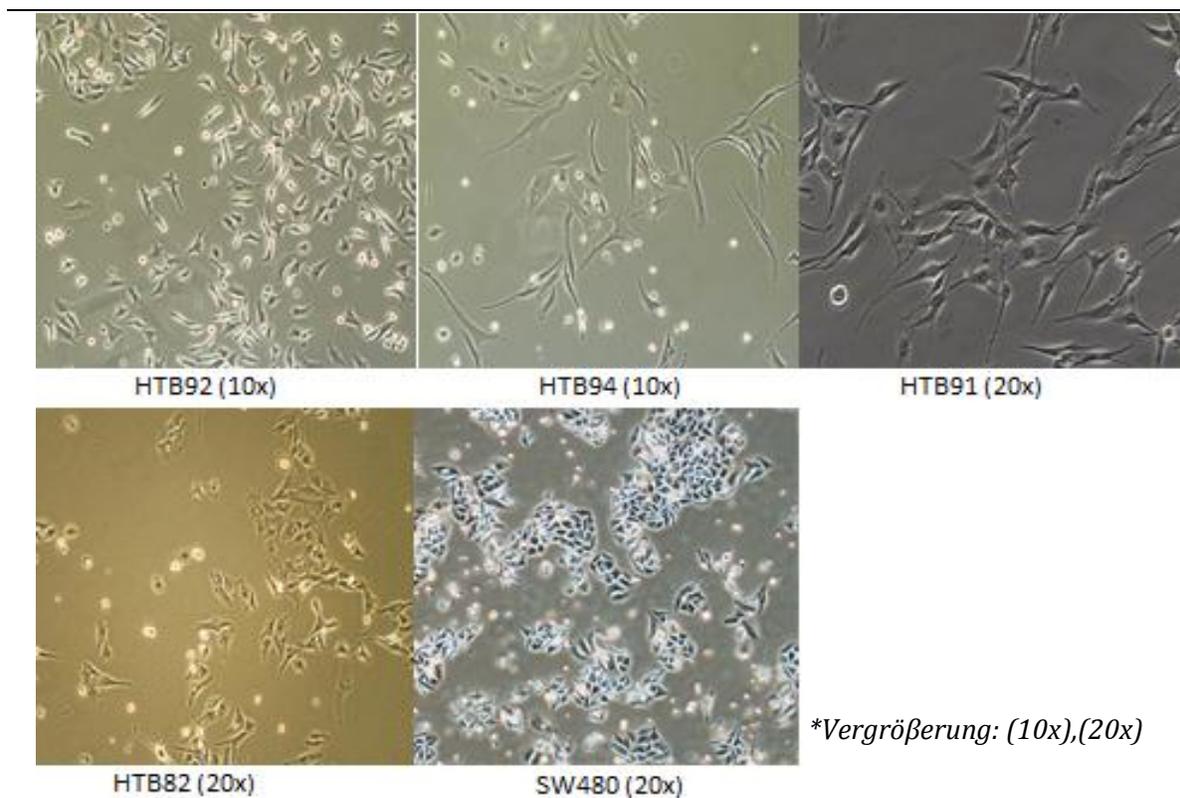


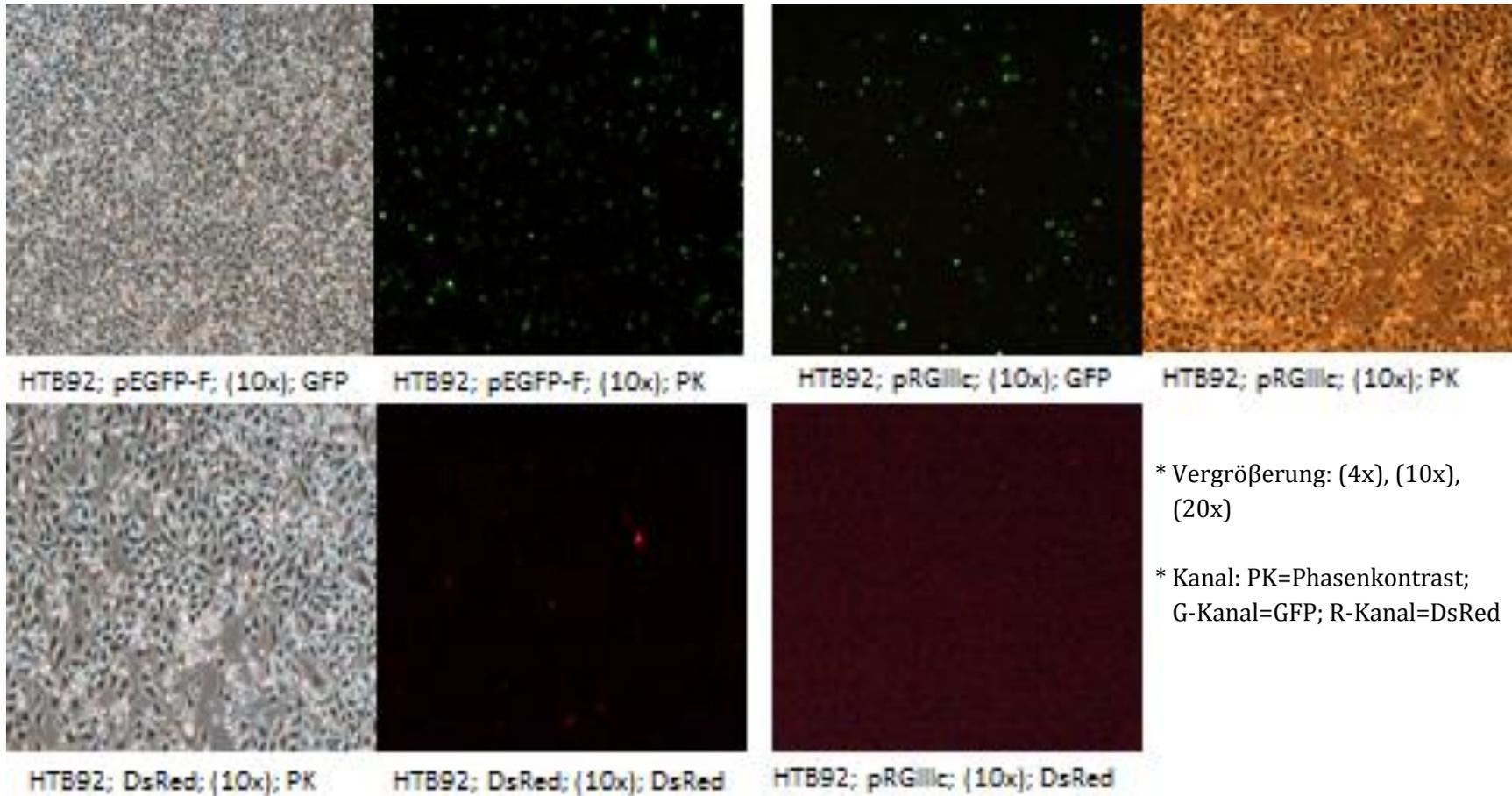
Abbildung 2.1.1.: Fotos der untersuchten Zellen

Die Abb. 2.1.1. zeigt die Bilder der Kulturflaschen mit folgenden Zellen. HTB94 (10x) sind langförmige wachsende adherente fibroblasten-ähnliche-Zellen. HTB92 (10x) sind polygonale adherente Zellen. HTB82 (20x) sind polygonale wachsende Epithelzellen. HTB91 sind langförmige adherente wachsende fibroblasten-ähnliche-Zellen. SW480 (20x) sind polygonale wachsende Epithelzellen. Andere Eigenschaften wie Entität dieser Zelllinien sind in der Tab. 1.1. im Teil Materialien und Methoden zu finden.

2.1.1. Transfektion des Reporterplasmids pRGIIC in STS-Zelllinien

Die oben genannten Zelllinien wurden mit folgenden Plasmiden transfektiert: pEGFP-C1, pEGFP-F, DsRed-Plasmid und pRGIIC.

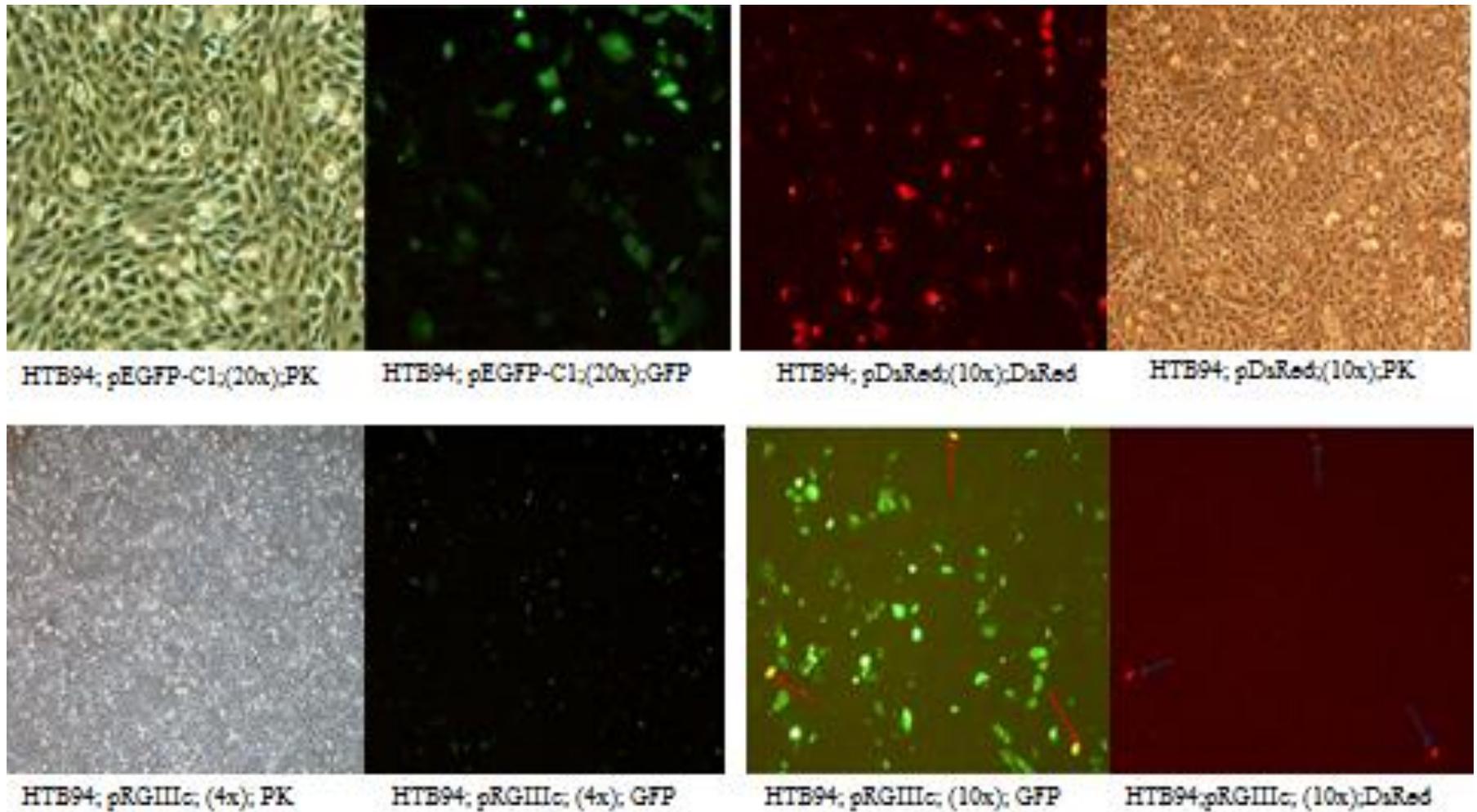
Zelllinie HTB-92



- Unter jedem Foto ist folgende Information beschrieben: Name der Zelllinie (HTB92); Plasmid, mit dem die Zellen transfektiert wurde; Vergrößerung und Kanal, mit denen die Fotos aufgenommen wurden.
- **Abbildung 2.1.1.1.: Transfektion in HTB92 mit den Plasmiden pRGIIIc, pEGFP-F und pDsRed**

Die Abbildung 2.1.1.1. zeigt eine positive Transfektionseffizienz und die Expression von EGFP und DsRed der oben genannten Plasmiden in der Zelllinie HTB92. Die grüne Fluoreszenz ist als EGFP-Expression betrachtet und die rote Fluoreszenz als die RFP-Expression (RFP=Rot Fluoreszierendes Protein) des Plasmides DsRed2-N1 und pRGIIIc dar. Die DsRed-Expression von pRGIIIc war mikroskopisch kaum detektierbar. Nur eine geringe Anzahl von Zellen zeigen die DsRed-Expression dieses Plasmides.

Zelllinie HTB-94



* Information zu den Fotos: Name der Zelllinie (HTB94); Plasmid; Vergrößerung (4x, 10x, 20x); Kanal (GFP und DsRed).

Abbildung 2.1.1.2.: Bilder der transfektierten Zelllinie HTB94

Die Fotos zeigen eine positive Transfektionseffizienz und Expression von GFP und DsRed. Die blauen und roten Pfeile zeigen Zellen, die in dem grünen Kanal gelb leuchten. Gelb fluoreszierende Zellen stellen eine Doppelexpression dar, weil sie gleichzeitig GFP und RFP exprimieren. Dazu gehören die Fotos HTB94;pRGIIIc, (4x und 10x). Hier wurde das Plasmid pEGFP-C1 als Kontrolle für die GFP-Expression und pDsRed als Kontrolle für DsRed-Expression genommen.

Beide Zelllinien HTB92 und HTB94 wurden nur transient transfektiert. Die DsRed-Expression von pRGIIIc könnte nicht mit dem Kontroll-Plasmid DsRed verglichen werden, weil pRGIIIc eine geringe Konzentration an DsRed-Protein synthetisiert hat bzw. die DsRed-Expression von pRGIIIc war nicht mikroskopisch detektierbar.

2.1.2. Feststellung der Letaldosis durch Neutralrot

Für die stabile Integration und Expression des Reporterplasmids pRGIIIc wurde zuerst die Letaldosis des Antibiotikums G418 jeder Zelllinie festgestellt. Die Dosis-Wirkung-Kurve beschreibt graphisch den Zusammenhang zwischen der Dosis eines Wirkstoffs und seiner Wirkung. Die Effekte sind unterschiedlich von Zelllinie zu Zelllinie. In diesem Versuch wurde eine Verdünnungsreihe mit verschiedenen Konzentrationen an G418 gemacht. Die Versuche wurden in 24-Well-Platten mit 2ml Medium pro wells für jede Konzentration durchgeführt. Das angewendete Antibiotikum war G418 in HTB82 und HTB91 mit folgenden Dosis: 0µg/ml, 50µg/ml, 80-, 110, 150-, 200-, 300-, 400-, 600-, 800µg/ml und 1mg/ml. Nach 15 Tagen der Inkubation in G418 wurde die Zahl der lebenden Zellen mittels Neutralrot ermittelt. Aus den dargestellten Ergebnissen ergaben sich folgende Arbeitskonzentration zur Selektion der Klone: für HTB82 (300 µg/ml G418), für HTB91 (800 µg/ml) und für SW480 (500 µg/ml).

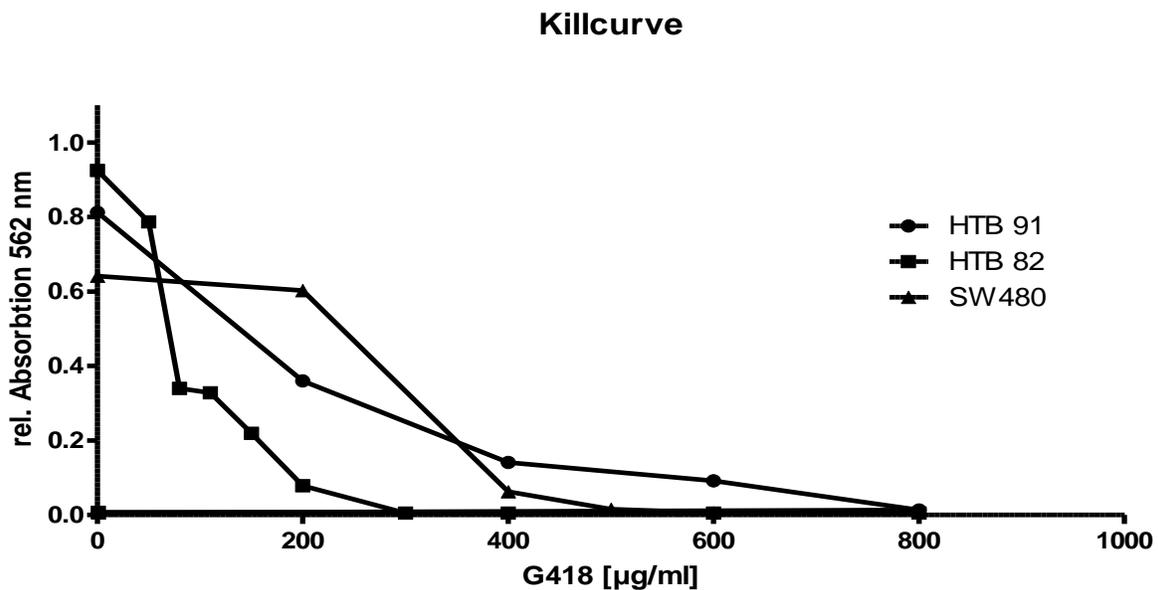
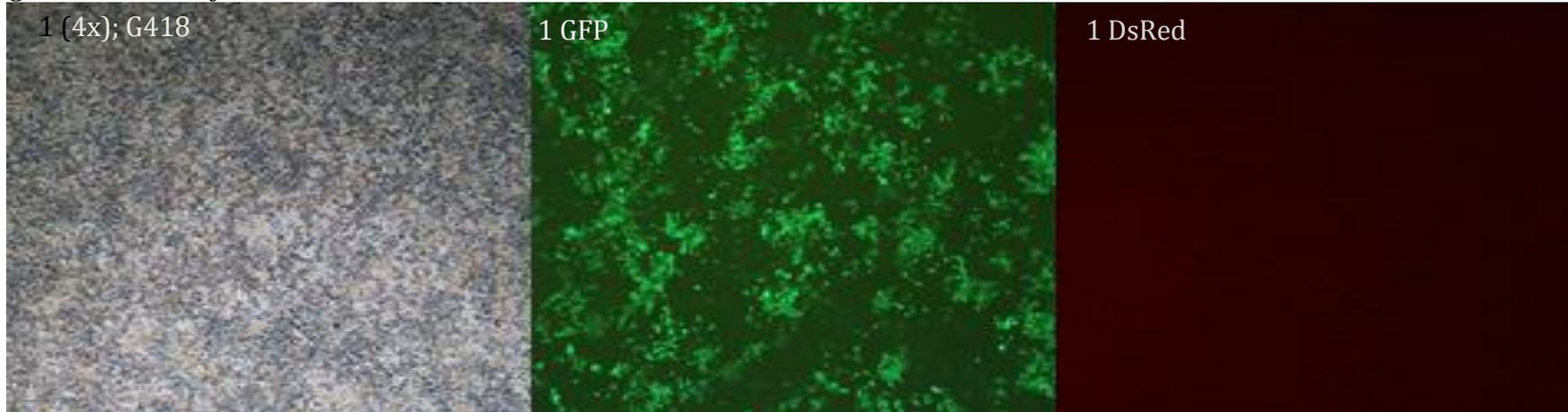


Abbildung 2.2.1.1.: Graphische Darstellung der Dosis-Wirkung-Kurve ist auf die Letaldosis der Zelllinie HTB81, HTB91 und SW480 bezogen.

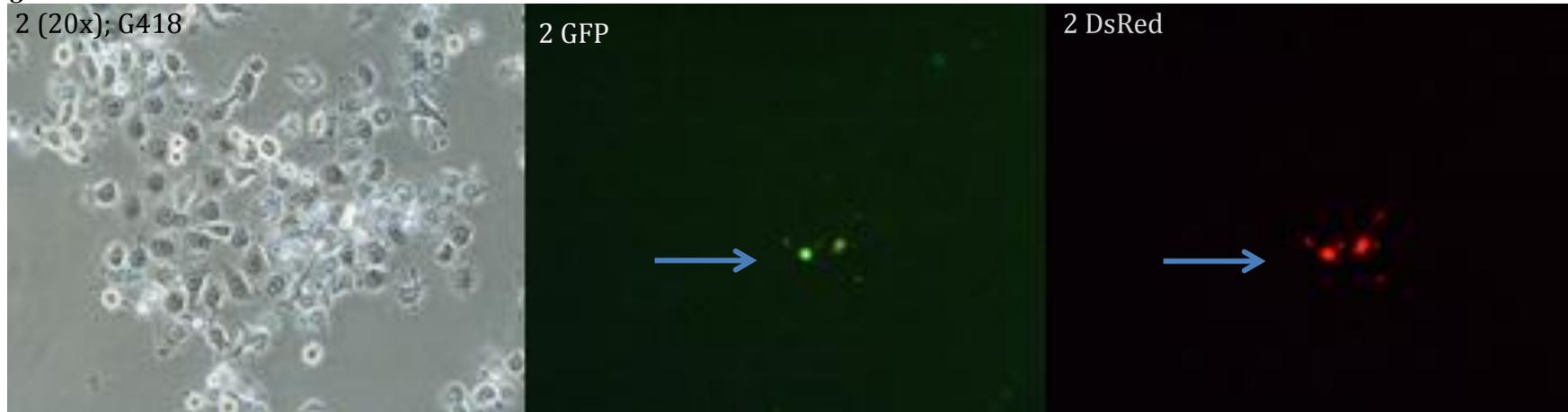
2.2. Transfektion in HTB82, HTB91 und SW480

Zelllinie HTB-82

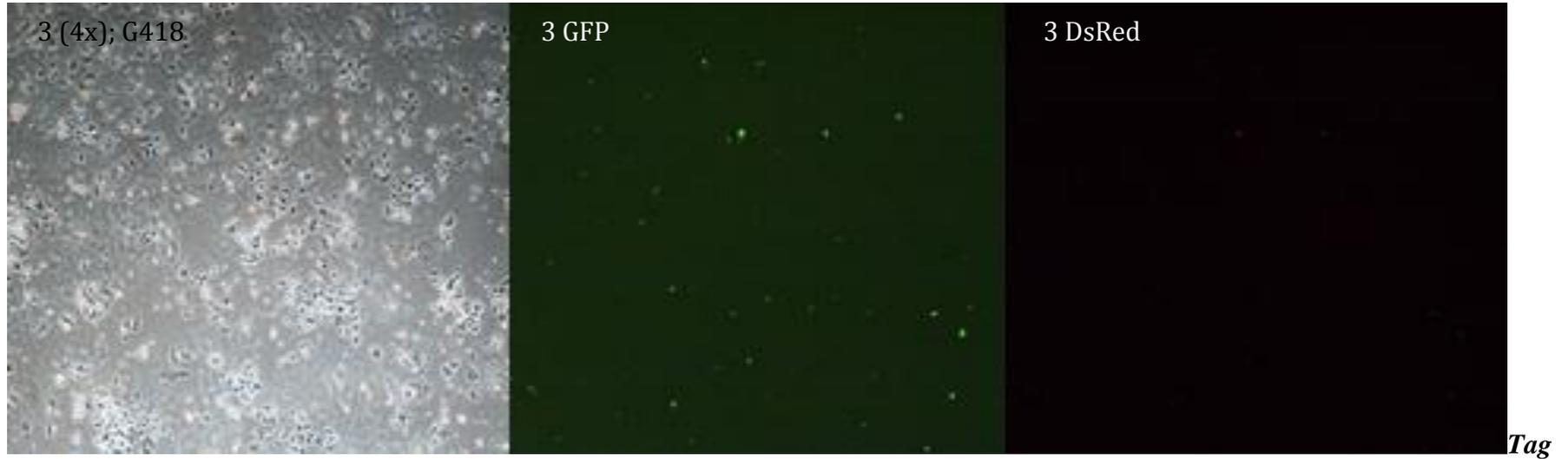
Tag nach der Transfektion



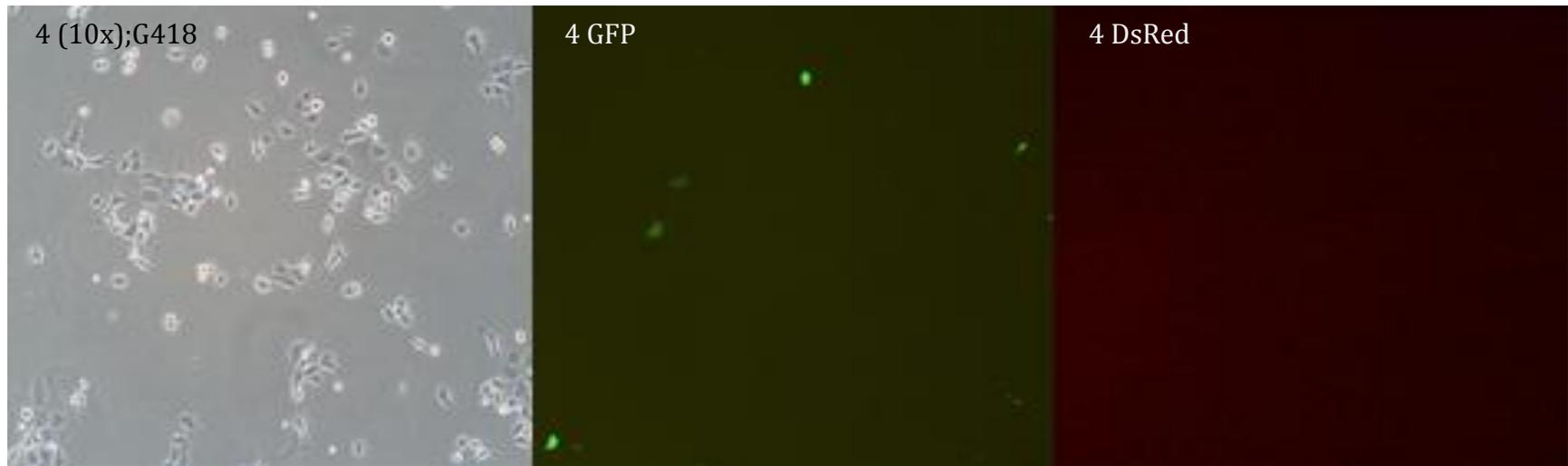
Tag 7



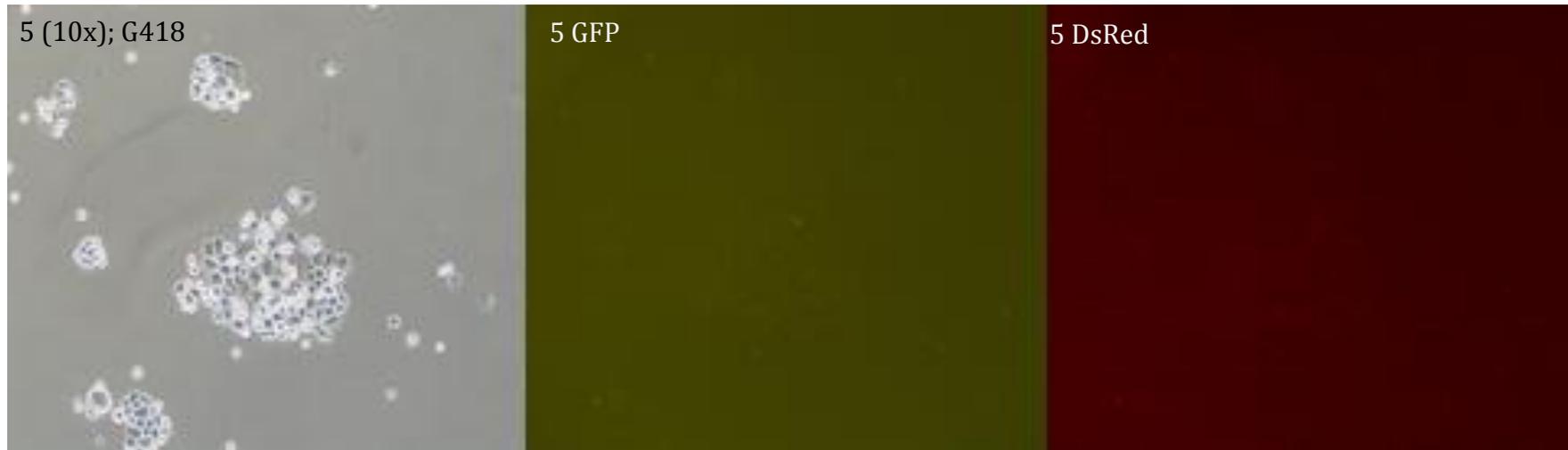
Tag14



21



Tag 24



Tag 35



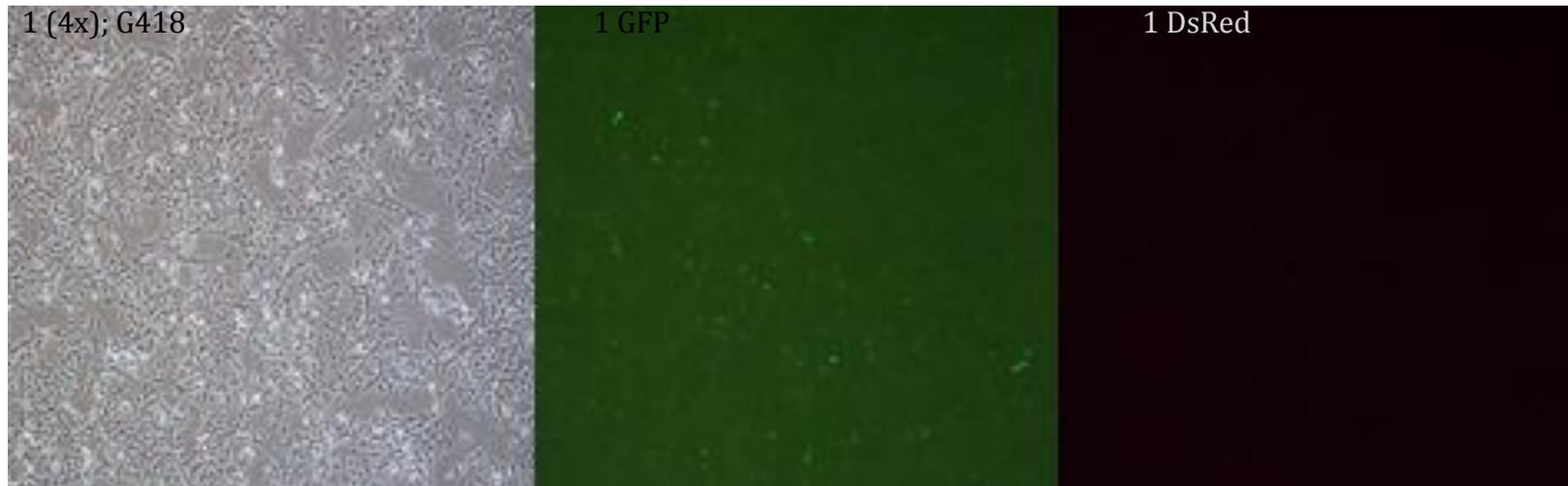
**Vergrößerung: (4x), (10x), (20x); *GFP=grüner Kanal/ DsRed=roter Kanal; *G418=Geneticin*

Abbildung 2.2.1.: Reihenfolge der Fotos nach der Transfektion von HTB82

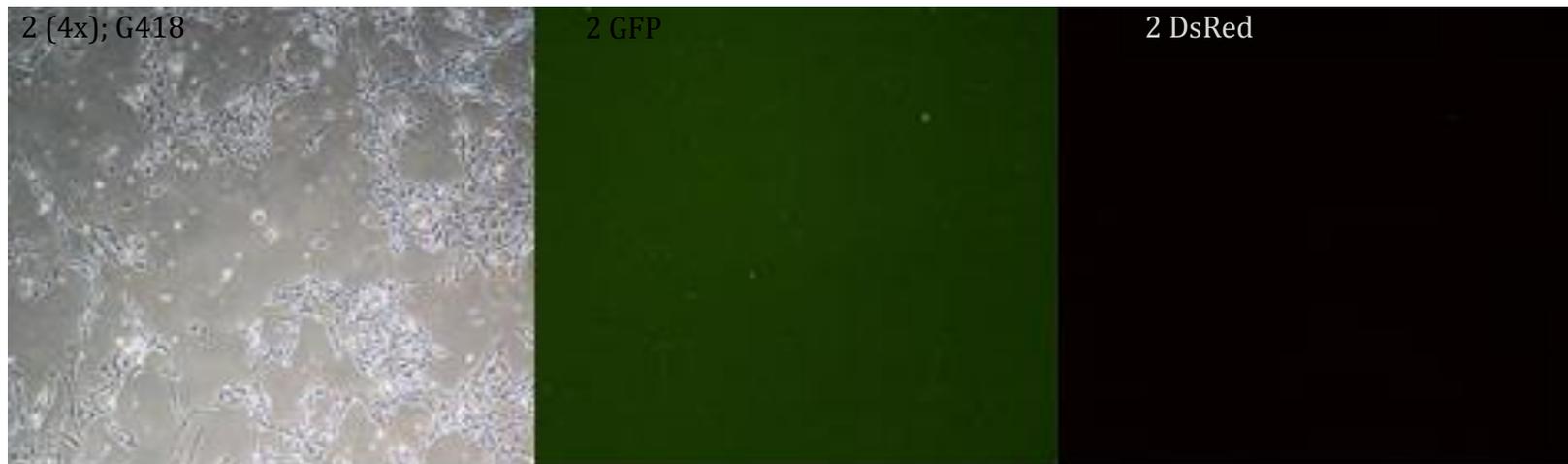
Die Abbildung 2.2.1.. zeigt eine Sequenz von Fotos über die Transfektion der Zelllinie HTB82 mit dem Plasmid pRGIIIc. Alle Bilder zeigen Zellen, die sich in verschiedenen Tagen der Selektion unter der Wirkung von G418 befinden. Die Bilder zeigen 6 Fotos an verschiedenen Tagen. Die Fotos sind von 1 bis 6 nummeriert und wurden in GFP-, DsRed- und normalen Kanal aufgenommen. Die Reihenfolge von Fotos mit der Nummer 1; 1 GFP und 1 DsRed wurden ein Tag nach der Transfektion aufgenommen. Diese zeigen eine positive Transfektionseffizienz und Expression von GFP. Die Expression von DsRed könnte nicht nachgewiesen werden. Die Fotos mit der Nummer 2, 2 GFP, 2 DsRed zeigen eine kleine Gruppe von Zellen am siebten Tag der Selektion. Die blauen Pfeile geben Zellen an, die gelb im grünen Kanal leuchten. Diese zeigen eine Doppelexpression. Die Fotos mit der Zahl 3, 3 GFP und 3 DsRed befinden am Tag 14 der Selektion. Diese Bilder zeigen tote und lebende Zellen. Die GFP-Expression scheint nicht mehr so stark wie am Anfang. Die DsRed-Expression ist ein bisschen stärker geworden. Die Fotos mit der Zahl 4, 4 GFP, 4 DsRed wurden am Tag 21 aufgenommen. In diesen Bilder kann man einige Zellen betrachten, die GFP exprimieren und andere nicht. Die DsRed-Expression könnte mikroskopisch nicht detektiert werden. Die Fotos mit der Nummer 5, 5 GFP und 5 DsRed zeigen eine kleine Gruppe von Zellen am Tag 24. In grünen und roten Kanal ist eine sehr leichte Expression von GFP und DsRed zu sehen. Die Fotos 6, 6 GFP und 6 DsRed befinden sich am Tag 35 der Selektion und zeigen das gleiche Expressionsmuster im grünen und roten Kanal wie die Zelle der Reihenfolge 5. Man kann eine Schwächung der Expression von GFP und eine leichte Zunahme der Expression von DsRed in diesen Zellen betrachten. Es scheint, als ob Zellen die GFP-Expression durch die DsRed-Expression von pRGIIIc umschalten würden.

Zelllinie HTB-91

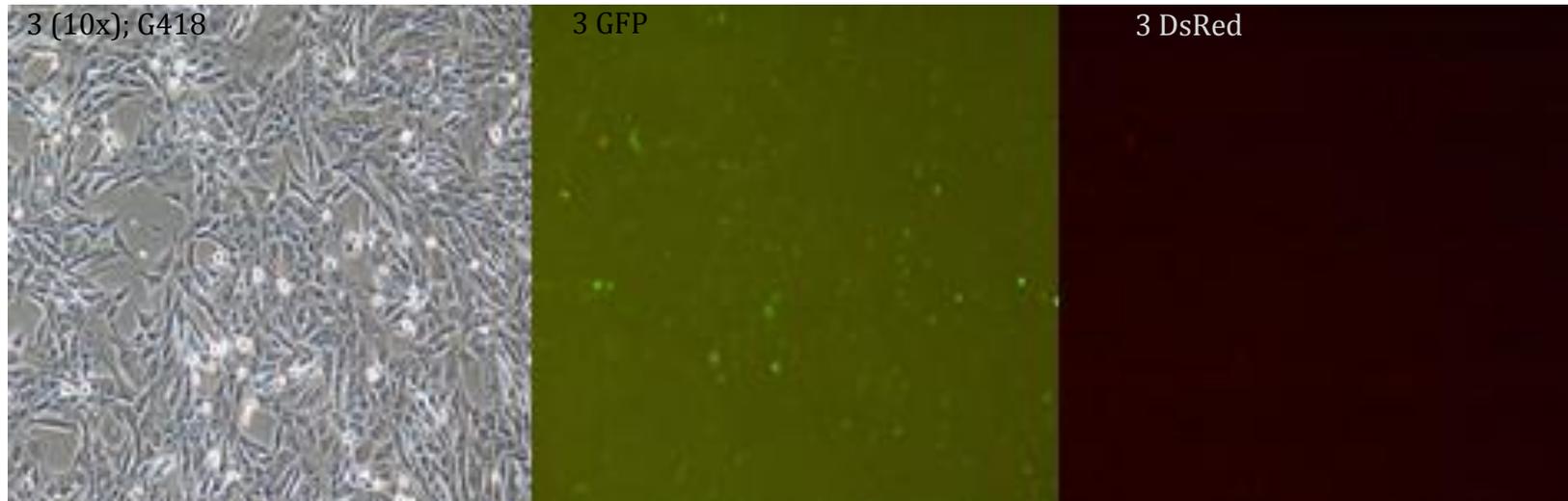
Erster Tag nach der Transfektion



Tag 15



Tag 30



*Vergrößerung (4x) und (10x); * Kanal: GFP=grüner Kanal/ DsRed=roter Kanal; G418=Geneticin

Abbildung 2.2.2.: Fotos der Transfektion in der Zelllinie HTB91

Die Abbildung 2.2.2. zeigt die Fotos der Transfektion der Zelllinie HTB91 mit dem Plasmid pRGIIIc. In den Fotos ist eine positive Transfektionseffizienz und Expression von GFP und eine leichte schwache DsRed-Expression von Plasmid pRGIIIc zu sehen. Alle Fotos sind nummeriert und befinden sich in Selektion durch das Antibiotikum G418. Die Fotos mit der Zahl 1, 1 GFP, 1 DsRed wurden am nächsten Tag nach der Transfektion aufgenommen. Am Tag 15 zeigen die Fotos fast das gleiche Expressionsmuster von GFP und DsRed. Am Tag 30 der Selektion zeigen die Fotos der Reihenfolge 3 eine schwache GFP und DsRed-Expression. Die Zellen im grünen Kanal leuchten mit verschiedener Intensität bezogen auf die GFP-Expressionsstärke. Man findet auch auf dem Foto 3 GFP schwach gelb leuchtende Zellen. Dieses Expressionsmuster wird auch als Doppelexpression betrachtet.

Zelllinie SW480

Tag 14



*Vergrößerung (4x); *G418=Geneticin

Abbildung 2.2.3.: Transfektion der Zelllinie SW480 mit dem Plasmid pRGIIIc

Die Abbildung 2.2.3. zeigt drei Fotos von SW480 in normalen, grünen und roten Kanal und eine positive Transfektionseffizienz und Expression von GFP. Die Expression von DsRed könnte nicht detektiert werden. Die Zellen befinden sich im Tag 14 der Selektion. Das Bild in grünem Kanal zeigt Zellen, die GFP exprimieren und welche, die nicht GFP exprimieren können.

2.3. Nachweis von pRGIIIc im Western blot

Um das Vorhandensein von pRGIIIc in HTB82, HTB91 und SW480 nachzuweisen, wurde ein immunologischer Test für das Protein GFP durchgeführt. Da das exprimierte EGFP-Protein von pRGIIIc als Inklusion des Exon IIIc des FGFR-2 der Ratte betrachtet ist, wurde der Antikörper gegen GFP mit einer eingesetzten Konzentration von 0,4 µg/ml angewendet. Als zweiter Antikörper diente ein HRP-konjugierter Goat anti- mouse Antikörper. Die Größe der Banden: EGFP-Band für pEGFP-C1 und pEGFP-F beträgt 30 kDa; EGFP-Band für pRGIIIc entspricht ca. 60 kDa. In jedem Versuch wurde eine Proteinkonzentration für das Gesamtprotein von 40 µg/µl pro Probe eingesetzt.

2.3.1. Gesamtzellextrakt von HTB82

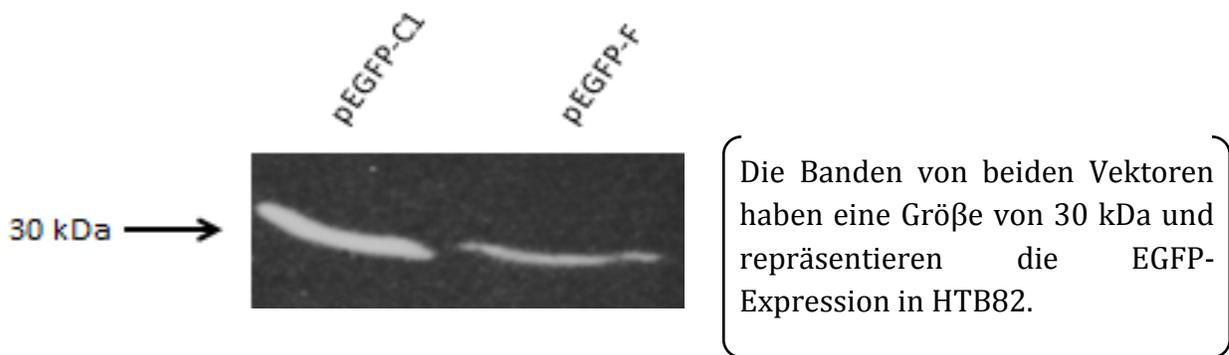


Abbildung 2.3.1.1: GFP-Expression von pEGFP-C1 und -F in HTB82

Die Abbildung 2.3.1. zeigt das GFP-Protein von zwei EGFP-Vektoren. Die EGFP-Expression von pRGIIIc könnte nicht auf Proteinniveau in dieser Zelllinie (HTB82) nachgewiesen werden.

2.3.2. Gesamtzellextrakt von HTB91

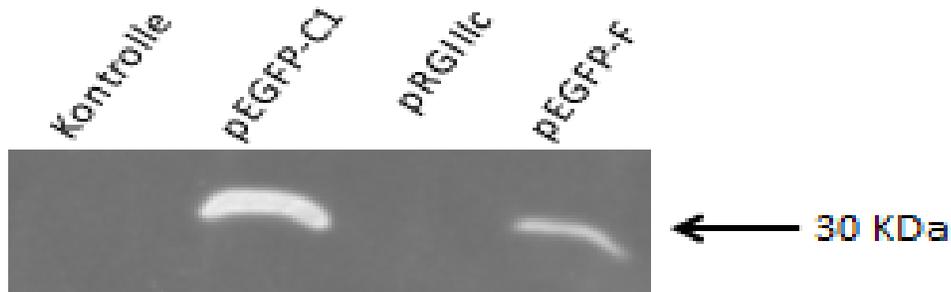
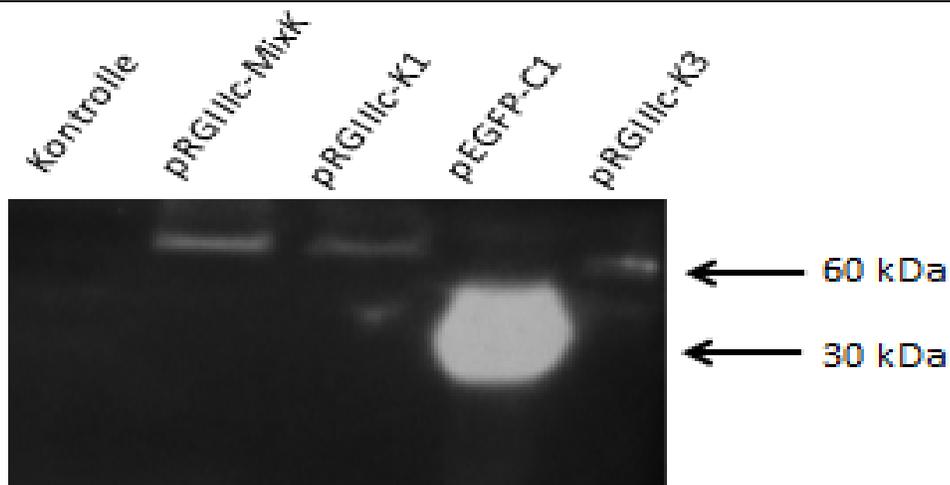


Abb. 2.3.2.1.:Expression der GFP-Proteine in HTB91

Die Abb. 2.3.2.1. zeigt das Western blot der GFP-Proteine der Plasmiden pEGFP-C1, pEGFP-F und pRGIIIc aus der Gesamtzellextrakten. Auf der Membran wurden eine kontroll-Probe bzw SW480 ohne Plasmid, zwei GFP-Kontroll-Plasmide und pRGIIIc aufgetragen. Die erwarteten Banden der GFP-Kontroll-Plasmide von 30 kDa wurden mit einem Chemolumineszenz-Substrat (SuperSignal® West Pico, Chemiluminescent Substrate) sichtbar gemacht. Die erwartete Band des EGFP-Proteins aus pRGIIIc beträgt ca. 60 kDa. Es könnte kein GFP-Protein des Plasmides pRGIIIc nachgewiesen werden. Daher wurde ein Versuch durchgeführt, wo eine erhöhte Proteinkonzentration eingesetzt wurde. (Sehe nächstes Foto).

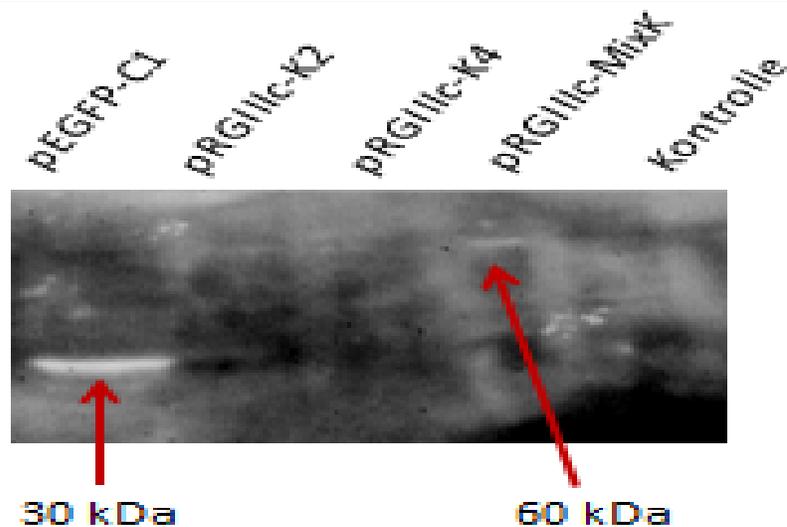


*pRGIIIc-MixK=Misch Klon von pRGIIIc in HTB91; *pRGIIIc= einzelner Klon 1 von pRGIIIc in HTB91;
*pRGIIIc-K3= Klon 3 von pRGIIIc in HTB91; Kontrolle=leere HTB91-Zellen

Abbildung 2.3.2.2.:Expression der GFP-Proteine von pRGIIIc in HTB91

Die Abb. 2.3.2.2. zeigt das Western blot des GFP-Proteins von pRGIIIc und pEGFP-C1. In diesem Versuch wurde die Proteinkonzentration auf 80 µg/µl erhöht. Der Röntgenfilm wurde 8 Stunde länger exponiert. Hier wurde als Kontrolle die unbehandelte Zelllinie HTB91 genommen. Als Kontrolle für die Proteinexpression von GFP wurde nur das Plasmid pEGFP-C1 in HTB91 genommen, welche mit einer fetten, großen Bande von 30 kDa auf dem Foto dargestellt ist. Auf der Membran wurden noch zwei zusätzliche einzelne Klone von pRGIIIc aufgetragen, die in der Abbildung 2.3.2.2. genannt sind, um die geringe Expression und Proteinproduktion von EGFP des Plasmides pRGIIIc in HTB91 zu bestätigen. Alle drei Proben zeigen Banden mit einem Molekulargewicht von ungefähr 60 kDa, die auf dem Foto angegeben sind. Damit wurde sowohl die schwache GFP-Expression von pRGIIIc als auch die Inklusion der Isoform IIIc des FGFR2 der Ratte in dieser Zelllinie nachgewiesen.

2.3.3. Gesamtextrakt von SW480



*pRGIIIc-MixK=Misch Klon von pRGIIIc in SW480; *pRGIIIc-K2= einzelner Klon 2 von pRGIIIc;
*pRGIIIc-K4= Klon 4 von pRGIIIc in SW480; *Kontrolle= SW480 ohne DNA

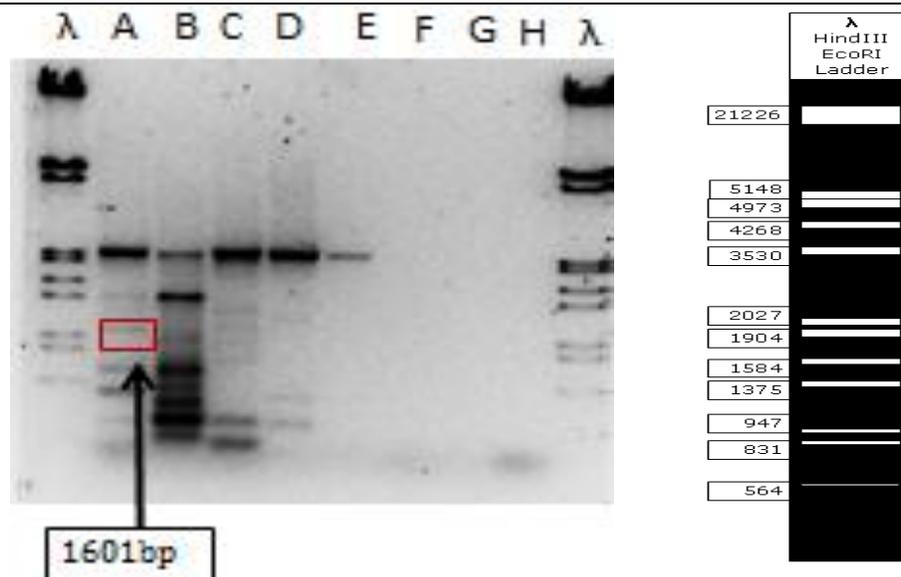
Abbildung 2.3.2.3.:Expression der GFP-Proteine von pRGIIIc in SW480

Die Abb. 2.3.2.3. zeigt das Western blot des GFP-Proteins von pRGIIIc und pEGFP-C1. Auf der Membran sind einzelne Klone (pRGIIIc-K2 und -K4) und Misch –Klone (pRGIIIc-MixK) zu sehen und sie wurden mit dem gleichen oben genannten Chemolumineszenz-Substrat sichtbar gemacht. Bei den pRGIIIc-Klonen K2 und K 4 sind nur sehr leicht erkennbaren Banden zu visualisieren. Trotzdem ist es nicht möglich, die GFP-Expression zu bestimmen.

Der Misch-Klon zeigt hingegen die erwartete GFP-Band von 60 kDa. Diese Band ist sehr schwach und schwierig zu visualisieren. Die roten Pfeile geben die GFP-Banden beider Größe des Proteins GFP an. Um die GFP-Expression von pRGIIIc und die Inklusion von Exon IIIc des FGFR2 der Ratte nachzuweisen, wurden die gleichen Proben auf RNA-Ebene gecheckt.

2.4. Nachweis von pRGIIIc auf RNA-Ebene

Zur Bestimmung von pRGIIIc wurden spezifische Primer generiert. Sowohl die Sequenz der generierten Primer als auch die angewendete Primer-Kombination befinden sich in der Tabelle 1.3.3. im Teil von Materialien und Methoden. Um festzustellen, ob die Primer richtig funktionieren, wurden sie durch PCR-Amplifikation und das Plasmid pRGIIIc vorgetestet.



*Die Buchstaben stellen ein Temperaturgradient dar: λ) Marker Lambda; A) 53°C; B) 54°C; C) 55°C; D) 56°C; E) 57°C; F) 58°C; G) 59°C; H) 60°C.

*Im Inlay ist das Verhalten im PAGE-Gel neben einem HindII/EcoRI-Lambda-Marker dargestellt

Abbildung 2.4.1.: 1% Agarose-Gel stellt den Vortest des Temperaturgradienten zur Feststellung der Optimierung der Primer-Funktionalität dar.

Die Abbildung 2.4.1. zeigt einen Temperaturgradient-Versuch. Die verschiedenen Temperaturen sind oben in der Legende angegeben. Dabei wurde die Primer-Kombination Vic_for_2 und Vic_rev_2 und die DNA von pRGIIIc genutzt. Die erwartete Bandengröße des Amplifikationsprodukts soll 1601 bp haben. Dieser Versuch wurde durchgeführt, um die besten Bedingungen in Bezug auf die Funktion der Primer zu finden.

In dem roten Rahmen der Abb. 2.4.1. befindet sich die Band mit dem richtigen PCR-Amplikon. Nach dem Programm ClonManager_Version9 sollten diese zwei Primer ab einer Temperatur von 53 °C bis zu einer Temperatur 56 °C richtig funktionieren. Dabei entstehen auch Nebenprodukte.

Informationen über Bindungsstellen der generierten Primer, die Größe des PCR-Produkts, wurden vom Programm ClonManager V9 festgestellt und sind in Anhang 7 dieser Arbeit zu finden.

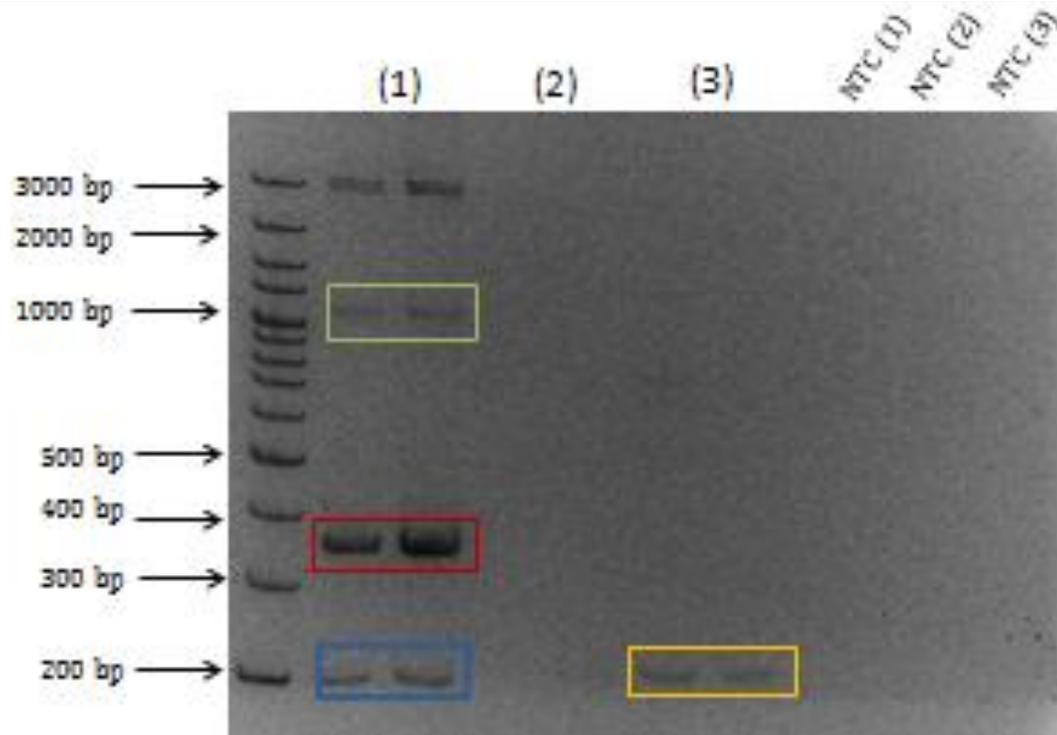
Das Ziel dieses Versuches ist es, einerseits die Expressionskassette von pRGIIIc bzw. Intron I- Exon IIIc- Intron II zu amplifizieren und andererseits die Funktion dieser Primer zu testen. Die korrekte Funktion dieser Primer ist es sehr wichtig, weil es ermöglicht, die Inklusion des FGFR2-Exon IIIc von pRGIIIc zu identifizieren.

2.4.1. Nachweis von GFP mittels PCR

In diesem Versuch wurde die GFP-Expression von pRGIIIc, pEGFP-C1 und pEGFP-F getestet. Die Primer-Sequenz ist im Teil Materialien und Methoden; Tabelle 1.3.3. zu finden. Das Ergebnis der PCR-Produkte wurde auf ein PAGE-Gel aufgetragen und diese sind in Anhang 8 dieser Arbeit zu finden.

Die erwartete Größe der GFP- Bande laut dem Programm ClonManager V.9 beträgt 797 bps für pRGIIIc, 434 bps für pEGFP-C1 und 434 bps für pEGFP-F. Die Proben wurden in Parallelbestimmungen aufgetragen. Die Abbildung 2.4.1.1. (Sehe Anhang 8) zeigt die PCR-Amplifikationsprodukte von pRGIIIc, pEGFP-C1 und pEGFP-F. Die Pfeile geben die Banden-Größe der entsprechenden PCR-Amplifikationsprodukte an. In grünen und orangen Rahmen auf der Abb. 2.4.1.1. befinden sich die GFP-Banden von pEGFP-C1 und -F (Proben **e** und **f**) und im roten Rahmen befindet sich das PCR-Amplifikationsprodukt (Probe **c**) von pRGIIIc. Damit ist die Funktionalität der GFP-Primer positiv nachgewiesen. Die Identifizierung der GFP-Expression mittels PCR-Amplifikation bestätigt die Inklusion des Exons IIIc von pRGIIIc in den transfektierten STS-Zelllinien.

2.4.2. Nachweis der Expression von pRGI1c in HTB91 mittels RT-PCR



*Die PCR_Proben sind nach folgenden Primer-Kombinationen nummeriert:

(1) T7/Vic_Rev_2

(2) M13/Vic_rev_2

3) Vic_for_2/Vic_rev_2

Abb. 2.4.2.1.:PCR-Amplifikation der transfektierten Zelle HTB91 mit pRGI1c

In diesem Versuch wurde die genomische DNA der Zelllinie HTB91 verwendet. Hier wurden drei unterschiedlichen Primer-Kombinationen angewendet. Je nach Primer-Kombination sind unterschiedliche PCR-Produkte zu erwarten. Die erwartete PCR-Produkte für jede Primer-Kombination sind in der Tabelle 1.3.3. im Teil Materialien und Methoden zu finden. Die Größe der PCR-Produkte für die Primer-Kombination (1) sind in gefärbten Rahmen auf der Abb. 2.4.2.1. angegeben. In Blau befindet sich ein kleines Produkt mit der Größe von 212 bps. In Rot ist das Produkt mit einer Größe von 367 bp zu sehen. In Grün ist ein Produkt zu sehen, das möglicherweise durch die nicht gespleißte prä-mRNA entstanden wurde. Für die Primer-Kombination (1) sind nur drei mögliche PCR-Produkte zu amplifizieren.

Für die Kombination (2) gelten auch fast die gleiche Band-Größe sowie die Anzahl der Produkte. Bei dieser Kombination wurde kein PCR-Produkt auf dem Gel identifiziert. Im Fall der Primer-Kombination (3) wurde in der Abbildung 2.4.2.1. nur ein PCR-Produkt mit der Größe von 208 bp identifiziert. Laut dem Programm Clon Manager V.9 können drei unterschiedliche PCR-Produkte durch die drei unterschiedlichen Primer-Kombinationen hergestellt wurden.

Die amplifizierten PCR-Produkte hat eine Länge von 208 bps, was dem Skipping des Exon IIIc und der DsRed-Expression von pRGIIIc in HTB91 entspricht. Die Band 367 bps ist mit der Inklusion des Exons IIIc und mit der GFP-Expression von pRGIIIc in HTB91 assoziiert.

2.5. Gemessene Expressionswerte von pRGIIIc durch RT-PCR

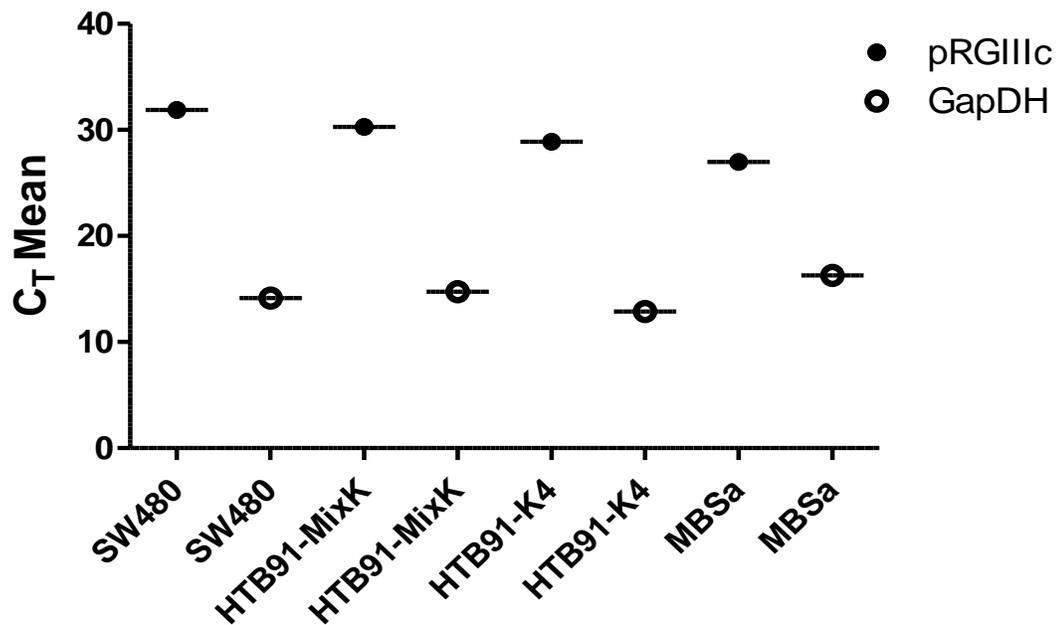


Abbildung 2.5.1.: Graphische Darstellung des CT-Wertes von pRGIIIc und GapDH.

Die Abb. 2.5.1. zeigt verschiedene Expressionsstärken von pRGIIIc in den drei Zelllinien. Die Expressionsstärke von GapDH wird parallel dargestellt und ist sehr stark in allen drei Zelllinien. Die Expressionsstärke von pRGIIIc ist in allen drei Zelllinien schwach. In der

Tabelle 2.5.1.1. ist der Unterschied zwischen Expressionsstärken des CT-Wertes von pRGIIIc und GapDH in Bezug auf die Abbildung 2.5.1. zu finden.

Tabelle 2.5.1.1. Δ CT Werte berechnet aus der Expression von pRGIIIc und GapDH

Zelllinie	Δ CT-Wert
SW480	17,75
HTB91-MixK	15,55
HTB91-K4	15,98
MBSa	10,70

In der Zelllinie SW480 war die Expression von pRGIIIc sehr gering, genau sowie in der HTB91-Zelllinie. In der Zelllinie MBSa war die Expression von pRGIIIc eher ein bisschen stärker als in den Zelllinien SW480 und HTB91. In der Abbildung 2.5.2. sind die RT-PCR-Produkte auf einem PAGE-Gel zu finden.

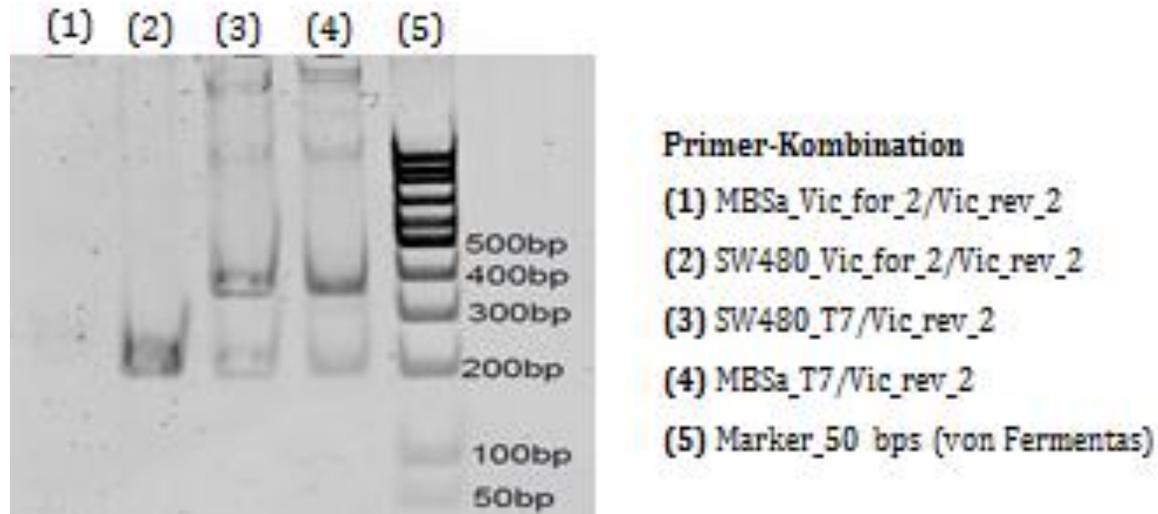


Abbildung 2.5.2.: PAGE-Gel zeigt RT-PCR-Produkt neben einem 50 bps-Marker

Auf der rechten Seite der Legende ist eine Auflistung über die verwendeten Primer-Kombinationen (z.B. T7/Vic-Rev_2) und die DNA der angewendeten Zelllinien (z.B. SW480) zu sehen. Durch Primer-Kombination (Vic_for_2/Vic_rev_2) könnte kein spezifisches Produkt in den einzelnen Zelllinien identifiziert werden. Durch die Primer-Kombination (T7/Vic_rev_2)

wurden zwei Produkte in Probe (3) und (4) in beiden Zelllinien SW480 und MBSa identifiziert. Eines davon liegt zwischen den Banden 400 und 300 bps des Markers und ist als Inklusion des Exons IIIc von pRGIIIc betrachtet. Das kleinste Produkt hat eine Länge von 212 bp. Dieses Produkt ist als Skipping des Exons IIIc von pRGIIIc bzw. als DsRed-Protein betrachtet. Die Information über die Produktlänge der vorhandenen Amplikons im PAGE-Gel der Abb. 2.5.2, die durch die Anwendung der oben genannten Primer-Kombinationen generiert wurden, ist in der Tab. 1.3.3. im Teil „Materialien und Methoden“ zu finden. Die RT-PCR-Produkte sollten eine Länge von 212 und 367 bps haben.

Im Fall der Primer-Kombination (Vic-for_2/Vic-rev_2) wurde nur ein Produkt in der Zelllinie SW480 identifiziert, die man in Probe (2) zu sehen ist. Bei der Probe (1) wurde kein spezifisches Produkt identifiziert.

3. Suche nach ortho- und paralogen Sequenzen des FGFR2 und der Spleißvarianten IIIb/IIIc

Dieser Versuch sucht nach Ähnlichkeiten zwischen der Sequenz bzw. Introns und dem skipping Exon IIIc des FGFR-2 der Ratte in pRGIIIc und Sequenzen bzw. Spleißvarianten IIIb/IIIc des FGFR 2 des Menschen. Dabei wurde das Programm ClonManager Version 9 für die Alignments angewendet.

3.1. Feststellung der Exon IIIc-Sequenz des FGFR2 der Ratte von pRGIIIc

Es wird festgestellt, ob die Exon IIIc-Sequenz des FGFR2 der in pRGIIIc wirklich die richtige Sequenz ist. Dabei können Unterschiede zwischen Sequenzen entdeckt werden, die zum Beispiel durch Deletion in pRGIIIc induziert wurden. Man kann auch die Lokalisation (Position) des Exon IIIc auf der mRNA des kompletten Gens (FGFR2) der Ratte (4306 bps) identifizieren, und somit kann die Position des Exon IIIb und Introns lokalisiert werden. Die zum vergleichenden Sequenzen sind: 1) komplette mRNA-Sequenz des FGFR2 der Ratte, 2) Exon IIIc-Sequenz der Ratte (145 bp), 3) Exon IIIc des FGFR2 des Menschen und die skipping Exon IIIc-Sequenz von pRGIIIc (146 bp). Ein Vergleich mit den Exon IIIc-Sequenz des Menschen wird durchgeführt. Die Spleißvarianten IIIb/IIIc (417/508 bp) des FGFR2 des Menschen wurden mit den Primern des Labors vom Prof. Klaus Holzmann mittels PCR generiert. Basen, die sich im grünen Bereich befinden, sind homologe Segmente zwischen Sequenzen. Basen, die nicht in einem grünen Bereich liegen, sind entweder durch den Austausch von Basen oder durch das Symbol (-) gekennzeichnet. Das Symbol (-) kann eine Deletion oder die Abwesenheit von Basen bedeuten.

■ Homology Block: Percent Matches 100 Score 145 Length 145

Sequence View: Similarity Format, Color areas of high matches at same base position

NM_FGFR2_Ratte	1241	gccgcccgggtgtaaacaccacggacaaagaaattgaggttctctatattcg
FGFR2_IIIc_Ratte	1	gccgcccgggtgtaaacaccacggacaaagaaattgaggttctctatattcg
NM_FGFR2_Ratte	1291	gaatgtaacttttgaggatgctggggaatatacgtgcttggcgggtaatt
FGFR2_IIIc_Ratte	51	gaatgtaacttttgaggatgctggggaatatacgtgcttggcgggtaatt
NM_FGFR2_Ratte	1341	ctatcgggatatacctttcactctgcatggttgacagttctgccag
FGFR2_IIIc_Ratte	101	ctatcgggatatacctttcactctgcatggttgacagttctgccag

Abb.3.1.1.: Alignment zwischen der gesamten mRNA des FGFR2 der Ratte (NM_FGFR2_Ratte 4306 bps) und der Exon IIIc-Sequenz des FGFR2 der Ratte (145 bps).

Die Abbildung 3.1.1. zeigt einerseits die Homologie (100%) zwischen der gesamten mRNA des FGFR2 der Ratte (NM_FGFR2_Ratte) und der Exon IIIc Sequenz des FGFR2 der Ratte (Transkript_FGFR2) und andererseits die Position (1241-1385) des Exon IIIc in der mRNA des FGFR2.



Abb.3.1.2.:Alignment zwischen der gesamten mRNA des FGFR2 der Ratte (NM_FGFR2_Ratte), der Exon IIIc-Sequenz (FGFR2_IIIc_Ratte) und pRGIIIc.

Die roten Pfeile in der Abb. 3.1.2. zeigen Modifikationen am Anfang und am Ende des Exons von pRGIIIc. Die erste Modifikation am Anfang von pRGIIIc zeigt eine Base (G) weniger und am Ende eine Base mehr (C). Eine Deletion (-) in der Mitte des Exons von pRGIIIc (im roten Kreis) ist auch in der Abb. 3.1.2. dargestellt. Die Gründe für die Modifikationen in der Exon-IIIc-Sequenz von pRGIIIc sind in der Diskussion Seite 134 zu finden.

3.2. In Silico Analyse der Exon IIIb/IIIc der Ratte durch die des Menschen

Vergleich zwischen der gesamten mRNA des FGFR2 der Ratte und dem Exon-IIIb des FGFR2 der Ratte (FGFR2_IIIb_Ratte). Exon IIIb ist in der Position 1067-1384 lokalisiert und hat eine Größe von 318 bp. Nach dem Programm ClonManager V.9 wurde eine Homologie zwischen Sequenzen von 100% identifiziert.

■ Homology Block: Percent Matches 100 Score 318 Length 318

Sequence View: Similarity Format, Color areas of high matches at same base position

```

NM_FGFR2_Ratte      1067 cccatcctccaagctggactgcctgcaaatgcctccacggtggtcggaggggacgtagaatttgtctgca
FGFR2_IIIb_Ratte    1    cccatcctccaagctggactgcctgcaaatgcctccacggtggtcggaggggacgtagaatttgtctgca

NM_FGFR2_Ratte      1137 aggtttatagtgatgccagcccatatccagtgatcaaacatgtggaaaagaacggcagtaaatatgg
FGFR2_IIIb_Ratte    71   aggtttatagtgatgccagcccatatccagtgatcaaacatgtggaaaagaacggcagtaaatatgg

NM_FGFR2_Ratte      1207 acctgatgggctgcctacctcaagtcctgaaggccgctgttaacaccacggacaagaattgag
FGFR2_IIIb_Ratte    141  acctgatgggctgcctacctcaagtcctgaaggccgctgttaacaccacggacaagaattgag

NM_FGFR2_Ratte      1277 gttctctatattcggaatgtaactttgaggatgctggggaatatacgtgcttggcgggtaattctatcg
FGFR2_IIIb_Ratte    211  gttctctatattcggaatgtaactttgaggatgctggggaatatacgtgcttggcgggtaattctatcg

NM_FGFR2_Ratte      1347 ggatatacctttcactctgcatggttgacagttctgcca
FGFR2_IIIb_Ratte    281  ggatatacctttcactctgcatggttgacagttctgcca
  
```

Abb. 3.2.1.: Alignment zwischen der gesamten mRNA des FGFR2 der Ratte und dem Exon-IIIb des FGFR2 der Ratte (FGFR2_IIIb_Ratte).

In der Abb. 3.2.1. ist die Position von Exon IIIb innerhalb der Basen 1067-1384 lokalisiert und es hat eine Länge von 318 bps.

Local DNA homologies. Mol 1 NM_FGFR2_hs (1 to 4654) Mol 2 NM_FGFR2_Ratte (1 to 4306)
Both strands. Method: Needleman-Wunsch (Match 1, Mismatch 1, Gap 1)

Percent Matches	Score	Length	Mol 1		Mol 2	
			Start	End	Start	End
80	1988	3485	290	3774	11	3429
67	460	1033	26	1058	4	1059
73	358	1156	3499	4654	3085	4296
79	151	813	2680	3492	2384	3160
48	116	680	3605	4284	3063	3745
51	109	697	3605	4301	3063	3684
50	103	660	838	1497	1236	1906
52	100	530	45	574	540	2 C
50	100	702	1930	2631	4197	3562 C
53	98	503	45	547	540	13 C
49	98	644	3007	3650	1942	1249 C
52	97	529	45	573	540	26 C

Abb. 3.2.2.: Alignment der mRNA des FGFR2 des Menschen (Mol 1) und der mRNA des FGFR2 der Ratte (Mol 2).

In Abb. 3.2.2. wird dem Prozent der Homologie zwischen der mRNA des FGFR2 des Menschen (Mol 1) und der mRNA des FGFR2 der Ratte (Mol 2) gezeigt. Die Homologie beträgt 80%. Der Sequenz-Vergleich bzw. Basen-Unterschiede könnte nicht dargestellt werden, weil die Sequenzen sehr lang sind.

Sequence View: Similarity Format, Color areas of high matches at same base position

NM_FGFR2_Ratte	892	cgccaacactgtgaagttccgctgtccagccgggggaatccaacaccacaatgaggtggctaaaaaacgggaaggagtttaagcaggagcatcgcatcggaggctata
NM_FGFR2_hs	1160	ggccaacactgtcaagttccgctgtcccagccgggggaacccaatccaaccatcgcggtggctgaaaaacgggaaggagtttaagcaggagcatcgcatcggaggctaca
FGFR2_IIIb_Ratte		-----
product FGFR2 II	1	-----aacgggaaggagtttaagcaggagcatcgcatcggaggctaca
NM_FGFR2_Ratte	1002	aggtacgaaaccagcactggagccttattatggaaagtgtggtcccatcgacaaaggcaattacacctgcctggggagaatgaatacgggtccatcaaccacacctac
NM_FGFR2_hs	1270	aggtacgaaaccagcactggagcctcattatggaaagtgtggtcccatctgacaagggaaattataacctgtgtagtgagaatgaatacgggtccatcaatcacagctac
FGFR2_IIIb_Ratte		-----
product FGFR2 II	44	aggtacgaaaccagcactggagcctcattatggaaagtgtggtcccatctgacaagggaaattataacctgtgtagtgagaatgaatacgggtccatcaatcacagctac
NM_FGFR2_Ratte	1112	caccttgatgttgttgagcgatcaccacacggcccacctccaagctggactgctgcaaatgcctccacgggtgggaggggacgtagaatttctctgcaagggtta
NM_FGFR2_hs	1380	caccttgatgttgttgagcgatcgctcaccggcccacctccaagcgggactgcggcaaatgcctccacagtggtcggaggagacgtagaatttctctgcaagggtta
FGFR2_IIIb_Ratte	1	-----cccatcctccaagctggactgctgcaaatgcctccacgggtgggaggggacgtagaatttctctgcaagggtta
product FGFR2 II	154	caccttgatgttgttgagcgatcgctcaccggcccacctccaagcgggactgcggcaaatgcctccacagtggtcggaggagacgtagaatttctctgcaagggtta
NM_FGFR2_Ratte	1222	tagtgatgcccagcccacatccagtgatcaaacatgtgaaaagaacggcagtaaatatggacctgatgggctgcctacctcaaggtcctgaagcactcggggataa
NM_FGFR2_hs	1490	cagtgatgcccagcccacatccagtgatcaagcacgtgaaaagaacggcagtaaatatgggcccgacgggctgcctacctcaaggttctcaaggcccggtgtta
FGFR2_IIIb_Ratte	78	tagtgatgcccagcccacatccagtgatcaaacatgtgaaaagaacggcagtaaatatggacctgatgggctgcctacctcaaggtcctgaa-----
product FGFR2 II	264	cagtgatgcccagcccacatccagtgatcaagcacgtgaaaagaacggcagtaaatatgggcccgacgggctgcctacctcaaggttctcaagcactcggggataa
NM_FGFR2_Ratte	1332	atagctccaatgcagaagtgcctgctctgttca-----atgtgacggagatggatgctggggaatatatatgtaaggtctccaattatatagggcaggccaaccagtct
NM_FGFR2_hs	1600	acaccacggacaagagattgaggttctctatattcggaatgtaacttttgaggacgctggggaatatatcgtgcttggcgggtaattctattgggatcccttcaactct
FGFR2_IIIb_Ratte		-----
product FGFR2 II	374	atagttccaatgcagaagtgcctgctctgttca-----atgtgacggag-----

Abb.3.2.3.: Alignment zwischen der gesamten mRNA des FGFR2 (Ratte und Mensch), Exon IIIb des FGFR2 (Ratte und Mensch).

Die Unterschiede zwischen der Sequenz des Menschen und der Ratte sind die Basen, die sich im nicht grünen Bereich befinden. In der Abb. 3.2.3. wurde die Länge eines PCR-Produktes (Amplicons) mit der Länge des IIIc Exons mitamplifiziert, um die Länge des humanen Exons IIIb in der gesamten RNA-Sequenz des FGFR 2 des Menschen zu lokalisieren. Auch hier wird die gesamte Vergleich-Analyse teilerweise gezeigt.

VI DISKUSSION

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde die Expression der FGF-Rezeptoren in Zelllinien der Weichteilsarkomen des Menschen und des Hundes untersucht. Die Expression der mRNA der fünf FGF-Rezeptoren und ihre Varianten (IIIb/IIIc) wurde mittels RT-PCR analysiert und quantitativ bestimmt.

Bei den untersuchten Zelllinien handelte es sich um zwei humane Zellliniengruppen und eine canine Zellliniengruppe, die als Biogruppen dargestellt sind. Die Biogruppe der Fibroblasten besteht aus drei verschiedenen Fibroblastenzelllinien, einer embryonalen Lungenfibroblastenzelllinie (F2000), einer fetalen Zelllinie (Wi38) und einer epidermalen Fibroblastenzelllinie (HAUT). Die Biogruppe der STS-Humanen besteht aus fünf verschiedenen Zelllinien, einem Rhabdomyosarkomzelllinie (HTB82), einem Fibrosarkom (HTB91), einem Liposarkom (HTB92), einem Chondrosarkom (HTB94), einem Fibrosarkom (HT1080). Die Biogruppe der STS-Caninen besteht aus drei verschiedenen Zelllinien, zwei Fibrosarkomzelllinien (CoFSA und MBSa) und einer Zelllinie (PSTS), von der keine Information über Morphologie zur Verfügung steht. Die canine Zelllinien wurden in Kooperation mit der VedMed-Universität für das Pilotprojekt von Nicole Reichmann in Bezug auf Weichteilsarkome des Hundes mitgescreent. Information über die Expression der einzelnen FGF-Rezeptoren und Varianten der jeweiligen STS-Zelllinien sind auch in der Diplomarbeit von Dr. med univ Heinrich Steinhoff (Steinhoff, H.A. 2009) zu finden.

Bei den Tumorzellen vom fibroblastoidem Ursprung (HTB91, HTB92, HTB94, Wi38 und HAUT) wurde eine stärkere Expression der Spleißvariante FGFR-2 IIIc im Vergleich zu ihrer Variante FGFR-2 IIIb beobachtet. Genau dieses Expressionsmuster der mesenchymalen Zellen wird auch in der Literatur beschrieben (Katoh, 2008). Im Gegenteil dazu wird für Tumorzellen vom epithelialen Ursprung eine stärkere Expression der FGFR-2 IIIb beschrieben (Katoh, 2008). In dieser Arbeit zeigte sich ein ähnliches Verhalten. Katoh erwähnt aber auch eine Erhöhung der Malignität des Tumors, die durch eine Veränderung in der Produktion der Isoformen von FGFR-2 IIIb zu FGFR-2 IIIc begleitet wird. Die epithelialen Tumoren kann diese Veränderung der Isoformen zu stärkerer Expression der Variante FGFR-2 IIIc verursachen. Da es sich dabei um Zelllinien handelt und die klinischen Informationen zu den

Gewebe fehlen, ist dies hier nicht verifizierbar. Zu diesem Punkt ist fraglich, ob die Zellen der Weichteilsarkome in ihrem Wachstum denen von Katoh untersuchten Tumorzellen (Prostata- und Blasenkarzinom) gleich oder ähnlich ist.

In Bezug auf den FGFR-1 hat (Goldstein, 2007) eine Überexpression in den primären Rhabdomyosarkomzellen HTB82 (A-204) gegenüber normalen skeletalen Muskelzellen festgestellt. In den Zellmodellen HTB91, HTB94, HT1080, HAUT und Wi38 wurde in dieser Arbeit eine stärkere Expression des FGF-Rezeptors 1 als in HTB82 festgestellt. Das führt zu dem Schluss, dass der FGFR-1 in den STS-Zellmodellen stärker exprimiert ist, als in den normalen skeletalen Muskelzellen. In Weichteilsarkomen wurde auch die Bedeutung eines Singlenukleotid-Polymorphismus Arg³⁸⁸ in der Transmembran-Domäne des FGFR-4 in Weichteilsarkomen gezeigt, was zu einer Verschlechterung der Prognose der Überlebenszeit führt (da Costa Andrade, 2007). Morimoto, (Morimoto, 2003) stützt die Ergebnisse von da Costa, als er eine Verbesserung der Prognose für Weichteilsarkome beschrieb, wenn Patienten Träger des Gly/Gly Alleles sind.

Die Arbeit von Ishibe (Ishibe, 2005) beschreibt die Expression der FGF-Rezeptoren 1-4 und FGFR-2 IIIb und IIIc sowie die Expression von 22 FGF in der Zelllinie HT1080. Dabei entspricht das Expressionsmuster des FGFR-3 dem in dieser Arbeit gefundenen. FGF8 konnte als Wachstumssignal identifiziert werden. In den Versuchen, wo der FGF-Rezeptor-3 blockiert wurde, wurde das Wachstum des Zellmodells HT1080 in vivo und in vitro angehalten. Wysoczynski (Wysoczynski, 2010) hat den Anstieg des FGF8 für Rhabdomyosarkomzellen bei Hypoxie nachgewiesen. Studien über erhöhte Serumkonzentrationen von endothelialen Wachstumsfaktoren wie Endostatin, VEGF, bFGF (FGF2) und aFGF (FGF1), die mit der Tumorgroße assoziiert sind, sind in den Arbeiten von (Graeven, 1999) und (Feldman, 2001) zu finden.

In allen Genexpressions-Screenings dieser Diplomarbeit wurden hauptsächlich humane Primer angewendet. Da es zwischen humanem und caninem Genom starke Unterschiede gibt, die mit einzelnen Basen beider Sequenzen assoziiert sind, könnten die humanen Primer nur hochkonservierte Sequenzen der FGFR-Gene des Hundes spezifische Gensegmente amplifizieren (Sequenzunterschiede zwischen Hund und Human sowie Simulationen der

generierten Gensegmente in in Silico Analyse werden in der Dissertation von Nicole Reichman beschrieben, da sie noch an diesem Projekt arbeitet.

Es hat sich herausgestellt, dass die verwendeten menschlichen Primer in den Hundezellen nicht immer spezifisch binden sowie unterschiedliche cDNA-Sequenzen generieren (Dissertation Nicole Reichmann). Das musste zum Ausschluss einzelner Proben des FGFR-2 IIIc sowie der FGFR-3 Varianten IIIb und IIIc führen.

Eine der Aufgabenstellung in dieser Arbeit war es auch, menschliche STS-Zelllinien auszusuchen, welche eine geringe oder mittlere Expressionsstärke der Spleißvariante IIIc des FGFR-2 darstellen, um die Funktionalität des Plasmides pRGIIIc von (Oltean, 2008) zu charakterisieren. Da es sehr schwierig war, die Funktion bezüglich der Expression von EGFP und DsRed des Plasmides pRGIIIc in humanen STS-Zelllinien zu charakterisieren, wurde eine Hunde-STS-Zelllinie (MBSa) und eine Kolonrektalkarzinom-Zelllinie (SW480) mitanalysiert, um sicher zu stellen, dass pRGIIIc keinen Defekt hat, der seine Funktion stören kann, wie zum Beispiel Defekte im EGFP oder DsRed. Zu den ausgewählten STS-Zelllinien gehören HTB82, HTB91, HTB92 und HTB94. Der Ct-Wert von HTB82 beträgt 24.03, von HTB91 = 34.04, von HTB92 = 31.3, von HTB94 = 21.20. Das bedeutet, dass die Expression von FGFR2-IIIc in HTB82 und HTB94 etwa 1000-mal höher war als in HTB91 und HTB92 (delta Ct=10 entspricht einem RQ $\sim 2^{10} \sim 1000$). Es war daher zu erwarten, dass pRGIIIc in HTB82 und HTB94 stark exprimiert und so gespleißt wird, dass IIIc eingeschlossen wird und der Reporter gelb fluoresziert. Da der Reporter entweder rot oder grün fluoresziert und gelb ist die Mischung aus beiden Ergebnissen in einer einzelnen Zelle. Im Gegensatz dazu sollten die Zelllinien HTB91 und HTB92 nur geringe Mengen an grünem Reporter exprimieren. In weiteren Transfektionsversuchen wurden noch zwei Zelllinien SW480 und MBSa selektiert, um herauszufinden, ob pRGIIIc auch in Kolonrektalzellen (SW480) und in einer Hunde-STS-Zelllinie (MBSa) funktioniert.

Die Transfektion in HTB92 und HTB94 wurde als Vorversuch durchgeführt, um die Funktionalität der GFP-Kontroll-Plasmiden (pEGFP-F/-C1) und des DsRed-Plasmides zu analysieren und beobachten. Außerdem erlaubt dies, einen Vergleich zwischen den Expressionen (GFP und DsRed) der Kontroll-Plasmiden (pEGFP-C1/-F und DsRed-N2) mit dem Plasmid pRGIIIc durchzuführen. Laut Cooper (Cooper, 2005, Cooper, 1985) sollen EGFP-

und DsRed-Kontroll-Plasmide ohne Insert (gen of interest) in Zelllinien anderer Spezies problemlos funktionieren. In der Studie von Cooper wurde eine positive Funktion der Kontroll-Plasmide festgestellt. Die Ergebnisse von Cooper zeigen eine positive GFP-Expression und DsRed-Expression von den Kontroll-Plasmiden in Zelllinien des Huhnes zeigen. Unsere Ergebnisse bestätigen diese Theorie über die korrekte Funktion der Kontroll-Plasmiden in menschlichen Tumorzelllinien. Die EGFP-Expression von pRGIIIc zeigt eine gute Transfektionseffizienz in HTB92 und HTB94. In diesem Fall wurde keine DsRed-Expression von pRGIIIc in diesen beiden STS-Zelllinien detektiert, die einen Vergleich mit der DsRed-Expression des Plasmides DsRed2-N1 ermöglicht. Die Ergebnisse der Transfektion in HTB94 zeigen auch eine positive Transfektionseffizienz der Kontroll-Plasmide (pEGFP-C1 und pDsRed) und eine Doppelexpression von pRGIIIc in dieser Zelllinie HTB94, die mit den gelb-leuchtenden Zellen dargestellt ist. Diese sind mit roten Pfeilen in der Abbildung 2.1.1.2. angegeben. Bisher wurde pRGIIIc in der Studie von Oltean (Oltean, 2008) nur in Adenokarzinom-Zelllinien (AT3 und DT) der Prostata der Ratte angewendet und in folgenden Labor-Ratten „Copenhagen 2331 rats“ implantiert. Die zwei Zelllinien AT3 (mesenchymal-like) und DT (epithelial-like) wurden von Oltean für die spezifische Detektion der Inklusion oder Skipping des Exons IIIc des FGFR2 der Ratte verwendet, welche sich spezifisch durch die EGFP- und DsRed-Expression in den jeweiligen Zellen auszeichnet. Die Ergebnisse von (Oltean, 2008) zeigen das korrekte Expressionsmuster der normalen Funktion von pRGIIIc in AT3- und DT-Zelllinie. Er zeigt in seiner Studie die EGFP-Expression von pRGIIIc in AT3-Zellen als positive Inklusion des Exons IIIc des FGFR2 der Ratte, wobei es dem mesenchymalen Phänotyp dieser Zelllinie AT3 entspricht. Bei der Zelllinie DT zeigt Oltean die positive DsRed-Expression als Skipping des Exons IIIc von pRGIIIc, was dem epithelialen Phänotyp dieser Zellen entspricht. Er erwähnt in seiner Studie eine mögliche epithelial-Plastizität in der Zellkultur DT, welche eine geringe Inklusion des Exons IIIc in DT-Zellen zeigt, was EGFP-Expression in wenigen DT-Zellen ergibt. In Zusammenhang mit der epithelialen Plastizität wurde die Zelllinie HTB82 (epithelial-like) zur Erwartung eines ähnlichen Ergebnisses bezogen auf die EGFP- und DsRed-Expression von pRGIIIc ausgewählt. Ein weiterer Grund für die Auswahl der Zelllinie HTB82 war die mittlere starke Expression der Spleißvariante IIIc des FGFR2. Da pRGIIIc die Spleißvariante IIIc des FGFR2 der Ratte exprimiert und in Zusammenhang mit der mittleren starken Expression der Spleißvariante IIIc

des FGFR2 von HTB82, wurde es vermutet, dass pRGIIIc eine ähnliche Expressionstärke wie die der Zelllinie HTB82 haben könnte.

Die Serie von Fotos der mikroskopischen Analyse der Transfektion in HTB82 zeigt die Auswirkung von G418 während den ersten 35 Tagen zur Selektion von Klonen in der Abbildung 2.2.1.2. Die ersten Tage nach der Transfektion kann man eine positive EGFP-Expression sehen und keine DsRed-Expression erkennen. Ab dem Tag 7 bis zum Tag 35 der Abbildung 2.2.1.2. ist eine Veränderung des EGFP- und DsRed-Expressionsmusters von pRGIIIc zu beobachten. Es scheint, als ob die Zelllinie HTB82 eine Abnahme der EGFP-Expressionsstärke und eine Erhöhung der DsRed-Expressionsstärke von pRGIIIc induziert hätte, so dass die transfektierten Zellen gleichmäßig EGFP und DsRed exprimiert würden. Das Ziel dieses Transfektionsversuches ist, eine starke DsRed-Expression zu erreichen, ähnlich dem Ergebnis von Oltean (Oltean, 2008) in den DT-Zellen, in dem die Mehrheit der Zellen DsRed und nur sehr wenigen Zellen EGFP exprimieren. Aber ein solches DsRed-Expressionsmuster ist in der STS-Zelllinie HTB82 nicht zu sehen. Warum sich pRGIIIc in HTB91 anders als in DT-Zellen von Oltean verhalten, auch wenn diese Zelllinie HTB82 epithelial-like ist, kann derzeit nicht erklärt werden.

Die Abbildung 2.2.1.3. zeigt eine analoge Fotoserie der Transfektion von pRGIIIc in HTB91 von erstem Tag bis zum Tag 30. Grund für die Auswahl der STS-Zelllinie HTB91 war die schwache Expressionsstärke der Spleißvariante IIIc des FGFR2. In Bezug auf die schwache Expressionsstärke der Variante IIIc des FGFR2 von HTB91 und in Zusammenhang mit dem Skipping des Exons IIIc von pRGIIIc sollten Zellen resultieren, die viel mehr DsRed exprimieren. Das Ziel dieses Transfektionsversuches war, ein starkes Expressionsmuster von DsRed aus pRGIIIc zu induzieren. Die Fotos der Abbildung 2.2.1.3 zeigen eher eine moderate Expression von EGFP und eine sehr schwache Expression von DsRed. Die Ergebnisse unterscheiden sich demnach deutlich von den Erwartungen. Hier ist es notwendig, zu fragen, wie es zu diesem Expressionsmuster in HTB91 gekommen ist? Zuerst muss erwähnt werden dass die zwei untersuchten STS-Zelllinien aus Weichteilsarkomen stammen und die Morphologie der Zelllinie HTB91 fibroblastoid ist. In der Studie von Oltean wurde keine STS-Zelllinie verwendet, sondern nur zwei Tumor-Zelllinien der Prostata der Ratte mit jeweils mesenchymaler und epithelialer Morphologie. Das ist vielleicht einer der Gründe für die

verschiedenen Expressionsmuster von EGFP und DsRed in beiden STS-Zelllinien. Es wurden auch gelb-leuchtende Zellen detektiert, was aus Doppelexpression von EGFP und DsRed von pRGIIIc resultiert.

Die Abbildung 2.2.1.4. zeigt die Transfektion von pRGIIIc in der Zelllinie SW480 am Tag 14. SW480 ist kein Weichteilsarkom sondern ein Kolonrektalkarzinom. Diese Zelllinie wurde aufgrund ihrer epithelialoide Morphologie ausgewählt mit der Erwartung, dass sie ähnliche Ergebnisse in Bezug auf das DsRed-Expressionsmuster von pRGIIIc in der Zelllinie DT von Oltean liefern würde. Da ein Ziel dieser Arbeit war, die epithelial-mesenchymal-Transition in STS-Zelllinien mittels pRGIIIc oder neuer etablierten Reportersysteme zu untersuchen. Die Zellen befinden sich hier in Selektionsphase von Klonen unter der Auswirkung von G418. Bei der Untersuchung wurde keine gelb-leuchtende Zelle detektiert. Obwohl die Expressionsstärke der Spleißvariante IIIc des FGFR2 unbekannt war, zeigt das Ergebnis eine stärkere EGFP-Expression in den meisten Zellen und keine DsRed-Expression in den Fotos der Abbildung 2.2.1.4.

Um eine Erklärung der Expressionsmuster von EGFP und DsRed in den drei Zelllinien zu finden, wurden pRGIIIc auf mRNA- und Protein-Ebene analysiert. In der Abbildung 2.3.1.1. sind die Western Blot-Ergebnisse zur Detektion des GFP-Proteins zu sehen. In diesem Versuch wurde das GFP-Protein zweier Kontroll-Plasmide indentifiziert. Die Information über die Größe des EGFP-Proteins wurde unter dem Link: <http://www.antibodies-online.com/news/2/649/New+antibody+Enhanced+Green+Fluorescent+Protein+EGFP+antibody/> gefunden. EGFP-Protein sollte eine Größe von 29 kDa haben. In diesem Versuch könnte das EGFP-Protein von pRGIIIc in der Zelllinie HTB82 nicht detektiert werden. In dieser Arbeit ist das EGFP-Produkt beider Kontroll-Plasmide pEGFP-C1 und -F mit der Position des 30kDa Markers einbezogen.

Die Abbildung 2.3.2.1. zeigt das EGFP-Proteinprodukt von 29 kDa der Kontroll-Plasmide pEGFP-C1 und -F. In diesem Versuch wurde auch keine EGFP-Proteinprodukt von pRGIIIc nachgewiesen. Deswegen wurde die Proteinkonzentration um die doppelte Menge (80 µg/µl) aus HTB91 aufgetragen. Die Ergebnisse der Erhöhung der Proteinkonzentration sind in der Abbildung 2.3.2.2. zu finden. In diesem Fall wurden noch dazu zwei einzelne Klone und ein Misch-Klon von pRGIIIc untersucht, um die geringe EGFP-Expression und EGFP-

Proteinproduktion von pRGIIIc in HTB91 im Western Blot zu untermauern. In der Arbeit von Oltean wurde keine Western-Blot-Analyse in Bezug auf die Größe des EGFP-Proteins von pRGIIIc durchgeführt. Es wurde nach folgender Umrechnung [30.000 Da = ~ 794 bps DNA] das Molekulargewicht in kDa des EGFP-Proteinprodukts aus pRGIIIc abgeschätzt. Laut dem Programm Clon_Manager_Version 9 soll die Inklusion des Exons IIIc zusammen mit dem DsRed-EGFP-fusionierten Protein eine Produktlänge von 1599 bps haben. Basiert auf die Umrechnung soll das DsRed-EGFP-fusionierte Produkt 60.25 kDa betragen. In diesem Versuch könnte das EGFP-Protein von pRGIIIc nachgewiesen werden und somit die Inklusion des Exons IIIc des FGFR2 in der Zelllinie HTB91. Ein ähnlicher Versuch wurde mit der Zelllinie SW480 durchgeführt. Dabei wurden zwei einzelne Klone, ein Misch-Klon von pRGIIIc und das Kontroll-Plasmid pEGFP-C1 analysiert. Hier könnte das EGFP-Protein nur im Misch-Klon nachgewiesen werden. Das bestätigt die geringe Produktion an EGFP-Protein in dieser Zelllinie. Es war eine große Band von den einzelnen und Misch-Klonen bezogen auf EGFP-Protein zu erwarten.

Auf mRNA-Ebene wurden zuerst Primer für die Detektion des Exons IIIc von pRGIIIc generiert. Nach der Position der Primer in pRGIIIc wurden verschiedene Kombinationen hergestellt, welche es ermöglichen, mittels RT-PCR und PCR die Inklusion des Exons IIIc in den Transkripten zu identifizieren. Die Positionen der angewendeten Primer sind in Anhang 8 zu finden. Der Vorversuch der Abbildung 2.4.1. wurde mit dem Ziel durchgeführt, eine optimale Temperatur für die korrekte Funktion der generierten Primer zu finden. Das Ergebnis zeigt eine positive Funktion der Primer-Kombination Vic_rev_2 und Vic_for_2 ab einem Temperaturbereich von 53 °C. Hier wurde das DNA-Plasmid von pRGIIIc verwendet. Laut ClonManager Version 9 soll das amplifizierte Fragment eine Länge von 1601 bps haben und dies entspricht dem amplifizierten PCR-Produkt von 1601 bps der Abbildung 2.4.1. Auf Basis dieses Versuchs wurde für weitere Versuche eine Temperatur von 54 °C für die PCR-Versuche und von 60°C für die RT-PCR-Versuche eingesetzt. Die Abbildung 2.4.2.1. zeigt das Ergebnis der Anwendung der Primer-Kombination GFP6 und CFP zur Detektion von EGFP in pRGIIIc. Laut der Information des Programms Clon_Manager_Version 9 (CM_V9) sitzen die Primer GFP6 und CFP in der richtigen Stelle der Kontroll-Plasmide pEGFP-C1 und -F zur Detektion der EGFP-Sequenz, die eine Produktlänge von 434 bps haben soll. Hingegen zeigt das Programm andere Positionen in pRGIIIc. Das Programm (CM_V9) zeigt die Lokalisierung des

Primers CFP (forward) in dem Bereich der DsRed-Sequenz. Das ist der Grund, warum das Produkt fast doppelt so lang (797 bp) als das normale EGFP-Produkt (434 bp) der EGFP-Kontroll-Plasmide gebildet wurde. DsRed und EGFP besitzen keine Sequenz-Homologie. Der Grund, warum CFP-forward-Primer an DsRed bindet, ist wahrscheinlich wegen einer starken Homologie zwischen Primer und DsRed-Sequenz. CFP_forward bindet an der Position 2978 – 2997 des Plasmides pRGIIIc. Also dieser Versuch wurde positiv erfüllt. Damit wurde die Funktionalität dieser Primer-Kombination (GFP6 und CFP) für die Detektion des EGFP-Transkriptes bestimmt, was auch als Identifizierung der Inklusion des Exons IIIc von pRGIIIc dient.

In der Studie von Oltean sind die PCR-Produkte von pRGIIIc in den Zelllinien AT3 und DT zu sehen. Er hat seine Ergebnisse der RT-PCR-Analyse als Inklusion des Exons IIIc mit einer RT-PCR-Produktlänge von 446 bp und als Skipping des Exons IIIc mit einer Produktlänge von 301 bp interpretiert.

Die drei möglichen Primer-Kombinationen für die Detektion von pRGIIIc in der genomischen DNA von HTB91 sind in der Abbildung 2.4.3.1. zu finden. Die beste Kombination besteht aus den Primer T7 und Vic_rev-2. Nach dem Programm CM_V9 sind drei mögliche Produkte in Bezug auf die Inklusion des Exons IIIc durch die Anwendung dieser zwei Primer zu generieren. Die Produktlänge wäre: 1) 212 bp; 2) 367 bps und 3) 1658 bps. Diese Information ist auch im Teil Material und Methoden „Tab. 1.3.3.“ zu finden. Das Ergebnis der Abb. 2.4.3.1. zeigt eine schlechte Funktion von zwei Primer-Kombinationen (M13/Vic_rev_2 und Vic_for_2/Vic_rev_2). Bezogen auf T7/Vic_rev_2-Kombination wurden nur zwei Produkte identifiziert, die zu den PCR-Fragmenten der Länge 212 und 367 passen. Fast das gleiche Muster von RT-PCR-Produkten ist in der Abbildung 2.4.4.1. zu sehen. Die Identifikation von zwei Produkten auf dem PAGE-Gel ist deutlich zu erkennen. Damit wurde festgestellt, dass die Primer-kombination T7/Vic_rev_2 die Möglichkeit bietet, zwei RT-PCR-Produkte verschiedener Länge (212 und 367 bps) zu identifizieren und somit die Inklusion und Skipping des Exons IIIc von pRGIIIc zu bestätigen. Das dritte Amplifikationsprodukt mit einer Größe von über 1000 bps in den Abbildungen 2.4.3.1. und 2.4.4.1. stellt wahrscheinlich die prä-RNA dar, die jene RNA noch nicht gespleißt wurde.

In der Abbildung 2.5.1 ist die graphische Darstellung der Expressionsstärke von pRGIIIc in nur drei Zelllinien (HTB91, MBSa und SW480) zu sehen. Hierbei könnte keine Expression von pRGIIIc in der Zelllinie HTB82 analysiert werden. Unser Ergebnis entspricht dem von Oltean, in dem die Expression von pRGIIIc in unseren drei STS-Zelllinien sehr gering ist. Und dies stimmt mit der Tatsache überein, dass die Spleißvariante IIIc in mesenchymalen Zellen oder Geweben produziert wird. Obwohl die EGFP- und DsRed-Expressionsmuster von pRGIIIc in den STS-Zelllinien und in SW480 verschieden ausgesehen haben als die von Oltean, könnte die Inklusion des Exons IIIc und den EGFP-Transkript auf RNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden. Epithelial-Mesenchymal-Transition in den STS- und SW480-Zellen könnte erklären, warum von pRGIIIc in diesen Zelllinien sowohl EGFP als auch DsRed exprimiert werden.

Im Zusammenhang mit dem RT-PCR-Ergebnis von Oltean ist auch eine geringe Expression des Plasmids in Bezug auf die Inklusion des Exons IIIc in der epithelialen Zellen DT zu sehen, im Gegenteil zu der Überexpression von pRGIIIc in der Zelllinie AT3 (mesenchymal). Seine Expressionsanalyse stimmt mit der Zelllinie DT als Definition eines epithelialen Phänotypes in der Plastizität überein. Er verwendete zwei Marker E-Cadherin (exprimiert in DT-Zellen) und Vimentin (undetektierte Expression in DT aber detektierbar in AT3-Zellen), um den epithelialen Phänotyp von DT zu bestätigen. EMT und MET wurden früher (Thiery, 2002; Thiery, 2006) beschrieben und spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, wenn die Zelle verschiedene Genexpressionsprogramme unterdrückt oder aktiviert, um zu den Zielorganen zu wandern und dort wieder stationär zu werden. Es gibt eine zunehmende Anzahl von Berichten, die zeigen, dass Zellen von Karzinomen oder metastatische Zellen in der Lage sind, die Programme EMT und MET zu reaktivieren, um dadurch den erfolgreichen Abschluss des Metastasierungsprogrammes zu erreichen (Chaffer, 2007). Dennoch bleibt Oltean skeptisch über die Existenz dieser Transitionen während der Tumor-Invasion und Metastasierung vor allem wegen des Mangels an Evidenzen in Vivo. Trotzdem er behauptet, dass die Zellen AT3 (mesenchymal) mit der MET-Plastizität während dem Tumorwachstum und Metastasierung in lebenden Tieren assoziiert ist. Er erwähnt, dass Analyse über die Plastizität von MET und EMT in Prostata Tumorzellen in Vivo und in Vitro durch die Verwendung von alternativ splicing Reporters einfacher wäre und diesen mesenchymal-epithelial-Phänotyp in lebenden Tieren leichter zu verfolgen wäre. Außerdem kann das IIIc-

spezifische Spleißen mit diesem Reporter System an einzelnen Zellen beobachtet werden. Mit diesem nicht invasiven Werkzeug zum Nachweis des Spleiß-Verhaltens sind die komplexen Regulationsmechanismen zum Beispiel innerhalb von genetisch identen Zellpopulationen wie in *in vitro* wachsenden Tumorzellen beobachtbar (Oltean, 2006; Oltean, 2008).

Bei der *in Silico* Analyse wurden das Programm Clon_Manager_Version 9 auch verwendet, um Ähnlichkeit oder Verschiedenheit zwischen der Sequenz des Exons IIIc des FGFR2 der Ratte in pRGIIIc und des Exons IIIc und IIIb des FGFR2 des Menschen zu finden. Das Ergebnis der Abbildung 3.1.1. zeigt keinen Unterschied zwischen der Sequenz Exon IIIc des FGFR2 der wildtyp-Ratte. Dabei wurde die komplette mRNA des FGFR2 runtergeladen, und mit der 145 bps Exon IIIc-Sequenz verglichen. Alle zum vergleichenden Sequenzen wurden unter diesem Link: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> runtergeladen. Bei dem Vergleich der Abbildung 3.1.2. wurden die gesamte mRNA des FGFR2 der Ratte, die gesamte Exon IIIc-Sequenz und die Region des Exons IIIc in pRGIIIc miteinander verglichen. Die IIIc-Sequenz von pRGIIIc und der FGFR-IIIc der Ratte unterscheiden sich durch zwei Basen. Hier wurden Modifikationen in der Sequenz (Exon IIIc) von pRGIIIc durchgeführt, die die Gruppe von Garcia-Blanco künstlich in den Reporter eingebaut wurden: die erste am Anfang, die zweite am Ende und eine dritte in der Mitte des Exons. Die erste Modifikation war eine Deletion und die zweite eine Insertion. Eine dritte Deletion wurde in der Mitte des Exons durchgeführt, um die Länge der Intron-Exon-Intron-Sequenz in pRGIIIc von 146 zu 145 bps zu reduzieren und dadurch den Reading-Frame des Reporterproteins durch das IIIc-Exons zu verschieben. Damit der Reporter funktioniert, muss es 2 Reading-Frames durch das IIIc-Exon geben, die kein Stop-Codon enthalten. Durch diese Mutationen haben die Forscher dies erreicht (Oltean, 2006).

Laut der Simulation der Amplifikation mit den generierten Primer im Lab. von Dr. Klaus Holzmann ist die Exon IIIc-Sequenz des Menschen 504 bps lang. Im Vergleich mit der Sequenz der Ratte ist die Sequenz des Menschen 359 bps länger. Die Exon IIIb-Sequenz des Menschen ist 417 bps lang und im Gegenteil zu der Sequenz der Ratte, die 167 bps lang ist. In der Abbildung 3.2.3. sind wenige Unterschiede in Bezug auf Basen zu sehen. Das Programm CM_V9 weist eine Homologie von 80% zwischen der gesamten mRNA des FGFR2 von Mensch und Ratte auf. Es muss erwähnt werden, dass es sich bei der Abbildung 3.2.3. um einen Vergleich über der Länge eines PCR-Produktes (Produkt FGFR2 II in Abb. 3.2.3. angegeben)

mit der Länge des Exons IIIb zeigt. Die Exons IIIc oder auch IIIb sind zwischen den Spezies sehr konserviert.

Im Zusammenhang damit war auch geplant, Exon-Sequenzen der Variante IIIb oder IIIc des Menschen aus pRGIIIc auszutauschen. Bisher wurden nur Exon-Sequenz des FGFR2 IIIb und IIIc von Tieren in pRGIIIc inseriert, aber keine Sequenz des Menschen. Bis heute läuft noch der Versuch über die Etablierung neuer Reportersysteme, die menschliche Sequenzen haben. Die In Silico Analyse zwischen Sequenzen FGFR2 und Varianten von Mensch und Hund wird in der Dissertation von Nicole Reichmann durchgeführt.

Die Funktionalität von pRGIIIc wurde in STS-Zelllinien des Menschen charakterisiert. Wir waren nicht zufrieden mit dem Ergebnis, und sind wir zu der Erklärung gekommen, dass pRGIIIc vielleicht am besten spezies-spezifisch arbeitet, so dass es besser die epitheliale Plastizität in den STS-Zelllinien darstellen kann. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die verwendete Zelllinie kein gutes Zellmodell für die Studie der EMT oder MET sind, da pRGIIIc für die Studie von alternativem Splicing in Tumorzellen der Prostata und für die epithelial-Plastizität spezifisch entwickelt wurde. Vielleicht durch einen Austausch von Sequenzen in pRGIIIc verhält sich anders das Plasmid in Bezug auf die Expression der Spleißvariante IIIc.

Meine ersten funktionellen Daten über pRGIIIc sind dennoch sehr vielversprechend. Eine Weiterentwicklung des Systems für den gleichzeitigen Nachweis des alternativen Spleißens von IIIb oder IIIc analog eines Maus-Modell Reporters (Takeuchi, A. 2010) mit dem Einbau der kompletten Region der IIIb und IIIc Exons samt Intros ist denkbar. Bei der Maus hat die gesamte Region eine Länge von 3-4 kpb.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- Adnane, J. et al. (1991). "BEK and FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers." J. Oncogene **6**(4): 659-663.
- Agnes, F., M. M. Toux, et al. (1997). "Genomic organization of the extracellular coding region of the human FGFR4 and FLT4 genes: evolution of the genes encoding receptor tyrosine kinases with immunoglobulin-like domains." J Mol Evol **45**(1): 43-49.
- Alberts, B. (2004). Essential cell biology. New York, NY, Garland Science Pub.
- Alberts, B. (2008). Molecular biology of the cell. New York, Garland Science.
- Antman, K. and Y. Chang (2000). "Kaposi's sarcoma." N Engl J Med **342**(14): 1027-1038.
- Armstrong, E., J. Partanen, et al. (1992). "Localization of the fibroblast growth factor receptor-4 gene to chromosome region 5q33-qter." Genes Chromosomes Cancer **4**(1): 94-98.
- Asplund, A., G. Ostergren-Lunden, et al. (2009). "Hypoxia increases macrophage motility, possibly by decreasing the heparan sulfate proteoglycan biosynthesis." J Leukoc Biol **86**(2): 381-388.
- Assenmacher, S., G. Voggenreiter, et al. (1999). "[Malignant bone tumors. Epidemiology, classification, diagnosis and multimodality treatment concepts]." Unfallchirurg **102**(9): 716-732.
- Baird, K., S. Davis, et al. (2005). "Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology." Cancer Res **65**(20): 9226-9235.
- Baralle, D. and M. Baralle (2005). "Splicing in action: assessing disease causing sequence changes." J Med Genet **42**(10): 737-748.
- Barash, Y., J. A. Calarco, et al. (2010). "Deciphering the splicing code." Nature **465**(7294): 53-59.
- Bartel, F., J. Schulz, et al. (2005). "Significance of HDMX-S (or MDM4) mRNA splice variant overexpression and HDMX gene amplification on primary soft tissue sarcoma prognosis." Int J Cancer **117**(3): 469-475.
- Beenken, A. and M. Mohammadi (2009). "The FGF family: biology, pathophysiology and therapy." Nat Rev Drug Discov **8**(3): 235-253.
- Berger, W., U. Setinek, et al. (2005). "Multidrug resistance markers P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, and lung resistance protein in non-small cell lung cancer: prognostic implications." J Cancer Res Clin Oncol **131**(6): 355-363.
- Black, D. L. (2003). "Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing." Annu Rev Biochem **72**: 291-336.
- Bonano, V. I., S. Oltean, et al. (2006). "Imaging the alternative silencing of FGFR2 exon IIIb in vivo." RNA **12**(12): 2073-2079.
- Bonano, V. I., S. Oltean, et al. (2007). "A protocol for imaging alternative splicing regulation in vivo using fluorescence reporters in transgenic mice." Nat Protoc **2**(9): 2166-2181.
- Borden, E. C., L. H. Baker, et al. (2003). "Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science." Clin Cancer Res **9**(6): 1941-1956.
- Boudvillain, M. and A. M. Pyle (1998). "Defining functional groups, core structural features and inter-domain tertiary contacts essential for group II intron self-splicing: a NAIM analysis." EMBO J **17**(23): 7091-7104.
- Brennan, M. F. (2008). "Staging of soft tissue sarcoma: what is new?" Ann Surg Oncol **15**(10): 2643.

- Burke, D., D. Wilkes, et al. (1998). "Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes." Trends Biochem Sci **23**(2): 59-62.
- Byron, S. A., M. G. Gartside, et al. (2008). "Inhibition of activated fibroblast growth factor receptor 2 in endometrial cancer cells induces cell death despite PTEN abrogation." Cancer Res **68**(17): 6902-6907.
- Caceres, J. F. and A. R. Kornblihtt (2002). "Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease." Trends Genet **18**(4): 186-193.
- Cooper, T. A. (2005). "Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements." Methods **37**(4): 331-340.
- Cooper, T. A. and C. P. Ordahl (1985). "A single cardiac troponin T gene generates embryonic and adult isoforms via developmentally regulated alternate splicing." J Biol Chem **260**(20): 11140-11148.
- Cottoni, F., S. Ceccarelli, et al. (2009). "Overexpression of the fibroblast growth factor receptor 2-IIIc in Kaposi's sarcoma." J Dermatol Sci **53**(1): 65-68.
- Chaffer, C. L., E. W. Thompson, et al. (2007). "Mesenchymal to epithelial transition in development and disease." Cells Tissues Organs **185**(1-3): 7-19.
- Chen, H., J. Ma, et al. (2007). "A molecular brake in the kinase hinge region regulates the activity of receptor tyrosine kinases." Mol Cell **27**(5): 717-730.
- Chen, M. and J. L. Manley (2009). "Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(11): 741-754.
- Chesi, M., E. Nardini, et al. (1997). "Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3." Nat Genet **16**(3): 260-264.
- Clifford, C. (1993). "Diet as risk and therapy for cancer." Med Clin North Am **77**(4): 725-744.
- da Costa Andrade, V. C., O. Parise, Jr., et al. (2007). "The fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) Arg388 allele correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma." Exp Mol Pathol **82**(1): 53-57.
- Davies, H. et al. (2005). "Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer." Cancer Res **65**(17): 759-765.
- Demetri, G. D. (2002). "Targeting the molecular pathophysiology of gastrointestinal stromal tumors with imatinib. Mechanisms, successes, and challenges to rational drug development." Hematol Oncol Clin North Am **16**(5): 1115-1124.
- Dewhirst, M. W. (2003). "Mechanisms underlying hypoxia development in tumors." Adv Exp Med Biol **510**: 51-56
- Dionne, C. A., W. S. Modi, et al. (1992). "BEK, a receptor for multiple members of the fibroblast growth factor (FGF) family, maps to human chromosome 10q25.3----q26." Cytogenet Cell Genet **60**(1): 34-36.
- Dippold, W. (1993). "[Endogenous and exogenous factors in the tumor development and cell differentiation in gastrointestinal tumors]." Z Gastroenterol **31**(1): 24-27.
- Dode, C., J. Leveilliers, et al. (2003). "Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome." Nat Genet **33**(4): 463-465.
- Dode, C., L. Teixeira, et al. (2006). "Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2." PLoS Genet **2**(10): e175.

- Dreyfuss, G., V. N. Kim, et al. (2002). "Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(3): 195-205.
- Dutt, A., H. B. Salvesen, et al. (2008). "Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(25): 8713-8717.
- Easton, D.F. et al. (2007). "Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci." Nature **447**(7148): 1087-1093.
- Eswarakumar, V. P., I. Lax, et al. (2005). "Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors." Cytokine Growth Factor Rev **16**(2): 139-149.
- Fajardo-Gutierrez, A. (1998). "[Risk factors for the development of germ cell tumors in children]." Gac Med Mex **134**(3): 273-281.
- Faustino, N. A. and T. A. Cooper (2003). "Pre-mRNA splicing and human disease." Genes Dev **17**(4): 419-437.
- Feldman, A. L., H. Pak, et al. (2001). "Serum endostatin levels are elevated in patients with soft tissue sarcoma." Cancer **91**(8): 1525-1529.
- Francis, P., H. M. Namlos, et al. (2007). "Diagnostic and prognostic gene expression signatures in 177 soft tissue sarcomas: hypoxia-induced transcription profile signifies metastatic potential." BMC Genomics **8**: 73.
- Freyschmidt, J. (2003). Knochtumoren: Klinik Radiologie und Pathologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Gadner, H. (2006). Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Gartside, M.G. et al. (2009). "Loss-of-function fibroblast factor receptor-2 mutations in melanoma." Mol Cancer Res **7**(1): 41-54.
- Ghigna, C., S. Giordano, et al. (2005). "Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene." Mol Cell **20**(6): 881-890.
- Gilbert, S. F. (2006). Developmental biology. Sunderland, Mass., Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Gilbert, S. F. (2010). Developmental biology. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Goetz, R., A. Beenken, et al. (2007). "Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members." Mol Cell Biol **27**(9): 3417-3428.
- Goldstein, M., I. Meller, et al. (2007). "FGFR1 over-expression in primary rhabdomyosarcoma tumors is associated with hypomethylation of a 5' CpG island and abnormal expression of the AKT1, NOG, and BMP4 genes." Genes Chromosomes Cancer **46**(11): 1028-1038.
- Goriely, A., R. M. Hansen, et al. (2009). "Activating mutations in FGFR3 and HRAS reveal a shared genetic origin for congenital disorders and testicular tumors." Nat Genet **41**(11): 1247-1252.
- Graeven, U., N. Andre, et al. (1999). "Serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with soft-tissue sarcoma." J Cancer Res Clin Oncol **125**(10): 577-581.
- Grand, E. K., A. J. Chase, et al. (2004). "Targeting FGFR3 in multiple myeloma: inhibition of t(4;14)-positive cells by SU5402 and PD173074." Leukemia **18**(5): 962-966.
- Greer, C. L., C. L. Peebles, et al. (1983). "Mechanism of action of a yeast RNA ligase in tRNA splicing." Cell **32**(2): 537-546.
- Grose, R. and C. Dickson (2005). "Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis." Cytokine Growth Factor Rev **16**(2): 179-186.

- Grose, R., V. Fantl, et al. (2007). "The role of fibroblast growth factor receptor 2b in skin homeostasis and cancer development." *EMBO J* **26**(5): 1268-1278.
- Groth, C. and M. Lardelli (2002). "The structure and function of vertebrate fibroblast growth factor receptor 1." *Int J Dev Biol* **46**(4): 393-400.
- Guenther, R., V. Krenn, et al. (2005). "Giant cell tumors of the bone: molecular profiling and expression analysis of Ephrin A1 receptor, Claudin 7, CD52, FGFR3 and AMFR." *Pathol Res Pract* **201**(10): 649-663.
- Gutjahr, P. (2004). *Krebs bei Kindern und Jugendlichen: Klinik und Praxis der Pädiatrischen Onkologie*. Deutscher Ärzte-Verlag GmbH.
- Haro-Garcia. L. (1998). "[Risk factors for the development of germ cell tumors in children]." *Gac Med Mex* **134**(6): 770-771.
- Helman, L. J. and P. Meltzer (2003). "Mechanisms of sarcoma development." *Nat Rev Cancer* **3**(9): 685-694.
- Hennekam, R. C. (2003). "Costello syndrome: an overview." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **117C**(1): 42-48.
- Hirotsu, M., T. Setoguchi, et al. (2009). "Tumour formation by single fibroblast growth factor receptor 3-positive rhabdomyosarcoma-initiating cells." *Br J Cancer* **101**(12): 2030-2037.
- Hunter, D. J., P. Kraft, et al. (2007). "A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer." *Nat Genet* **39**(7): 870-874.
- Huynh, H., V. C. Ngo, et al. (2008). "Brivanib alaninate, a dual inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases, induces growth inhibition in mouse models of human hepatocellular carcinoma." *Clin Cancer Res* **14**(19): 6146-6153.
- Ishibe, T., T. Nakayama, et al. (2005). "Disruption of fibroblast growth factor signal pathway inhibits the growth of synovial sarcomas: potential application of signal inhibitors to molecular target therapy." *Clin Cancer Res* **11**(7): 2702-2712.
- Itoh, N., T. Terachi, et al. (1990). "The complete amino acid sequence of the shorter form of human basic fibroblast growth factor receptor deduced from its cDNA." *Biochem Biophys Res Commun* **169**(2): 680-685.
- Jabs, E.W. et al. (1994). "Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2." *Nat Genet* **8**(3): 275-279.
- Jang, T.J. et al. (2001). "p16(INK4a) Promoter hypermethylation of non-tumorous tissue adjacent to gastric cancer is correlated with glandular atrophy and chronic inflammation." *Int J Cancer* **93**(5): 629-634.
- Jin, C., F. Wang, et al. (2004). "Directionally specific paracrine communication mediated by epithelial FGF9 to stromal FGFR3 in two-compartment premalignant prostate tumors." *Cancer Res* **64**(13): 4555-4562.
- Johnson, D. E. and L. T. Williams (1993). "Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family." *Adv Cancer Res* **60**: 1-41.
- Kaatsch, P. (2010). "Epidemiology of childhood cancer." *Cancer treatment reviews* **36**(4): 277-285.

- Kan, S. H., N. Elanko, et al. (2002). "Genomic screening of fibroblast growth-factor receptor 2 reveals a wide spectrum of mutations in patients with syndromic craniosynostosis." Am J Hum Genet **70**(2): 472-486.
- Katoh, M. (2008). "Cancer genomics and genetics of FGFR2 (Review)." Int J Oncol **33**(2): 233-237.
- Katoh, M. (2009). "FGFR2 abnormalities underlie a spectrum of bone, skin, and cancer pathologies." J Invest Dermatol **129**(8): 1861-1867.
- Klingebliel, T. (1998). "Treatment of children with relapsed soft tissue sarcoma: report of the German CESS/CWSS REZ 91 trial." Med Pediatr Oncol **30**(5): 269 - 275.
- Klingebliel, T. (2008). "Treatment of children with metastatic soft tissue sarcoma with oral maintenance compared to high dose chemotherapy: report of the HD CWS-96 trial." Pediatr Blood Cancer **50**(4): 739 - 745.
- Knights, V. and S. J. Cook (2010). "De-regulated FGF receptors as therapeutic targets in cancer." Pharmacol Ther **125**(1): 105-117.
- Koscielniak, E. (1999). "Results of treatment for soft tissue sarcoma in childhood and adolescence: a final report of the German Cooperative Soft Tissue Sarcoma Study CWS-86." J Clin Oncol **17**(12): 3706-3719.
- Kratz, C. P., D. Steinemann, et al. (2007). "Uniparental disomy at chromosome 11p15.5 followed by HRAS mutations in embryonal rhabdomyosarcoma: lessons from Costello syndrome." Hum Mol Genet **16**(4): 374-379.
- Kubista, B., F. Klinglmueller, et al. (2011). "Microarray analysis identifies distinct gene expression profiles associated with histological subtype in human osteosarcoma." Int Orthop **35**(3): 401-411.
- Lee, K. M., L. Santos-Ruiz, et al. (2010). "A single-point mutation in FGFR2 affects cell cycle and Tgfbeta signalling in osteoblasts." Biochim Biophys Acta **1802**(3): 347-355.
- Liu, Z., N. Neiss, et al. (2007). "Identification of a fibroblast growth factor receptor 1 splice variant that inhibits pancreatic cancer cell growth." Cancer Res **67**(6): 2712-2719.
- Logie, A., C. Dunois-Larde, et al. (2005). "Activating mutations of the tyrosine kinase receptor FGFR3 are associated with benign skin tumors in mice and humans." Hum Mol Genet **14**(9): 1153-1160.
- Long, J. C. and J. F. Caceres (2009). "The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression." Biochem J **417**(1): 15-27.
- Lott, S., M. Wang, et al. (2009). "FGFR3 and TP53 mutation analysis in inverted urothelial papilloma: incidence and etiological considerations." Mod Pathol **22**(5): 627-632.
- Lubieniecka, J. M. and T. O. Nielsen (2005). "cDNA microarray-based translational research in soft tissue sarcoma." J Surg Oncol **92**(4): 267-271.
- Mason, I. (2007). "Initiation to end point: the multiple roles of fibroblast growth factors in neural development." Nat Rev Neurosci **8**(8): 583-596.
- Mendoza, S., H. David, et al. (2005). "Allelic loss at 10q26 in osteosarcoma in the region of the BUB3 and FGFR2 genes." Cancer Genet Cytogenet **158**(2): 142-147.
- Mohammadi, M., S. K. Olsen, et al. (2005). "Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation." Cytokine Growth Factor Rev **16**(2): 107-137.

- Morimoto, Y., T. Ozaki, et al. (2003). "Single nucleotide polymorphism in fibroblast growth factor receptor 4 at codon 388 is associated with prognosis in high-grade soft tissue sarcoma." Cancer **98**(10): 2245-2250.
- Nakatani, H. et al. (1990). "Isolation of an amplified DNA sequence in stomach cancer." Jpn J Cancer Res **81**(8): 707-710.
- Nebe-von-Caron, G., P. J. Stephens, et al. (2000). "Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting." J Microbiol Methods **42**(1): 97-114.
- Olsen, S. K., M. Garbi, et al. (2003). "Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors share structural but not functional homology with FGFs." J Biol Chem **278**(36): 34226-34236.
- Olsen, S. K., O. A. Ibrahim, et al. (2004). "Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(4): 935-940.
- Oltean, S., P. G. Febbo, et al. (2008). "Dunning rat prostate adenocarcinomas and alternative splicing reporters: powerful tools to study epithelial plasticity in prostate tumors in vivo." Clin Exp Metastasis **25**(6): 611-619.
- Oltean, S., B. S. Sorg, et al. (2006). "Alternative inclusion of fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIc in Dunning prostate tumors reveals unexpected epithelial mesenchymal plasticity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(38): 14116-14121.
- Orengo, J. P., D. Bundman, et al. (2006). "A bichromatic fluorescent reporter for cell-based screens of alternative splicing." Nucleic Acids Res **34**(22): e148.
- Ornitz, D. M. and N. Itoh (2001). "Fibroblast growth factors." Genome Biol **2**(3): REVIEWS3005.
- Ornitz, D. M., J. Xu, et al. (1996). "Receptor specificity of the fibroblast growth factor family." J Biol Chem **271**(25): 15292-15297.
- Orr-Urtreger, A., M. T. Bedford, et al. (1993). "Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2)." Dev Biol **158**(2): 475-486.
- Park, C.O. et al. (2008). "Increased expression of CC chemokine ligand 18 in extrinsic atopic dermatitis patients." Exp Dermatol **17**(1): 24-29.
- Patel, A. A. and J. A. Steitz (2003). "Splicing double: insights from the second spliceosome." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(12): 960-970.
- Patnaik, M. M., N. Gangat, et al. (2010). "Chromosome 8p11.2 translocations: prevalence, FISH analysis for FGFR1 and MYST3, and clinicopathologic correlates in a consecutive cohort of 13 cases from a single institution." Am J Hematol **85**(4): 238-242.
- Paznekas, W.A. et al. (1998). "Genetic heterogeneity of Saethre-Chotzen syndrome, due to TWIST and FGFR mutations." Am J Hum Genet **62**(6): 1370-1380.
- Perez-Castro, A. V., J. Wilson, et al. (1997). "Genomic organization of the human fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) gene and comparative sequence analysis with the mouse Fgfr3 gene." Genomics **41**(1): 10-16.
- Pfeifer, B. (2006). Onkologie integrativ: Konventionelle und komplementäre Therapie. Elsevier Urban & Fischer Verlag
- Pirastu, R., M. Baccini, et al. (2003). "[Epidemiologic study of workers exposed to vinyl chloride in Porto Marghera: mortality update]." Epidemiol Prev **27**(3): 161-172.

- Pitteloud, N., J. S. Acierno, Jr., et al. (2005). "Reversible kallmann syndrome, delayed puberty, and isolated anosmia occurring in a single family with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(3): 1317-1322.
- Plotnikov, A. N., S. R. Hubbard, et al. (2000). "Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity." *Cell* **101**(4): 413-424.
- Pollock, P. M., M. G. Gartside, et al. (2007). "Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes." *Oncogene* **26**(50): 7158-7162.
- Przylepa, K.A. et al. (1996). "Fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome." *Nat Genet* **13**(4): 492-494.
- Ratisoontorn, C., G. F. Fan, et al. (2003). "Activating (P253R, C278F) and dominant negative mutations of FGFR2: differential effects on calvarial bone cell proliferation, differentiation, and mineralization." *Connect Tissue Res* **44 Suppl 1**: 292-297.
- Reardon, W. et al. (1994). "Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crozon syndrome." *Nat Genet* **8**(1): 98-103.
- Rebscher, N., C. Deichmann, et al. (2009). "Conserved intron positions in FGFR genes reflect the modular structure of FGFR and reveal stepwise addition of domains to an already complex ancestral FGFR." *Dev Genes Evol* **219**(9-10): 455-468.
- Rechl, H., K. Wortler, et al. (2006). "[Soft tissue sarcoma--epidemiology, diagnosis and treatment]." *MMW Fortschr Med* **148**(17): 26, 28-30.
- Renart, J. and I. V. Sandoval (1984). "Western blots." *Methods Enzymol* **104**: 455-460.
- Riboli, E. (2003). "Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk." *Am J Clin Nutr* **78**(3 Suppl): 559S-569S.
- Robertson, S. C., A. N. Meyer, et al. (1998). "Activating mutations in the extracellular domain of the fibroblast growth factor receptor 2 function by disruption of the disulfide bond in the third immunoglobulin-like domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(8): 4567-4572.
- Romani, M., G. P. Tonini, et al. (2003). "Biological and clinical role of p73 in neuroblastoma." *Cancer Lett* **197**(1-2): 111-117.
- Rutland, P. et al. (1995). "Identical mutations in the FGFR2 gene cause both Pfeiffer and Crozon syndrome phenotypes." *Nat Genet* **9**(2): 173-176.
- Rübben, H. (2009). *Uroonkologie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Rymond, B. (2007). "Targeting the spliceosome." *Nat Chem Biol* **3**(9): 533-535.
- Rytwinski, K. (2000). "Aneuploidy and histopathological classification, according to the Musculoskeletal Tumor Society and WHO, of osteosarcoma in children and adolescents." *Medycyna wieku rozwojowego* **4**(4): 373-382.
- Schajowicz, F. (1995). "The World Health Organization's histologic classification of bone tumors. A commentary on the second edition." *J Cancer* **75**(5): 1208-1214.
- Schartl, A. (1997). "Analysis of genetic factors and molecular mechanisms in the development of hereditary and carcinogen-induced tumors of Xiphophorus." *Recent Results Cancer Res* **143**: 225-235.
- Schlessinger, J., A. N. Plotnikov, et al. (2000). "Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization." *Mol Cell* **6**(3): 743-750.

- Schuz, J. (2002). "Epidemiology of pediatric tumors of the central nervous system." Exp. Rev. of neurotherapeutics **2**(4): 469-479.
- Scotet, E. and E. Houssaint (1995). "The choice between alternative IIIb and IIIc exons of the FGFR-3 gene is not strictly tissue-specific." Biochim Biophys Acta **1264**(2): 238-242.
- Seitzer, N., T. Mayr, et al. (2010). "A single nucleotide change in the mouse genome accelerates breast cancer progression." Cancer Res **70**(2): 802-812.
- Shankar, V. N., V. Ajila, et al. (2010). "Osteoglyphonic dysplasia: a case report." J Oral Sci **52**(1): 167-171.
- Siewert, J.R. (2010). Praxis der Viszeralchirurgie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH
- Skubitz, K. M. and D. R. D'Adamo (2007). "Sarcoma." Mayo Clin Proc **82**(11): 1409-1432.
- Sonvilla, G., S. Allerstorfer, et al. (2010). "Fibroblast growth factor receptor 3-IIIc mediates colorectal cancer growth and migration." Br J Cancer **102**(7): 1145-1156.
- Sonvilla, G., S. Allerstorfer, et al. (2008). "FGF18 in colorectal tumour cells: autocrine and paracrine effects." Carcinogenesis **29**(1): 15-24.
- Speer, C.P. (2005). Pädiatrie. Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Steinhoff, H.A. (2009). "In vitro expression of fibroblast growth factor receptors in soft tissue sarcoma." Diploma thesis. pp84. Medical University of Vienna.
- Stephenson, E.J. et al. (2005). "Functional abnormalities of heparan sulfate in mucopolysaccharidosis-I are associated with defective biologic activity of FGF-2 on human multipotent progenitor cells." Blood **106**(6): 1956-1964.
- Su, N., Q. Sun, et al. (2010). "Gain-of-function mutation in FGFR3 in mice leads to decreased bone mass by affecting both osteoblastogenesis and osteoclastogenesis." Hum Mol Genet **19**(7): 1199-1210.
- Su, N., J. Yang, et al. (2008). "Gain-of-function mutation of FGFR3 results in impaired fracture healing due to inhibition of chondrocyte differentiation." Biochem Biophys Res Commun **376**(3): 454-459.
- Takeuchi, A., Hosokawa, M., Nojima, T. and Hagiwara, M. (2010). "Splicing reporter mice revealed the evolutionally conserved switching mechanism of tissue-specific alternative exon selection." PLoS one **5**, e10946.
- Taylor, J. G. t., A. T. Cheuk, et al. (2009). "Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models." J Clin Invest **119**(11): 3395-3407.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-454.
- Thiery, J. P. and J. P. Sleeman (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(2): 131-142.
- Thompson, L. M., S. Plummer, et al. (1991). "A gene encoding a fibroblast growth factor receptor isolated from the Huntington disease gene region of human chromosome 4." Genomics **11**(4): 1133-1142.
- Towbin, H. (1988). "Immunoblotting--an update." Biochem Soc Trans **16**(2): 131.
- Trudel, S., A. K. Stewart, et al. (2006). "The inhibitory anti-FGFR3 antibody, PRO-001, is cytotoxic to t(4;14) multiple myeloma cells." Blood **107**(10): 4039-4046.

- Tulin, S. and A. Stathopoulos (2010). "Extending the family table: Insights from beyond vertebrates into the regulation of embryonic development by FGFs." Birth Defects Res C Embryo Today **90**(3): 214-227.
- Turner, N. and R. Grose (2010). "Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer." Nat Rev Cancer **10**(2): 116-129.
- Vlodavsky, I., H. Q. Miao, et al. (1996). "Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor." Cancer Metastasis Rev **15**(2): 177-186.
- Vogels, A. and J. P. Fryns (2006). "Pfeiffer syndrome." Orphanet J Rare Dis **1**: 19.
- Webster, M. K. and D. J. Donoghue (1997). "FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing." Trends Genet **13**(5): 178-182.
- Wiedemann, M. and B. Trueb (2000). "Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors." Genomics **69**(2): 275-279.
- Wilkie, A.O. et al. (1995). "Apert syndrome results from localized mutations of FGFR2 and allelic with Crouzon syndrome." Nat Genet **9**(2): 165-172.
- Wray, S. (2002). "Molecular mechanisms for migration of placodally derived GnRH neurons." Chem Senses **27**(6): 569-572.
- Wyszczynski, M., D. M. Shin, et al. (2010). "Selective upregulation of interleukin-8 by human rhabdomyosarcomas in response to hypoxia: therapeutic implications." Int J Cancer **126**(2): 371-381.
- Xin, X., T. J. Abrams, et al. (2006). "CHIR-258 is efficacious in a newly developed fibroblast growth factor receptor 3-expressing orthotopic multiple myeloma model in mice." Clin Cancer Res **12**(16): 4908-4915.
- Xu, R., J. Teng, et al. (1993). "The cardiac troponin T alternative exon contains a novel purine-rich positive splicing element." Mol Cell Biol **13**(6): 3660-3674.
- Zahler, A. M. (2005). "Alternative splicing in *C. elegans*." WormBook: 1-13.
- Zhang, P., J. S. Greendorfer, et al. (2006). "Alternatively spliced FGFR-1 isoforms differentially modulate endothelial cell activation of c-YES." Arch Biochem Biophys **450**(1): 50-62.
- Zhang, X., O. A. Ibrahim, et al. (2006). "Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family." J Biol Chem **281**(23): 15694-15700.
- Zheng, C. L., X. D. Fu, et al. (2005). "Characteristics and regulatory elements defining constitutive splicing and different modes of alternative splicing in human and mouse." RNA **11**(12): 1777-1787.

VIII Verzeichnis der Anhänge

- Seite 146: Anhang 1 Tabelle der Auftragung der Gele**
- Seite 150: Anhang 2 Darstellung der PAGE-Gele**
- Seite 151: Anhang 3 QC-Sumary der RT-PCR-Ergebnisse**
- Seite 153: Anhang 4 Ergebnisse der SYBR-Studie**
- Seite 158: Anhang 5 Experiment-Sumary der RT-PCR-Ergebnisse**
- Seite 160: Anhang 6 Ergebnisse der SYBR-Studie von pRGIIIc in ausgewählten STS-Zellen**
- Seite 161: Anhang 7 Primer Reports**
- Seite 165: Anhang 8 EGFP-Nachweis mittels PCR**

IX ANHÄNGE 1-8

Anhang 1: Tabelle der Auftragung der Gele

Position	Zelllinie	Gen	Sonde	Versuch	bp	Grund der Auswahl	Beurteilung
Gel-1							
1	HAUT	FGFR-3	G3	2	531	KONTROLLE	Nebenprodukte, wie Probe 14
2	PSTS	FGFR-4	F4	3	525	Peak gegen Probe 3 verschoben	einzelne konkrete Bande
3	HT1080(1)	FGFR-4	F10	3	525	Peak gegen Probe 2 verschoben	kein Produkt nachweisbar
4	HTB-94	FGFR-2IIIb	A3	v1	417	Breite Spitze (Schmelzkurve)	Produkt bei ca. 50bp
5	F2000	FGFR-2IIIb	E3	v2	417	Breite Spitze (Schmelzkurve)	einzelne konkrete Bande
6	HTB-92	FGFR-2IIIc	F4	v1	508	Doppelspitze (Schmelzkurve)	einzelne konkrete Bande
7	HTB-92	FGFR-2IIIc	D4	v1	508	Doppelspitze (Schmelzkurve)	einzelne konkrete Bande
8	F2000	FGFR-3IIIb	D5	v2	429	Multiple Schmelkurvenpeaks (MTP)	Nebenprodukt bei 200bp
9	HT1080(1)	FGFR-3IIIb	C12	v2	429	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
10	HTB-93	FGFR-3IIIc	B12	v1	435	Peak gegen Probe 11 verschoben	einzelne konkrete Bande
11	HTB-91	FGFR-3IIIc	D12	v1	435	Peak gegen Probe 10 verschoben	Nebenprodukte < 200bp
12	HTB-92	FGFR-2	F2	1	600	Doppelspitze (Schmelzkurve)	einzelne konkrete Bande
13	HTB-82	FGFR-2	C2	1	600	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
14	F2000	FGFR-3	F3	2	531	Breite Spitze (Schmelzkurve)	Nebenprodukte, wie Probe 1
15	50bp MARKER						schlecht sichtbar
Gel-2							
1	HT1080(1)	FGFR-2	F9	3	600	Doppelspitze (Schmelzkurve)	einzelne konkrete Bande
2	HT1080	FGFR-2	A2	2	600	Doppelspitze (Schmelzkurve)	einzelne konkrete Bande
3	HTB-82	FGFR-2	B2	1	600	KONTROLLE	Nebenprodukt bei 200bp

4	HTB-91	FGFR-2	E2	1	600	Multiple Schmelkurvenpeaks (MTP)	einzelne konkrete Bande
5	HTB-93	FGFR-2	F8	1	600	Multiple Schmelkurvenpeaks (MTP)	einzelne konkrete Bande
6	Wi38	FGFR-2	D8	2	600	einzigste Probe, MTP	einzelne konkrete Bande
7	50bp MARKER						
8	HTB-93	FGFR-2IIIb	C9	v1	417	Breite Spitze (Schmelzkurve)	kein Produkt nachweisbar
9	PSTS	FGFR-2IIIb	D3	v3	417	KONTROLLE	Nebenprodukte bei 200+300bp
10	HAUT	FGFR-2IIIc	F10	v2	508	KONTROLLE	Nebenprodukte bei 200+300bp
11	F2000	FGFR-2IIIc	E4	v2	508	Breite Spitze (Schmelzkurve)	einzelne konkrete Bande
12	F2000	FGFR-3IIIb	B5	v1	429	KONTROLLE	Nebenprodukte bei 600+700bp
13	NTC	FGFR-3IIIb	H9	v1	429	positive Amplifikation	kein Produkt nachweisbar
14	F2000	FGFR-3IIIb	E5	v2	429	Breite Spitze (Schmelzkurve)	einzelne konkrete Bande
15	NTC	FGFR-3IIIb	H7	v2	429	KONTROLLE	Produkt bei 50bp
Position	Zelllinie	Gen	Sonde	Versuch	bp	Grund der Auswahl	Beurteilung
Gel-3							
1	F2000	FGFR-1	D1	2	376	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
2	MBSA	FGFR-1	A1	3	376	Breite Spitze (Schmelzkurve)	einzelne konkrete Bande
3	NTC	FGFR-1	H11	1	376	positive Amplifikation	Produkt bei 50bp
4	HTB-94	FGFR-3	G9	1	531	KONTROLLE	Nebenprodukte bei 600+700bp
5	FCHT(1)	FGFR-3	H3	3	531	undef. Schmelzkurve	Nebenprodukte bei 600+700bp
6	F2000	FGFR-3	E3	2	531	Breite Spitze (Schmelzkurve)	Nebenprodukte bei 600+700bp
7	NTC	FGFR-3	H11	2	531	KONTROLLE	Produkt bei 50bp
8	HTB-93	FGFR-4	F4	1	600	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
9	NTC	FGFR-4	H12	2	600	positive Amplifikation	Produkt bei 50bp

10	HTB-91	FGFR-5	B11	1	523	KONTROLLE	Nebenprodukte bei 600+700bp
11	MBSa	FGFR-5	A5	3	523	Breite Spitze (Schmelzkurve)	einzelne konkrete Bande
12	NTC	FGFR-5	H11	3	523	positive Amplifikation	Produkt bei 50bp
13	HT1080	Gap DH	B6	2		KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
14	NTC	Gap DH	H12	3		positive Amplifikation	einzelne konkrete Bande
15	50bp MARKER						nicht sichtbar

Gel-4

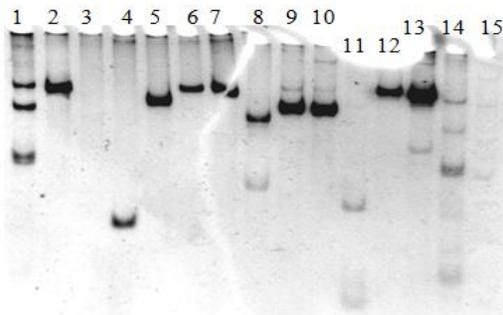
1	FCHT	β -Aktin	-	PCR	90	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
2	HT1080	β -Aktin	-	PCR	90	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
3	FCHT	β -Aktin	-	RT-PCR	90	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
4	HT1080	β -Aktin	-	RT-PCR	90	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
5	FCHT	FGFR-1	-	PCR	376	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
6	FCHT	FGFR-1	-	PCR	376	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
7	HT1080	FGFR-1	-	PCR	376	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
8	FCHT	FGFR-1	-	RT-PCR	376	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
9	HT1080	FGFR-1	-	RT-PCR	376	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
10	FCHT	FGFR-2	-	PCR	600	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
11	HT1080	FGFR-2	-	PCR	600	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
12	FCHT	FGFR-2	-	RT-PCR	600	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
13	HT1080	FGFR-2	-	RT-PCR	600	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
14	50bp MARKER						gut sichtbar
15	LEER						

Gel-5

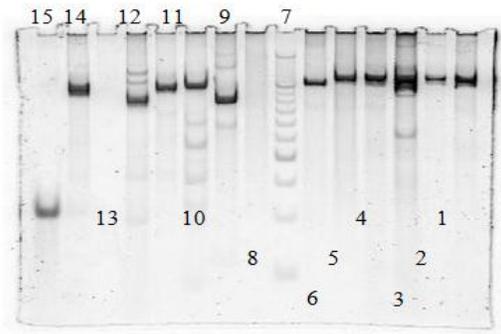
1	LEER						
2	50bp MARKER						
3	HT1080	FGFR-5	-	RT-PCR	523	KONTROLLE	Nebenprodukte bei 1500, 250+175bp
4	FCHT	FGFR-5	-	RT-PCR	523	KONTROLLE	Nebenprodukte bei 1500,

							250+175bp
5	HT1080	FGFR-5	-	PCR	523	KONTROLLE	kein Produkt bei 523bp, Nebenprodukte
6	FCHT	FGFR-5	-	PCR	523	KONTROLLE	kein Produkt bei 523bp, Nebenprodukte
7	HT1080	FGFR-4	-	RT-PCR	600	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
8	FCHT	FGFR-4	-	RT-PCR	600	KONTROLLE	einzelne konkrete Bande
9	HT1080	FGFR-4	-	PCR	600	KONTROLLE	Nebenprodukte bei 300+250bp
10	FCHT	FGFR-4	-	PCR	600	KONTROLLE	kein Produkt nachweisbar
11	HT1080	FGFR-3	-	RT-PCR	531	KONTROLLE	Nebenprodukte bei 400+250bp
12	FCHT	FGFR-3	-	RT-PCR	531	KONTROLLE	Nebenprodukte bei 400+250bp
13	HT1080	FGFR-3	-	PCR	531	KONTROLLE	Nebenprodukte bei 350+250bp
14	FCHT	FGFR-3	-	PCR	531	KONTROLLE	Nebenprodukte bei 350+250bp
15	LEER						
	(Steinhoff, H.A. 2009)						

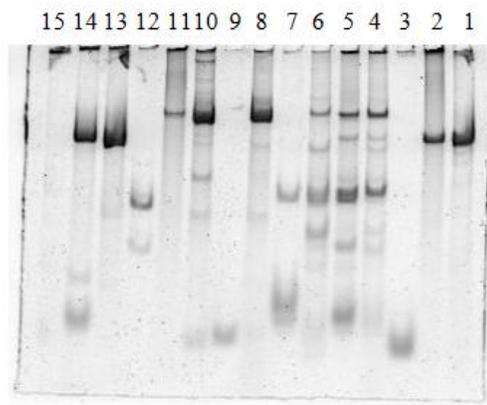
Anhang 2: Darstellung der PAGE-Gele



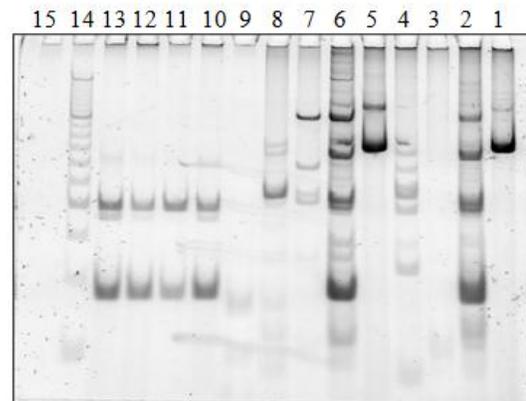
PAGE-Gel 1



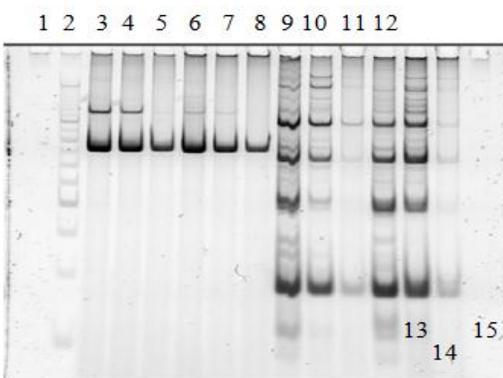
PAGE-Gel 2



PAGE-Gel 3



PAGE-Gel 4



PAGE-Gel 5

(Steinhoff, H.A. 2009)

Anhang 3: QC-Summary der RT-PCR-Ergebnisse

Biological Replicate Reference Sample HTB-82
 Chemistry SYBR® Green Reagents
 Created By
 Description
 Endogenous
 Control(s) Gap DH
 Instrument
 Type(s) sds7500fast, sds7500fast, sds7500fast, sds7500fast, sds7500fast, sds7500fast, sds7500fast
 Last Modified Thu Aug 13 11:37:14 CEST 2009
 Number of Experiments 7
 RQ Confidence Level 95.0
 Reaction Volume 8.0
 Study Name study endgueltig
 Study Type RQ
 Technical Replicate Reference Sample HTB-82

Flag	Name	Description	Criteria	Frequency
SPIKE	Noise spikes	The amplification plot contains one or more data points inconsistent with the other points in the plot	Spike algorithm result > 1.0	0
BADROX	Bad passive reference signal	Passive reference signal is abnormal	Bad passive reference algorithm result > 0.6	0
NOAMP	No amplification	The sample did not amplify	Amplification algorithm result < 0.1	20
CTFAIL	C _T algorithm failed	The software cannot calculate C _T .		0
BLFAIL	Baseline algorithm failed	The software cannot calculate the best fit baseline for the data.		0
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	The software cannot identify the exponential region of the amplification plot.		58
THOLDFAIL	Thresholding	The software cannot calculate a threshold.		0

	algorithm failed			
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	Ct standard deviation for the replicate group exceeds the flag setting.	Ct standard deviation > 0.7	50
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	Ct deviates significantly from Ct values in the associated replicate group		3
NOSIGNAL	No signal in well	The well produced very low or no fluorescence.		0
NOISE	Noise higher than others in plate	The well produced more noise in the amplification plot than other wells in the plate	Relative noise > 4.0	0
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	Fluorescence exceeds the instrument's maximum detectable range for one or more cycles.		0
AMPNC	Amplification in negative control	A sequence amplified in a negative control reaction.	C _T < 35.0	13

(Steinhoff, H.A. 2009)

Anhang 4: Ergebnisse der SYBR-Studie

Biogroup	Target	TW	BW	Ct Mean	RQ	RQ Max	RQ Min
F2000	FGFR-1	3	1	21,39	0,42	0,51	0,35
HAUT	FGFR-1	2	1	17,94	4,16	8,63	2,01
Wi38	FGFR-1	3	1	17,05	19,14	23,58	15,53
FCHT	FGFR-1	3	2	22,87	0,49	0,30	0,80
HT1080	FGFR-1	3	2	20,23	1,81	1,21	2,73
HTB-82	FGFR-1	3	1	18,69	1,00	0,68	1,47
HTB-91	FGFR-1	3	1	17,88	7,55	8,92	6,39
HTB-92	FGFR-1	3	1	17,85	1,67	1,89	1,47
HTB-93	FGFR-1	3	1	19,92	4,16	5,03	3,44
HTB-94	FGFR-1	3	1	15,30	10,15	15,04	6,85
CaFSA	FGFR-1	3	1	26,67	0,01	0,02	0,00
MBSa	FGFR-1	3	1	34,11	0,00	0,00	0,00
PSTS	FGFR-1	3	1	27,38	0,00	0,00	0,00
Fibroblasten					7,91	10,90	5,96
F2000	FGFR-1IIIc	3	1	23,70	1,48	1,98	1,11
HAUT	FGFR-1IIIc	3	1	18,87	6,91	11,14	4,29
Wi38	FGFR-1IIIc	3	1	17,69	49,51	51,81	47,31
FCHT	FGFR-1IIIc	3	1	22,30	1,11		
HT1080	FGFR-1IIIc	3	1	18,44	1,70	2,20	1,32
HTB-82	FGFR-1IIIc	3	1	20,06	1,00	1,21	0,83
HTB-91	FGFR-1IIIc	3	1	18,70	35,24	94,54	13,14
HTB-92	FGFR-1IIIc	3	1	18,39	3,48	4,50	2,68
HTB-93	FGFR-1IIIc	3	1	20,03	14,40	27,07	7,67
HTB-94	FGFR-1IIIc	3	1	16,26	17,26	28,14	10,59
CaFSA	FGFR-1IIIc	3	1	17,96	15,86	18,53	13,57
MBSa	FGFR-1IIIc	3	1	19,28	13,67	18,12	10,32
PSTS	FGFR-1IIIc	3	1	19,15	5,09	13,46	1,93
Fibroblasten					19,30	21,64	17,57
F2000	FGFR-1IIIb	3	1	29,77	0,06	0,08	0,04
HAUT	FGFR-1IIIb	3	1	25,56	0,17	0,22	0,13
Wi38	FGFR-1IIIb	3	1	23,26	2,75	3,00	2,52
FCHT	FGFR-1IIIb	3	1	30,10	0,01		
HT1080	FGFR-1IIIb	3	1	24,01	0,09	0,12	0,07
HTB-82	FGFR-1IIIb	3	1	21,70	1,00	1,27	0,79

<i>HTB-91</i>	FGFR-1IIIb	3	1	24,35	1,84	4,95	0,68
<i>HTB-92</i>	FGFR-1IIIb	3	1	25,43	0,06	0,09	0,05
<i>HTB-93</i>	FGFR-1IIIb	3	1	27,12	0,26	0,47	0,14
<i>HTB-94</i>	FGFR-1IIIb	3	1	24,15	0,17	0,30	0,10
CaFSA	FGFR-1IIIb	3	1	21,50	3,94	4,70	3,30
MBSa	FGFR-1IIIb	3	1	23,05	2,85	3,50	2,32
PSTS	FGFR-1IIIb	3	1	25,64	0,14	0,20	0,10
Fibroblasten					0,99	1,10	0,90
F2000	FGFR-2	3	1	30,36	0,00	0,00	0,00
HAUT	FGFR-2	2	1	25,84	0,01	0,02	0,01
Wi38	FGFR-2	3	1	34,82	0,00		
FCHT	FGFR-2	3	2	35,27	0,00		
<i>HT1080</i>	FGFR-2	2	2	30,96	0,00	0,00	0,00
<i>HTB-82</i>	FGFR-2	3	1	18,49	1,00	2,01	0,50
<i>HTB-91</i>	FGFR-2	3	1	40,00	0,00		
<i>HTB-92</i>	FGFR-2	3	1	31,46	0,00	0,00	0,00
<i>HTB-93</i>	FGFR-2	3	1	34,48	0,00	0,00	0,00
<i>HTB-94</i>	FGFR-2	2	1	20,74	0,14	0,26	0,08
CaFSA	FGFR-2	3	1	40,00	0,00		
MBSa	FGFR-2	3	1	40,00	0,00		
PSTS	FGFR-2	3	1	37,76	0,00	0,00	0,00
Fibroblasten					0,00	0,01	0,00
F2000	FGFR-2IIIb	3	1	34,72	0,00		
HAUT	FGFR-2IIIb	3	1	33,93	0,00		
Wi38	FGFR-2IIIb	3	1	40,00	0,00		
FCHT	FGFR-2IIIb	3	1	40,00	0,00		
<i>HT1080</i>	FGFR-2IIIb	3	1	33,36	0,00	0,00	0,00
<i>HTB-82</i>	FGFR-2IIIb	3	1	17,34	1,00	1,20	0,83
<i>HTB-91</i>	FGFR-2IIIb	3	1	32,56	0,00		
<i>HTB-92</i>	FGFR-2IIIb	3	1	40,00	0,00		
<i>HTB-93</i>	FGFR-2IIIb	3	1	40,00	0,00		
<i>HTB-94</i>	FGFR-2IIIb	3	1	27,45	0,00	0,00	0,00
CaFSA	FGFR-2IIIb	3	1	25,85	0,01	0,01	0,00
MBSa	FGFR-2IIIb	3	1	28,83	0,00	0,00	0,00
PSTS	FGFR-2IIIb	3	1	25,57	0,01	0,01	0,00
Fibroblasten					0,00		
F2000	FGFR-2IIIc	3	1	32,11	0,15	0,34	0,07
HAUT	FGFR-2IIIc	3	1	27,02	0,46	0,67	0,32
Wi38	FGFR-2IIIc	3	1	34,40	0,02		
FCHT	FGFR-2IIIc	3	1	35,04	0,01		

<i>HT1080</i>	FGFR-2IIIc	3	1	28,34	0,04	0,05	0,03
<i>HTB-82</i>	FGFR-2IIIc	3	1	24,02	1,00	1,26	0,79
<i>HTB-91</i>	FGFR-2IIIc	3	1	34,04	0,03	0,14	0,01
<i>HTB-92</i>	FGFR-2IIIc	3	1	31,32	0,01	0,03	0,01
<i>HTB-93</i>	FGFR-2IIIc	3	1	34,56	0,05	0,92	0,00
<i>HTB-94</i>	FGFR-2IIIc	3	1	21,20	6,00	11,00	3,27
CaFSA	FGFR-2IIIc	3	1	24,92	1,96	2,69	1,43
MBSa	FGFR-2IIIc	3	1	25,56	3,01	4,53	1,99
PSTS	FGFR-2IIIc	3	1	20,28	25,90	35,93	18,67
Fibroblasten					0,21	0,50	0,19
<i>F2000</i>	FGFR-3	3	1	28,95	0,00	0,00	0,00
<i>HAUT</i>	FGFR-3	3	1	23,78	0,06	0,08	0,05
<i>Wi38</i>	FGFR-3	3	1	24,82	0,07	0,09	0,06
<i>FCHT</i>	FGFR-3	3	2	28,22	0,01	0,01	0,02
<i>HT1080</i>	FGFR-3	3	2	26,93	0,02	0,01	0,03
<i>HTB-82</i>	FGFR-3	3	1	18,65	1,00	1,11	0,90
<i>HTB-91</i>	FGFR-3	3	1	27,78	0,01	0,01	0,00
<i>HTB-92</i>	FGFR-3	3	1	24,23	0,02	0,04	0,01
<i>HTB-93</i>	FGFR-3	2	1	28,37	0,01	0,01	0,01
<i>HTB-94</i>	FGFR-3	3	1	25,27	0,01	0,01	0,01
CaFSA	FGFR-3	3	1	25,49	0,03	0,05	0,02
MBSa	FGFR-3	3	1	28,84	0,01	0,01	0,01
PSTS	FGFR-3	3	1	22,78	0,09	0,11	0,08
Fibroblasten					0,14	0,17	0,11
<i>F2000</i>	FGFR-3IIIb	3	1	36,87	0,00	0,00	0,00
<i>HAUT</i>	FGFR-3IIIb	3	1	29,15	0,00	0,00	0,00
<i>Wi38</i>	FGFR-3IIIb	3	1	29,55	0,00	0,01	0,00
<i>FCHT</i>	FGFR-3IIIb	2	1	31,37	0,00		
<i>HT1080</i>	FGFR-3IIIb	3	1	25,88	0,00	0,00	0,00
<i>HTB-82</i>	FGFR-3IIIb	3	1	18,16	1,00	1,24	0,81
<i>HTB-91</i>	FGFR-3IIIb	2	1	32,99	0,00	0,00	0,00
<i>HTB-92</i>	FGFR-3IIIb	3	1	25,60	0,01	0,01	0,01
<i>HTB-93</i>	FGFR-3IIIb	2	1	32,61	0,00	0,00	0,00
<i>HTB-94</i>	FGFR-3IIIb	3	1	27,62	0,00	0,00	0,00
CaFSA	FGFR-3IIIb	3	1	29,24	0,00	0,00	0,00
MBSa	FGFR-3IIIb	3	1	31,62	0,00	0,00	0,00
PSTS	FGFR-3IIIb	3	1	27,45	0,01	0,01	0,00
Fibroblasten					0,00	0,00	0,00
<i>F2000</i>	FGFR-3IIIc	3	1	32,23	0,04	0,08	0,02
<i>HAUT</i>	FGFR-3IIIc	3	1	25,62	0,46	0,59	0,35

Wi38	FGFR-3IIIc	3	1	27,59	0,37	0,40	0,34
<i>FCHT</i>	FGFR-3IIIc	3	1	28,13	0,17		
<i>HT1080</i>	FGFR-3IIIc	3	1	23,59	0,31	0,40	0,25
<i>HTB-82</i>	FGFR-3IIIc	3	1	22,85	1,00	1,34	0,75
<i>HTB-91</i>	FGFR-3IIIc	2	1	35,17	0,00	0,05	0,00
<i>HTB-92</i>	FGFR-3IIIc	3	1	23,90	0,50	0,65	0,39
<i>HTB-93</i>	FGFR-3IIIc	3	1	30,20	0,10	0,20	0,06
<i>HTB-94</i>	FGFR-3IIIc	3	1	25,10	0,24	0,27	0,21
CaFSA	FGFR-3IIIc	3	1	26,05	0,40	0,56	0,29
MBSa	FGFR-3IIIc	3	1	24,51	2,55	3,13	2,07
PSTS	FGFR-3IIIc	3	1	23,37	1,84	2,59	1,30
Fibroblasten					0,29	0,36	0,24
F2000	FGFR-4	3	1	22,40	0,35	0,67	0,18
HAUT	FGFR-4	3	1	28,55	0,00	0,00	0,00
Wi38	FGFR-4	3	1	26,31	0,03	0,06	0,02
<i>FCHT</i>	FGFR-4	3	2	22,39	1,11	0,64	1,93
<i>HT1080</i>	FGFR-4	3	2	25,29	0,07	0,04	0,12
<i>HTB-82</i>	FGFR-4	3	1	19,59	1,00	1,22	0,82
<i>HTB-91</i>	FGFR-4	2	1	30,39	0,00	0,00	0,00
<i>HTB-92</i>	FGFR-4	3	1	21,19	0,23	0,29	0,19
<i>HTB-93</i>	FGFR-4	3	1	27,88	0,02	0,02	0,02
<i>HTB-94</i>	FGFR-4	3	1	22,89	0,06	0,09	0,04
CaFSA	FGFR-4	3	1	37,44	0,00	0,00	0,00
MBSa	FGFR-4	3	1	35,77	0,00	0,00	0,00
PSTS	FGFR-4	3	1	33,70	0,00	0,00	0,00
Fibroblasten					0,13	0,24	0,07
F2000	FGFR-5	3	1	24,30	0,31	0,35	0,26
HAUT	FGFR-5	3	1	18,64	11,06	14,75	8,29
Wi38	FGFR-5	3	1	21,66	3,25	3,79	2,78
<i>FCHT</i>	FGFR-5	3	2	26,99	0,16	0,09	0,27
<i>HT1080</i>	FGFR-5	3	2	21,04	5,13	2,99	8,80
<i>HTB-82</i>	FGFR-5	3	1	21,10	1,00	1,14	0,87
<i>HTB-91</i>	FGFR-5	3	1	24,16	0,43	0,49	0,38
<i>HTB-92</i>	FGFR-5	3	1	19,15	2,93	3,42	2,51
<i>HTB-93</i>	FGFR-5	3	1	22,35	3,79	4,54	3,16
<i>HTB-94</i>	FGFR-5	3	1	16,64	14,75	17,89	12,15
CaFSA	FGFR-5	3	1	36,09	0,00	0,00	0,00
MBSa	FGFR-5	3	1	39,50	0,00		
PSTS	FGFR-5	3	1	35,97	0,00	0,00	0,00
Fibroblasten					4,87	6,30	3,78

F2000	Gap DH	2	1	14,12
HAUT	Gap DH	3	1	12,42
Wi38	Gap DH	3	1	13,81
FCHT	Gap DH	2	2	14,46
HT1080	Gap DH	3	2	12,74
HTB-82	Gap DH	3	1	11,15
HTB-91	Gap DH	3	1	13,77
HTB-92	Gap DH	3	1	10,96
HTB-93	Gap DH	3	1	14,64
HTB-94	Gap DH	3	1	10,89
CaFSA	Gap DH	3	1	12,96
MBSa	Gap DH	3	1	14,34
PSTS	Gap DH	3	1	12,13

CT-Werte von PCR-Reaktionen ohne Produkt wurden mit 40 definiert

BW Biologische Wiederholung

TW Technische Wiederholung

Biogroups Mensch (kursiv), Hund (Fettgedrückt), Fibroblasten (Fettgedrückt und Kursiv)

(Steinhoff, H.A. 2009)

Anhang 5: Experiment-Summary der RT-PCR-Ergebnisse

Experiment Summary

Experiment Name	:Untitled
Experiment Type	:Quantitation - Comparative Ct ($\Delta\Delta C_t$)
File Name	:lllc_T7+vicrev_Exp1_121110_dm_results_dog.eds
Run Started	:2010 Nov 12 2:31:49 PM
Run Finished	:2010 Nov 12 4:46:50 PM
Run Duration	:135 minutes 0 seconds
Date Modified	:2010 Nov 23 12:47:21 PM
User	:
Number of wells used	:95
Number of wells with results	:87
Instrument Name	:
Instrument Type	:Applied Biosystems 7500 Fast Instrument
Comments	:

QC Summary

Total Wells	96	Processed Wells	87	Targets Used
Well Setup	95	Flagged Wells	21	Samples Used

Flag	Name	Frequency	Locations
AMPNC	Amplification in negative control	1	G12
BADROX	Bad passive reference signal	0	
BLFAIL	Baseline algorithm failed	0	
CTFAIL	C _T algorithm failed	0	
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	0	
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	11	F1, F2, F3, F4, F5, F6, G1, G2, G3,
MTP	Multiple T _m peaks	17	C6, D12, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, H4, H5, H7, H9, H10, H11, H12
NOAMP	No amplification	0	
NOISE	Noise higher than others in plate	0	
NOSIGNAL	No signal in well	0	
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	0	
SPIKE	Noise spikes	0	
THOLDFAIL	Thresholding algorithm failed	0	

QC Summary

Total Wells	96	Processed Wells	65	Targets Used	4
Well Setup	65	Flagged Wells	13	Samples Used	10

Flag	Name	Frequency	Locations
AMPNC	Amplification in negative control	1	F10
BADROX	Bad passive reference signal	0	
BLFAIL	Baseline algorithm failed	0	
CTFAIL	C _T algorithm failed	0	
EXPFAIL	Exponential algorithm failed	8	E1, E2, E3, E4, E6, E7, E8, F1
HIGHSD	High standard deviation in replicate group	2	F2, F3
MTP	Multiple T _m peaks	11	E2, E4, E5, E6, E7, E8, E10, F1, F2, F3, F10
NOAMP	No amplification	6	E1, E2, E3, E4, E6, F1
NOISE	Noise higher than others in plate	0	
NOSIGNAL	No signal in well	0	
OFFSCALE	Fluorescence is offscale	0	
OUTLIERRG	Outlier in replicate group	0	
SPIKE	Noise spikes	0	
THOLDFAIL	Thresholding algorithm failed	0	

Anhang 6: Ergebnisse der SYBR-Studie von pRGIIIc in ausgewählten STS-Zellen

Biogroup	Target	TW	BW	Ct Mean	RQ	RQ Max	RQ Min
<i>SW480</i>	FGFR2 IIIc/pRGIIIc	2	1	31,91	0,0049	0,002	0,0121
<i>HTB91-MixK</i>		2	1	30,30	0,0228	0,0172	0,0302
<i>HTB91-K3</i>		2	1	28,87	0,0168	0,0129	0,0218
MBSa		2	1	26,96	1	0,65	1,54
<i>SW480</i>	GapDH	2	1	16,10			
<i>HTB91-MixK</i>		2	1	14,75			
<i>HTB91-K3</i>		2	1	35,65			
MBSa		2	1	16,26			
BW	Biologische Wiederholung						
TW	Technische Wiederholung						
Biogroups	Mensch (SW480,HTB91-MixK und HTB91-K3; Fett und Kursiv); Hund (MBSa nur Fett markiert)						

Anhang 7: Primer Reports

08 Jul 2010

Primer Pair Report

- - Primer A Information - - - - -

Primer A VIC_for_2
Sequence: 5' GGATTACAAGGATGACGATGAC 3'
Length: 22 Meets criteria: No
Pos: 291 Composition: A: 8 C: 3 G: 7 T: 4

Criteria: % GC: Min 50, Max 60; Tm°C: Min 55, Max 80
Annealing temp 55°C; Stability (5'vs3') >= 1.2 kcals
Reject >= 3 matches at 3' end; >= 7 adj homol bases
Reject >= 4 base runs; >= 3 Dinucleotide Repeats
GC clamp Require >= 1 G or C at 3' end

- - Primer B Information - - - - -

Primer B VIC_rev_2
Sequence: 5' ACCTTGAAGCGCATGAAC 3'
Length: 18 Meets criteria: Yes
Pos: 1891 C Composition: A: 6 C: 5 G: 4 T: 3

Criteria: % GC: Min 50, Max 60; Tm°C: Min 55, Max 80
Annealing temp 55°C; Stability (5'vs3') >= 1.2 kcals
Reject >= 3 matches at 3' end; >= 7 adj homol bases
Reject >= 4 base runs; >= 3 Dinucleotide Repeats
GC clamp Require >= 1 G or C at 3' end

- - Molecule Information - - - - -

Molecule: PCR-Produkt Blunt-End, 3360 bps DNA
Description: pRGIIIc delta NLS 635 to 3990
File Name: PCR-Produkt Blunt-End.cm5, dated 07 Jul 2010

Amplified product: Size 1601 bps GC 47% Tm 78°C Ta 52°C



- - Primer Evaluation and Summary - - - - -

	-A-	-B-	Comment
Length	22	18	4 base difference
% GC	45 !	50	5 % difference
Tm °C	60	60	
3' Dimers	1	1	A:B 1
Dimers - Any	2	4	A:B 5
Stability (kcals)	1.2	2.7	
GC clamp	1	1	
Runs of bases	2	2	
Repeats (dinuc)	none	2	
Hairpins	none	none	
Worst-case False Priming °C	--	--	

- - Primer A Information - - - - -

Primer A M13 F_Primer
 Sequence: 5' G-TAATACGACTCACTATAGGG 3'
 Length: 21 Meets criteria: No
 Pos: 863 Composition: A: 7 C: 4 G: 5 T: 5

Criteria: % GC: Min 50, Max 60; Tm°C: Min 55, Max 80
 Annealing temp 45°C; Stability (5'vs3') >= 1.2 kcals
 Reject >= 3 matches at 3' end; >= 7 adj homol bases
 Reject >= 4 base runs; >= 3 Dinucleotide Repeats
 GC clamp Require >= 1 G or C at 3' end

- - Primer B Information - - - - -

Primer B VIC_rev_2
 Sequence: 5' ACCTTGAAGCGCATGAAC 3'
 Length: 18 Meets criteria: Yes
 Pos: 2521 C Composition: A: 6 C: 5 G: 4 T: 3

Criteria: % GC: Min 50, Max 60; Tm°C: Min 55, Max 80
 Annealing temp 45°C; Stability (5'vs3') >= 1.2 kcals
 Reject >= 3 matches at 3' end; >= 7 adj homol bases
 Reject >= 4 base runs; >= 3 Dinucleotide Repeats
 GC clamp Require >= 1 G or C at 3' end

- - Molecule Information - - - - -

Molecule: pRGIIIc delta NLS, 8313 bps DNA Circular
 Description: from Mariano Garcia-Blanco Clin Exp Metastasis (2008= 25:611-619
 File Name: pRGIIIc delta NLS_Modifiziert.cm5, dated 18 Aug 2010

Amplified product: Size: 1660 bps Product GC 47%
 Calc temperatures: Melting T 78°C, Annealing T 49°C



- - Primer Evaluation and Summary - - - - -

	-A-	-B-	Comment
Length	21	18	3 base difference
% GC	42 !	50	8 % difference
Tm °C	54 ! 56 ²	60	6 ¹ 4 ² C° difference
3' Dimers	1	1	A:B 2
Dimers - Any	6	4	A:B 3
Stability (kcals)	0.8 !	2.8	Low selectivity
GC clamp	3	1	
Runs of bases	3	2	
Repeats (dinuc)	2	2	
Hairpins	none	none	
Worst-case False Priming °C	--	--	

- - Primer A Information - - - - -

Primer A T7 Promotor Primer
 Sequence: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
 Length: 20 Meets criteria: No
 Pos: 863 Composition: A: 7 C: 4 G: 4 T: 5

Criteria: % GC: Min 50, Max 60; Tm°C: Min 55, Max 80
 Annealing temp 45°C; Stability (5'vs3') >= 1.2 kcals
 Reject >= 3 matches at 3' end; >= 7 adj homol bases
 Reject >= 4 base runs; >= 3 Dinucleotide Repeats
 GC clamp Require >= 1 G or C at 3' end

- - Primer B Information - - - - -

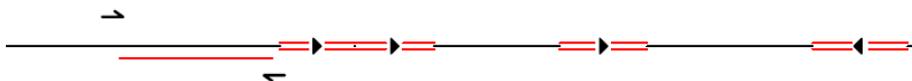
Primer B VIC_rev_2
 Sequence: 5' ACCTTGAAGCGCATGAAC 3'
 Length: 18 Meets criteria: Yes
 Pos: 2521 C Composition: A: 6 C: 5 G: 4 T: 3

Criteria: % GC: Min 50, Max 60; Tm°C: Min 55, Max 80
 Annealing temp 45°C; Stability (5'vs3') >= 1.2 kcals
 Reject >= 3 matches at 3' end; >= 7 adj homol bases
 Reject >= 4 base runs; >= 3 Dinucleotide Repeats
 GC clamp Require >= 1 G or C at 3' end

- - Molecule Information - - - - -

Molecule: pRGIIC delta NLS, 8313 bps DNA Circular
 Description: from Mariano Garcia-Blanco Clin Exp Metastasis (2008= 25:611-619
 File Name: pRGIIC delta NLS_Modifiziert.cm5, dated 18 Aug 2010

Amplified product: Size: 1659 bps Product GC 47%
 Calc temperatures: Melting T 78°C, Annealing T 49°C



- - Primer Evaluation and Summary - - - - -

	-A-	-B-	Comment
Length	20	18	2 base difference
% GC	40 !	50	10 % difference
Tm °C	54 !	60	6 C° difference
3' Dimers	1	1	A:B 2
Dimers - Any	6	4	A:B 3
Stability (kcals)	0.8 !	2.8	Low selectivity
GC clamp	3	1	
Runs of bases	3	2	
Repeats (dinuc)	2	2	
Hairpins	none	none	
Worst-case False Priming °C	--	--	

18 Aug 2010

Primer Pair Report

- - Primer A Information - - - - -

Primer A M13 F_Primer
 Sequence: 5' G-TAATACGACTCACTATAGGG 3'
 Length: 21 Meets criteria: No
 Pos: 863 Composition: A: 7 C: 4 G: 5 T: 5

Criteria: % GC: Min 50, Max 60; Tm°C: Min 55, Max 80
 Annealing temp 45°C; Stability (5'vs3') >= 1.2 kcals
 Reject >= 3 matches at 3' end; >= 7 adj homol bases
 Reject >= 4 base runs; >= 3 Dinucleotide Repeats
 GC clamp Require >= 1 G or C at 3' end

- - Primer B Information - - - - -

Primer B VIC_rev_2
 Sequence: 5' ACCTGAAGCGCATGAAC 3'
 Length: 18 Meets criteria: Yes
 Pos: 2521 C Composition: A: 6 C: 5 G: 4 T: 3

Criteria: % GC: Min 50, Max 60; Tm°C: Min 55, Max 80
 Annealing temp 45°C; Stability (5'vs3') >= 1.2 kcals
 Reject >= 3 matches at 3' end; >= 7 adj homol bases
 Reject >= 4 base runs; >= 3 Dinucleotide Repeats
 GC clamp Require >= 1 G or C at 3' end

- - Molecule Information - - - - -

Molecule: pRGIIC delta NLS, 8313 bps DNA Circular
 Description: from Mariano Garcia-Blanco Clin Exp Metastasis (2008= 25:611-619)
 File Name: pRGIIC delta NLS_Modifiziert.cm5, dated 18 Aug 2010

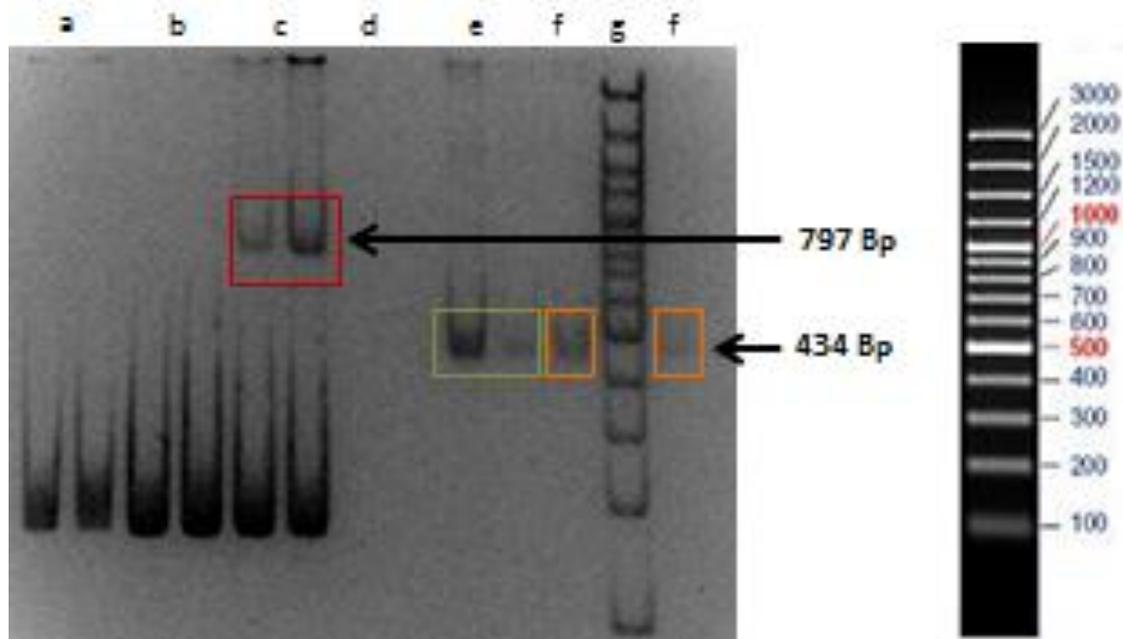
Amplified product: Size: 1660 bps Product GC 47%
 Calc temperatures: Melting T 78°C, Annealing T 49°C



- - Primer Evaluation and Summary - - - - -

	-A-	-B-	Comment
Length	21	18	3 base difference
% GC	42 !	50	8 % difference
Tm °C	54 ¹ ! 56 ²	60	6 ¹ 4 ² C° difference
3' Dimers	1	1	A:B 2
Dimers - Any	6	4	A:B 3
Stability (kcals)	0.8 !	2.8	Low selectivity
GC clamp	3	1	
Runs of bases	3	2	
Repeats (dinuc)	2	2	
Hairpins	none	none	
Worst-case False Priming °C	--	--	

Anhang 8: EGFP-Nachweis mittels PCR



**Im Inlay ist das Verhalten im PAGE-Gel neben einem 100 bp Marker dargestellt. Die zum auftragenden Proben sind von a bis g buchstabiert:*

**a) NTCs=Negative Kontrolle für pEGFP-C1*

**b) NTCs für pEGFP-F*

**c) DNA von pRGIIIc + Primer GFP6 und CFP für EGFP-Detektion*

**d) NTCs für pRGIIIc*

**e) pEGFP-C1-DNA+ Primer GFP6 und CFP zur Detektion von GFP*

**f) pEGFP-F-DNA + Primer GFP6 und CFP zur Detektion von GFP*

**g) Marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; Fermentas)*

Abb. 2.4.1.1.: Feststellung der Funktion der GFP-Primer durch PCR-Amplifikation

X LEBENSLAUF

Victor Manuel Muñoz Pérez

Anschrift: Brauergasse 4/2/4, 1060 Wien

Telefon: ++43 676 6700891

Email: victormpz20@hotmail.com

Geboren: 12/05/1981 in Mexiko

Eltern: José Victor Muñoz Lozano
Mercedes Pérez Sanchez

Schulbildung: 1987-1993 Grundschule Ignacio Zaragoza
1994-1996 Sekundäre Schule Julian Villagran
1997-2000 Gymnasium Preparatoria No.1
2001-2002 Privat Sprachkurs Cultura-Wien

Studium: 2002-2003 Universitätslehrgang (Sprachkurs)
2003-dato Universität Wien

Famulaturen: 2008-2011 Diplomstudium Genetik – Mikrobiologie

Wehrdienst: 1999 Aktiver Dienst bei der mexikanischen Militär
(18te militärische Zone)

Freizeit: Laufen, Tennis-spielen, Schwimmen.

Sprachen: Spanisch, Deutsch