

Aus der Klinik für Chirurgie und chirurgische Onkologie
der Robert-Rössle-Klinik, Campus Berlin-Buch
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Identifizierung von Spleißvarianten mit prognostischer Relevanz
im Kolonkarzinom**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kristine Butherus
aus Jerschow

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. Dr. h. c. P. M. Schlag**
- 2. Prof. Dr. rer.nat. R. Schäfer**
- 3. Prof. Dr. med. J. Weitz**

Datum der Promotion: 19. Mai 2008

Zusammenfassung

Das alternative Spleißen ist ein entscheidender Mechanismus, der zur Genomkomplexität und Diversität beiträgt und dem eine wichtige Rolle für Karzinogenese und Tumorprogression zukommt. Der Wnt-Pathway ist ein besonders wichtiger Signaltransduktionsweg für die Entwicklung, Invasion und Metastasierung unterschiedlicher Tumorarten.

Diese Promotionsarbeit hat sich zum Ziel gesetzt, alternative Spleißvarianten von Schlüsselmolekülen des Wnt-Pathways in Proben aus Kolongewebe der Tumorbank der Robert-Rössle-Klinik zu identifizieren. Die Auswahl putativer Spleiß-Kandidatengene erfolgte mit der EASED-Software (extended Alternatively spliced EST-Database), die in der Arbeitsgruppe Bioinformatik von Prof. Dr. J. Reich am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin entwickelt wurde. Zu den in dieser Arbeit erforschten Genen gehören *CTNNB1* (β -Catenin), das *CtBP1* (C-terminal Binding Protein), *CK1A* (Casein Kinase 1A), *GSK3 β* (Glycogen-Synthase-Kinase 3 β), *LRP5* (Low density lipoprotein related protein 5) und *Axin1* (Axin). Einige Spleißstellen wurden bereits in der Literatur für möglich gehalten (wie z.B. *CTNNB1*), waren in anderen Geweben (nicht im Kolon) beschrieben (wie z.B. *GSK3 β* im neuronalen Gewebe) oder waren noch nicht veröffentlicht (wie z.B. *LRP5*). Informationen aus der bioinformatischen Analyse der Sequenzen der acht ausgewählten Spleißstellen in Wnt-Komponenten waren beim Design spezifischer Primer und der RT-PCR-Reaktionen mit Primer Express-Software von Applied Biosystems hilfreich. Hohe Anforderungen wurden dabei an die Primerbindestellen gestellt. Sie sollten vor und nach den vorhergesagten Spleißgrenzen oder auch spleißgrenzenübergreifend platziert werden, um möglichst in einer Reaktion beide Spleißtranskripte nachweisen zu können. Für jede Spleißstelle erfolgte zuerst eine Optimierung der PCR-Temperatur, PCR-Zeit und Anzahl der Zyklen. Alle Optimierungsreaktionen erfolgten mit der cDNA aus Karzinom-Zelllinien. Für den Nachweis putativer Spleißtranskripte im Kolongewebe wurde nur pathologisch begutachtetes Material verwendet. Bei allen PCR-Produkten wurde anschließend die Sequenzbestimmung durchgeführt. Die Quantifizierung der Expression von *Axin*-Isoformen wurde zusätzlich zur RT-PCR mit der Real-Time PCR (Taqman) genauer untersucht.

Beide Isoformen (konstitutive und alternative) von sechs der acht untersuchten Wnt-Gene wurden in allen Zelllinien, im Tumorgewebe und dazugehörigen nicht-

neoplastischen Mucosa, sowie im Material gesunder Probanden exprimiert. Von zwei bioinformatisch vorhergesagten Kandidaten (*CtBP1* (2) und *CK1A*) wurde im Kolongewebe nur die Bildung ihrer normalen Isoform beobachtet. Die sequenzierten PCR-Produkte wiesen bei allen Genen eine komplette Übereinstimmung mit den bioinformatisch vorhergesagten Spleißvarianten auf. Die Ergebnisse zeigen, dass viele der durch die bioinformatische Analyse als tumorspezifisch eingestuften EST-Daten während der experimentellen Untersuchung im Labor weder qualitative noch quantitative Unterschiede der Expression zwischen Tumor und gesunden Mucosa liefern.

In dieser Arbeit wurden erstmals die verschiedenen Spleißvarianten der Wnt-Moleküle im Kolongewebe von Tumorpatienten erforscht. Dabei wurden zwei neue Spleißtranskripte (*CTNNB1* und *LRP5*) identifiziert. Die bioinformatische Vorarbeit ermöglichte somit zuverlässig die Identifizierung von Spleißvarianten im humanen Gewebe. Leider muss die Aussagekraft der EST-Daten in Bezug auf Tumor- oder Gewebsspezifität als kritisch betrachtet werden. Die Schlussfolgerung dieser Arbeit, dass die öffentlich zugängigen EST-Daten zur Klärung der Kolonkarzinom-Zugehörigkeit mangelhaft sind, wird durch ähnliche Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bekräftigt.

Die in dieser Arbeit ausgewählten Schlüsselgene des Wnt-Signalweges, welche zentrale Moleküle kodieren, können auch potentiell als biologische Marker fungieren. Alle Spleißstellen, unter Ausnahme von *CTNNB1*, liegen in dem für das Protein codierenden pre-mRNA-Bereich. Die Folgen für die Proteinfunktion können als Änderung der katalytischen Aktivität (*CK1A*, *GSK3β*), erniedrigter Bindungsaffinität von Liganden (*LRP5*, *CtBP1*), falscher Signalübermittlung (*LRP5*, *Axin1*), Störungen der Proteinfaltung (*Axin1*) und RNA-Regulation (*CTNNB1*) auftreten. Besonders der näher untersuchte Tumorsuppressor *Axin1* korreliert in seiner Expression umgekehrt proportional mit späten Tumorstadien und der Neigung zur Metastasenbildung und könnte zukünftig in Rahmen größerer Patienten-Stichproben als Prognose- und Verlaufsparemeter interessant werden. Die Ergebnisse der Studie wurden inzwischen in *BMC Genomics* 2006 im Artikel „Verification of predicted alternatively spliced Wnt genes reveals two new splice variants (*CTNN B1* and *LRP5*) and altered *Axin-1* expression during tumour progression“ publiziert, Pospisil et al. 2006.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. PETER MICHAEL SCHLAG danke ich für die Möglichkeit in der Klinik für Chirurgie und chirurgische Onkologie an der Robert-Rössle-Klinik Berlin meine Dissertation zu schreiben, für die Bereitstellung des Laborplatzes sowie für die finanzielle Unterstützung während des Forschungssemesters.

Herrn PD Dr. rer. nat. WOLFGANG KEMMNER und Frau Dr. rer. nat. HEIKE POSPISIL möchte ich ganz herzlich für die freundliche Überlassung des Themas, hervorragende Betreuung und stets gezeigtes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und für die vielen die Arbeit begleitenden, wertvollen Hinweise und Anregungen danken.

Frau CLAUDIA RÖEFZAAD und Herrn CHRISTIAN ASTROSINI bin ich für die ausgezeichnete Einarbeitung in die Methodik und viele hilfreiche Ratschläge sehr dankbar.

Herrn STEFAN PIRSON und Herrn ALEXANDER HERRMANN aus der AG Bioinformatik von Prof. Reich, möchte ich für die computergestützten Vorarbeiten bei der Auswahl von Kandidatengenomen danken.

Frau SABINE GRIGULL, Frau GUDRUN KOCH, Frau URSULA KLAMM, Frau ANNETT KRAMER und Herrn Dr. med. WOLFGANG HAENSCH bin ich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, sowie für viele Tipps und Tricks beim Experimentieren sehr dankbar.

Schließlich bedanke ich mich ganz herzlich bei meinem Partner ALEXANDER HERRMANN und meinen ELTERN für ihre Unterstützung und ihre stets unermüdliche Motivation vor allem in schwierigen Phasen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Historischer Hintergrund und Einordnung des Themas	1
1.2	Kolorektales Karzinom	1
1.2.1	Epidemiologie	1
1.2.2	Ätiologie	2
1.2.3	Molekularbiologische Veränderungen	3
1.3	Wnt-Signalweg	5
1.3.1	Hauptaufgaben im Zellstoffwechsel	5
1.3.2	Mechanismus	6
1.3.3	Wichtige Komponenten und Targetgene	7
1.3.3.1	Wnts	7
1.3.3.2	Frizzled	8
1.3.3.3	LRP5/LRP6	9
1.3.3.4	Dishevelled	9
1.3.3.5	Axin	10
1.3.3.6	APC	10
1.3.3.7	GSK3 β	10
1.3.3.8	CK1A	11
1.3.3.9	β -Catenin / CTNNB1	11
1.3.3.10	T-Cell-Faktor (TCF) / Lymphoid-Enhancer-Faktor (LEF)	12
1.3.3.11	CtBP1	12
1.3.3.12	Targetgene	12
1.3.4	Wnt-Pathway und kolorektales Karzinom	13
1.4	Spleißen	14
1.4.1	Posttranskriptionale Modifikation	14
1.4.2	Mechanismus des Spleißens	14
1.4.2.1	Introns	15
1.4.2.2	Spleißprozess	15
1.4.2.3	Kontrolle des Spleißprozesses	16
1.4.3	Alternatives Spleißen	17
1.4.4	Alternatives Spleißen und die Tumorgenese	19
1.4.5	Identifizierung alternativer Spleißtranskripte	20

1.5	Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Chemikalien und Enzyme	22
2.1.2	Lösungen und Puffer	23
2.1.3	Molekularbiologische Kits	23
2.1.4	Primerdesign	24
2.1.5	Zelllinien	25
2.1.6	Gewebeproben von Patienten	25
2.1.7	Geräte	27
2.2	Methoden	27
2.2.1	Bioinformatische Analysen als Basis für die anschließenden Experimente	27
2.2.1.1	EASED (Extended Alternatively spliced EST-Database)	27
2.2.1.2	Auswahlkriterien für relevante EST-Sequenzen	28
2.2.1.3	Sonstige Datenbanken und Programme	28
2.2.2	Anfertigung der Kryoschnitte	30
2.2.3	RNA-Extraktion	30
2.2.4	Konzentrationsbestimmung der RNA	31
2.2.5	One Step RT-PCR	31
2.2.6	cDNA-Synthese durch reverse Transkription	32
2.2.7	Polymerase-Kettenreaktion	33
2.2.7.1	Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion	33
2.2.7.2	β -Actin-PCR	34
2.2.7.3	PCR als Expressionstest für putative Spleißformen	35
2.2.8	Agarosegelelektrophorese	37
2.2.9	Sequenzierung	38
2.2.10	Real-Time PCR	39
2.2.10.1	Grundprinzip der Real-Time PCR	39
2.2.10.2	Real-Time PCR für Axin	40
2.2.10.3	Auswertung der Real-Time PCR für Axin mittels relativer Quantifizierung nach der vergleichenden CT-Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)	43

2.2.10.4	Grundlagen zur Berechnung der relativen Expressionsmenge einer Zielsequenz	44
2.2.11	Datenverarbeitung und Statistik	46
3	Ergebnisse	47
3.1	β-Catenin (CTNNB1)	47
3.2	CtBP1	50
3.2.1	CtBP1 (1), erste Spleißvariation	50
3.2.2	CtBP1 (2), zweite Spleißvariation	52
3.3	CK1A1	53
3.4	GSK3β	55
3.5	LRP5	56
3.6	Axin1	59
4	Diskussion	65
4.1	Evaluation der bioinformatischen Spleißstellen-Vorhersage	65
4.1.1	Bewertung der Realisierbarkeit der Spleißstellen-Vorhersage	65
4.1.2	Fehlende Expressionsunterschiede zwischen Tumor und gesunder Mucosa und Problematik der EST-Qualität	65
4.2	Problematik der Methoden	66
4.2.1	RNA-Qualität	66
4.2.2	Aussagekraft der RT-PCR	67
4.2.3	Probleme bei der Durchführung der Real-Time-RT-PCR	68
4.3	Mögliche Rolle alternativer Spleißprodukte im Wnt-Pathway und Zellstoffwechsel	69
4.3.1	CTNNB1	70
4.3.2	CtBP1	71
4.3.3	CK1A1	72
4.3.4	GSK3β	73
4.3.5	LRP5	74
4.3.6	Axin1	75
4.4	Ausblick	77
5	Literaturverzeichnis	78
6	Abkürzungen	87
7	Anhang	90

1 Einleitung

1.1 Historischer Hintergrund und Einordnung des Themas

Kolorektale Karzinome sind die häufigsten Tumore des Gastrointestinaltraktes und sie gelten als die zweithäufigsten zum Tod führende Tumorerkrankungen in Deutschland [76]. Das Verständnis der Biologie der Tumorprogression könnte Wege zur Entwicklung neuer diagnostischer Tests, sowie neuer Therapiemöglichkeiten eröffnen. Spleißprozesse spielen möglicherweise eine große Rolle in der Karzinogenese. Mit der Genomschlüsselung von ca. 20.000 - 25.000 humanen Genen [40] und mehr als 100.000 dazugehörenden Proteinen, wurde der Beteiligung des alternativen Spleißens an der Entstehung der Genomkomplexität und der Diversität mehr Bedeutung zugesprochen, als früher geschätzt. Noch 1994 ging man davon aus, dass nur 5% aller humanen Gene alternativ gespleißt werden [79]. Nach der Genomschlüsselung wurden 40 - 60% Gene mit alternativen Transkripten geschätzt [56]. Heute sind es sogar 80% der 25.000 humaner Gene [54].

In dieser Arbeit werden Gene des Wnt-Pathways, welche während der Entwicklung und Tumorprogression aktiv sind, auf alternative Spleißereignisse untersucht. Die Beteiligung der Wnt-Komponenten an der intestinalen Tumorigenese ist seit Entdeckung des APC-Gens als sicher anzunehmen. Spleißformen der Wnt-Schlüsselmoleküle, die sich besonders kritisch während der Kolonkarzinomprogression verhalten, können als potentielle biologische Marker fungieren.

1.2 Kolorektales Karzinom

1.2.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom nimmt als maligne Erkrankung weltweit zu und seine jährliche Inzidenz in Europa liegt bei ca. 30 pro 100.000. Meist betreffen Karzinome das linke Kolon, während maligne Entartungen im rechten Kolon besonders oft bei erblicher Prädisposition beobachtet werden. Mehr als 50% der Allgemeinbevölkerung entwickelt bis zum 70. Lebensjahr adenomatöse Polypen, aus denen sich Karzinome entwickeln können. Nur 5-15% der Malignome werden durch genetische Vorbelastung hervorgerufen [19].

1.2.2 Ätiologie

Genetische Faktoren spielen in der Ätiologie des kolorektalen Karzinoms eine Rolle. Als obligate Präkanzerose gilt die Familiäre Adenomatöse Polypose (FAP), aus der 1% der kolorektalen Karzinome entsteht. Durch das betroffene *APC*-Gen auf dem Chromosom 5 wird die Kommunikation mit anderen Zellen gestört und führt zu multiplen Polypen im Dickdarm mit hohem Entartungsrisiko. Andere Beispiele für polypöse Erkrankungen sind das Peutz-Jeghers-Syndrom, die familiäre juvenile Polyposis und das Cowden-Syndrom. Klinisch lassen sich polypöses von dem nichtpolypösen Kolonkarzinom, dem so genannten LYNCH-Syndrom oder HNPCC (engl. hereditary non-polyposis colorectal cancer) unterscheiden. Dieses Syndrom wurde 1913 von Alfred Warthin beschrieben und unterliegt einer autosomal-dominanten Vererbung. Es wird in 1-3% der Karzinomfälle beobachtet [16]. Patienten mit HNPCC weisen eine erhöhte Tendenz auf, Karzinome bereits vor dem 40. Lebensjahr zu entwickeln. Zur Diagnosestellung verhelfen die Amsterdamkriterien: Erstdiagnose vor dem 50. Lebensjahr, Kolonkarzinom in mindestens zwei Generationen und bei mehr als drei Verwandten, pathologischer Ausschluss der FAP. Im HNPCC können mehrere DNA-Mismatch-Reparaturgene defekt sein, die genauer im nächsten Abschnitt beschrieben werden ([19], [35]).

Eine Erkrankung am kolorektalen Karzinom ist in Afrika, Asien und Südamerika eher ungewöhnlich, so dass unterschiedliche Ernährungsfaktoren seit langem für dessen Entstehung verantwortlich gemacht werden [19]. Die Korrelation von Ernährungsgewohnheiten mit dem Auftreten von Kolonkarzinomen wurden mehrmals in unterschiedlichen Studien untersucht. Die Ergebnisse wurden von Wakai und Kollegen nach Fall-Kontroll-Studien in einem japanischen Kollektiv mit europäischen und amerikanischen Daten verglichen. Wakei beschreibt, dass bei Untersuchung diätetischer Maßnahmen grundsätzlich zwischen Kolon- und Rektumkarzinom unterschieden werden muss. So scheint die Einnahme von Kalzium einen protektiven Effekt auf das Kolonkarzinom auszuüben. Für das Vorbeugen der Malignome des Rektums ist der Konsum von beta-Carotin aus gelbem und grünem Gemüse sowie fleischarme Ernährung entscheidend. Eine erhöhte Kohlenhydratzufuhr korreliert positiv mit erhöhtem Risiko für rektale Karzinome und das besonders bei Frauen. Die Assoziation zwischen geringem Fasergehalt der Nahrung und erhöhter Karzinomentstehung konnte nicht bestätigt werden [92].

Eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung kolorektaler Karzinome ist bei folgenden Risikoerkrankungen gegeben: bei anderen kolorektalen Malignomen und Adenomen, bei langjährigen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (besonders Colitis ulcerosa), nach Ureterosigmoidostomie, bei Karzinomen von Mamma, Ovar und Corpus Uteri sowie bei Schistomiasis [35].

1.2.3 Molekularbiologische Veränderungen

Die Identifizierung und Charakterisierung von genetischen Veränderungen hat in den letzten Jahren entscheidend zum Verständnis maligner Transformationsprozesse beigetragen. Die Veränderungen umfassen Deletionen, Rearrangements und Mutationen, die zur Aktivierung oder Hemmung bestimmter Zielgene führen.

Meist lassen sich die Zielgene in zwei wichtige Klassen unterteilen, in Onkogene und Tumorsuppressor-Gene. Onkogene aktivieren oder hemmen Gene deren Produkte das Gleichgewicht im Zellwachstum aufrechterhalten. Die Produkte dieser Gene umfassen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Signalübermittlungsmoleküle, Transduktionsfaktoren, Tyrosinkinase sowie Transkriptionsregulatoren. Tumorsuppressor-Gene produzieren meist negative nukleare Regulatorproteine wie z.B. *c-myc* und *ras*. Zusätzlich können in Karzinomen auch MMR-Gene (engl. *Mismatch Repair*) wie *hMSH2* und *hMLH1* verändert sein, die für die ordnungsgemäße Reparatur der DNA durch Erkennen und Korrektur von fehlgepaarten Basen sorgen.

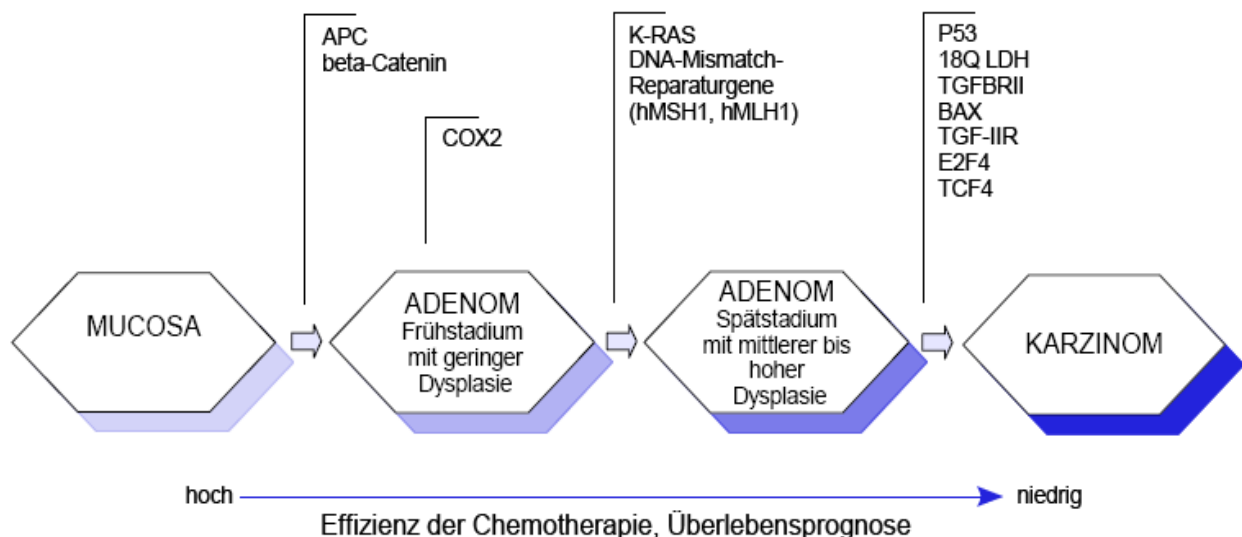


Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz mit typischen genetischen Veränderungen nach ([25], [83]).

Im intestinalen Gewebe korrelieren die genetischen Veränderungen zeitkritisch mit der Tumorprogression sowie mit der Prognose der Erkrankung. Das spricht dafür, dass die Progression von der normalen gesunden Mucosa über ein Adenom zum Karzinom durch die Anhäufung genetischer Alterationen verläuft (Abb. 1).

Am Übergang von gesunder Mucosa zum früheren Adenom sind vor allem Mutationen im *APC* oder/und *β-Catenin* beteiligt. Besonders dem *APC* wird die Gatekeeper-Funktion zugeschrieben. Funktion und Bedeutung beider Moleküle im Zellstoffwechsel werden im folgenden Abschnitt (1.3 Wnt-Signalweg) dargestellt. Im gebildeten Polypen erfolgt meist eine erhöhte Produktion und Aktivität der Cyclooxygenase-2 (COX-2), die die Konversion von Arachidonsäure zu Prostaglandinen katalysiert. Überexpression an COX-2 kann über den Transkriptionsfaktor NF-kappaB antiapoptotische Effekte auslösen ([3], [96]). Die Gabe von NSAID (*non-steroidal anti-inflammatory drugs* z.B. Sulindac oder Celecoxib) führt zur Reduktion der Zahl und Größe der Polypen und wird als möglicher Therapieansatz untersucht ([3], [70]).

Weiterhin folgen Mutationen in der DNA-Mismatch-Reparatur. Es sind mehr als 200 humane *MSH*-Gene bekannt, die erstmals bei Patienten mit LYNCH-Syndrom identifiziert wurden. Ein Mangel an intakten *MMR*-Genen führt zum Verlust der Mikrosatelliten-Stabilität mit folglich erhöhter Frequenz an Punktmutationen und Frameshifts [83]. Mikrosatelliten sind repetetive, hoch konservierte Di-, Tri- oder Tetranukleotidsequenzen (z. B. (A)₄₀, (CA)₂₄), die über das gesamte Genom verteilt vorkommen und aufgrund ihrer interindividuellen Variabilität breite molekulargenetische Anwendung finden. Die DNA-Polymerase ist besonders in diesen repetitiven Bereichen und bei Mangel an *MMR*-Genen für Fehler im Baseneinbau anfällig [33].

K-Ras-Mutationen werden bei mehr als 50% der Patienten mit Kolonkarzinom beobachtet und lassen sich mit der PCR viel früher als die während der Endoskopie sichtbaren tumorverdächtigen Läsionen feststellen. Ras-Proteine sind im Bereich der inneren Membran lokalisiert und können durch Mutationen in ihren aktiven Zustand überführt werden. So interagieren Ras-Proteine mit mehreren Effektoren. Studien haben gezeigt, dass K-Ras-positive Kolontumoren häufig mit Rezidiven und Chemotherapie-Resistenz assoziiert sind [76].

Im späten Progressionsstadium und verbunden mit der Invasion des Tumors kommen Fehler in p53, TGF-beta II und seinem Rezeptor II sowie im

Transkriptionsfaktor TCF-4 hinzu. p53 ist ein Tumorsuppressorgen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17. Seine Targetgene kontrollieren den Ablauf vom Zellzyklus und Apoptose, wirken dem genotoxischen zellulären Stress wie z.B. bei DNA-Schäden, Hypoxie und Onkogenaktivierung durch Viren, entgegen. Seiner Funktion geht p53 nach, indem es spezifisch, wahrscheinlich im Bereich seiner COOH-Region, an bestimmte DNA-Sequenzen bindet und die Transkription aktiviert. Posttranslationelle Veränderungen am COOH-Terminus von p53 durch Glycosylierung, Phosphorylierung oder Acetylierung verringern seine sequenzspezifische DNA-Bindung [65]. TGF-beta inhibiert physiologischerweise das Wachstum von Zellen. Die TGF-beta-abhängige Wachstumskontrolle ist in vielen Tumoren verloren gegangen. Defekte in Komponenten seines Signalweges (z.B. TGF-beta, TGF-beta-RII, SMAD2 und SMAD4) begünstigen Tumorinvasions- und Metastasierungsprozesse unter anderem durch Gefäßneubildungen.

Für den Prozess der Karzinomentstehung und seine Prognose ist nicht der zeitliche Übergang aus den Präkarzinosen, sondern vielmehr die Kombination an genetischen Defekten und die klonale Selektion der genetisch veränderten Zelle entscheidend.

1.3 Wnt-Signalweg

1.3.1 Hauptaufgaben im Zellstoffwechsel

In dieser Arbeit wird die Expression von alternativen Spleißformen in nicht-neoplastischer Mucosa und im Tumorgewebe untersucht. Alle acht Spleißereignisse, die unten beschrieben und über die diskutiert wird, sind den Genen aus dem Wnt-Pathway zugehörend.

Der Wnt-Pathway ist ein komplexer Signalweg, der vor allem während der embryonalen Entwicklung von Bedeutung ist. Auch während der Tumorentwicklung wird seinen Komponenten eine wichtige Rolle zugeteilt.

Der Wnt-Pathway hat in der Zelle drei wesentliche Aufgaben:

- Der „Klassische Weg“ (Wnt1-Klasse: Wnt1, 3a, 8a, 8b) aktiviert die Transkription von Targetgenen durch Stabilisierung von β -Catenin im Zellkern. Dieser Weg ist für die Festlegung der embryonalen Achse entscheidend.
- Eine zweite Funktion der Wnt-Kaskade führt über Interaktionen mit anderen Pathways wie JNK und RhoA zur Aufrechthaltung der Zellpolarität durch

Organisation des Zytoskeletts.

- Drittens kann die wnt5A-Klasse (wnt 4, 5a, 11) den Ca^{2+} -Signalweg aktivieren (z.B. Enzyme Calmodulinkinase, Proteinkinase C, Calcineurinphosphatase und Transkriptionsfaktor NFAT). Der Ca^{2+} -Pathway kann dem „klassischen Wnt-Pathway“ entgegenwirken, wie dies geschieht, ist nicht bekannt [51]. Vermutet wird, dass er auf zwei unterschiedlichen Niveaus mit dem klassischen β -Catenin - Weg interagiert. Einerseits phosphoryliert die Proteinkinase C das Gen *Dishevelled*, einen positiven Mediator im „klassischen Wnt-Pathway“. Andererseits ist die Calmodulinkinase II wohl in der Lage, die Proteine der TCF/LEF-Familie direkt zu phosphorylieren und so zu inaktivieren. Beides führt dazu, dass die Transkription von β -Catenin Targetgenen verhindert wird [48].

1.3.2 Mechanismus

Im Detail wird hier der „klassische“ Wnt-Pathway dargestellt. Dieser am meisten untersuchte Pfad des Wnt-Signalweges kontrolliert im Zellkern die Gentranskription über die Bindung von β -Catenin an die TCF/LEF-Proteine.

Dabei müssen zwei Möglichkeiten nebeneinander betrachtet werden, zum einen die Kaskade in Abwesenheit von Wnt an seinem Rezeptor und zum anderen nach Wnt-Andockung. Eine schematische Gegenüberstellung bietet die oben stehende Abbildung (Abb. 2):

- A: Fehlt in der Zelle das Wnt-Signal, so ist der Weg zum Zellkern verschlossen. Die Enzyme GSK3 β und CK1 α phosphorylieren β -Catenin. Das phosphorylierte β -Catenin bindet an ein Multiprotein namens β TrCP (β -Transductin-repeat-Containing Protein), welches von APC, Axin, GSK3 β und CK gebildet wird. β -Catenin wird modifiziert und geht eine kovalente Bindung mit dem kleinen Protein Ubiquitin ein. Somit steht seinem Abbau im Proteasom nichts im Wege.
- B: Wnt-Moleküle können an sieben verschiedenen Transmembran-Rezeptoren, den Frizzled, binden. Die LRP5 und LRP6 wirken als essentielle Corezeptoren. Die Bindung von Wnt an Liganden veranlasst Dishevelled, die Phosphorylierung von β -Catenin zu blockieren. Auf bisher noch unbekannt Weise kommt es zum Zerfall des β TrCP-Multiproteinkomplexes. Der Abbau von β -Catenin im Proteasom ist nicht mehr möglich, und es sammelt sich im Zytoplasma an. Das akkumulierte β -Catenin wandert in den Zellkern. Dort findet es TCF oder LEF als

Bindungspartner. Der β -Catenin / TCF-Komplex bindet an die DNA und setzt die Transkription von Wnt-Targetgenen in Gang. Wnt-Targetgene haben regulatorische Aufgaben während der Zellproliferation, Entwicklung und sind auch in die Tumorprogression integriert ([51], [59], [66]).

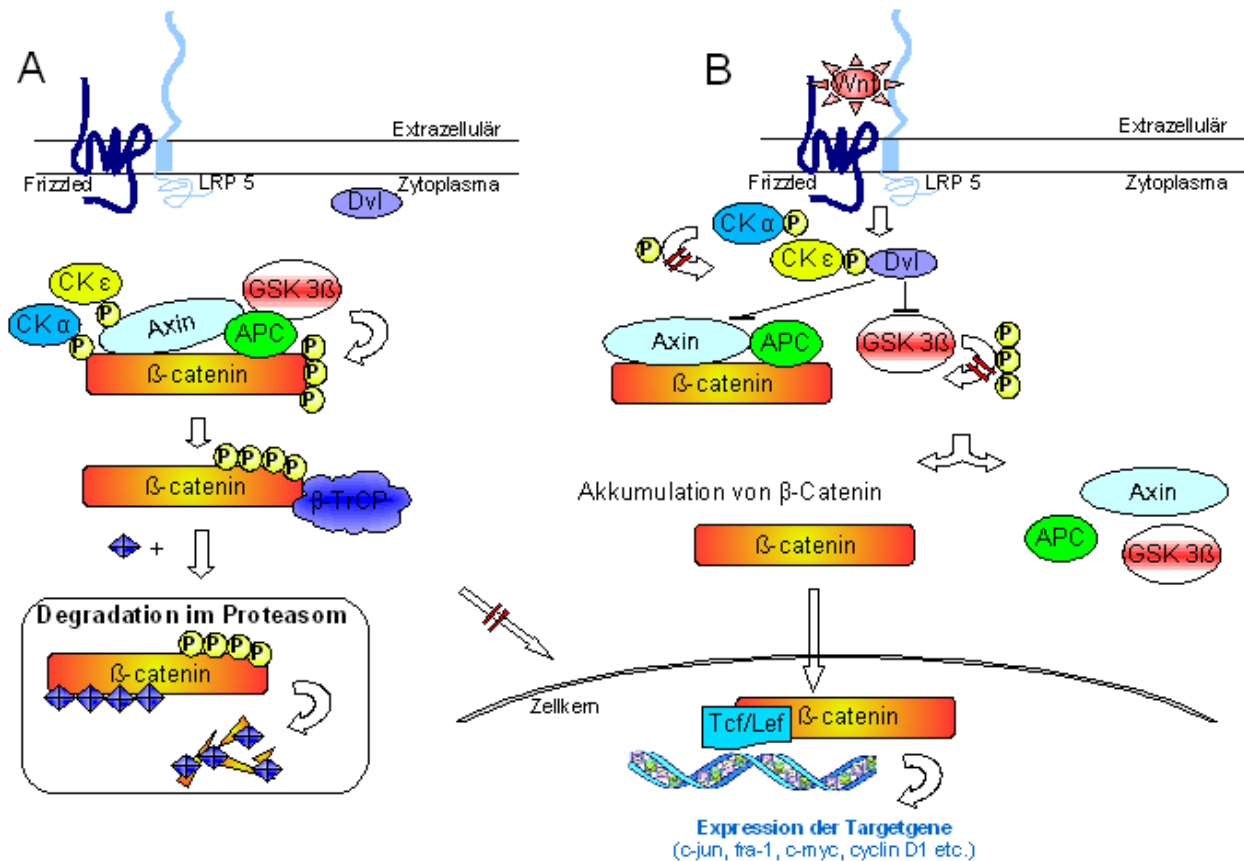


Abbildung 2: Wnt-Signalkaskade in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von Wnt. Die Abbildung ist modifiziert nach A. Kikuchi [42].

1.3.3 Wichtige Komponenten und Targetgene

Die unten dargestellte Abb. 3 bietet eine Übersicht über zahlreiche Moleküle des klassischen Wnt-Signalweges. Die in dieser Arbeit näher erforschten Gene sind rot hervorgehoben. Im folgenden wird auf die einzelnen Moleküle der Signalkaskade eingegangen.

1.3.3.1 Wnts

Wnt-Proteine bilden eine Familie von zurzeit 19 bekannten, hoch konservierten sekretorischen Glycoproteinen, die die Signalübermittlung während der Embryogenese und Kanzerogenese steuern. Die ersten identifizierten Mitglieder der Wnt-Familie waren

das Maus-Gen *int-1* und das am besten untersuchte Drosophila-Gen *wingless*. Die Kombination aus beiden Namen ergab die Bezeichnung *wnt* [51]. Die meisten Wnts weisen bis zu 35% Identität in der Aminosäuresequenz auf. Sie alle sind unlöslich und haben 23-24 Cystein-Reste, welche ihnen wahrscheinlich die Ausbildung von mehreren intramolekularen Disulfidbrücken erlauben.

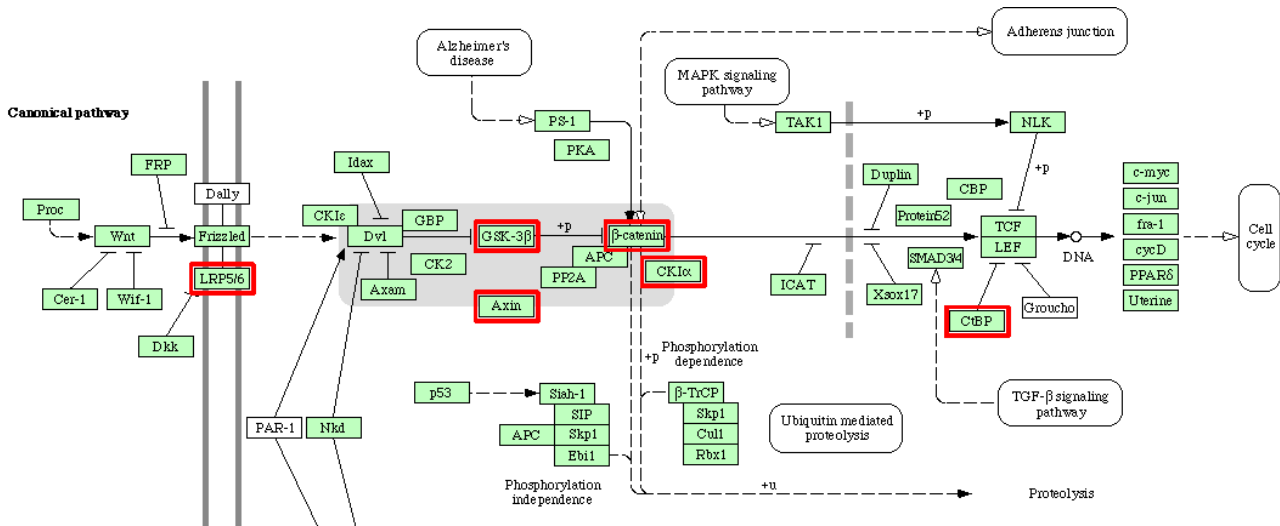


Abbildung 3: Wnt-Pathway. Die Abbildung stammt von der KEGG database [97]. Die in dieser Arbeit untersuchten Gene sind rot umrandet.

Wnts werden von den sekretorischen Zellen gebildet und breiten sich im Gewebe aus, bis sie ihre Zielzelle erreichen. Über die Ausbreitung der Wnt-Proteine existieren drei Theorien, wobei Diffusion und Endozytose der zellulären Projektion vorgezogen werden. Wnts binden sich an die Glycosaminoglukane der extrazellulären Matrix und somit auch fest an die Zelloberfläche. Das Wnt-Signal braucht zwei unterschiedliche Transmembran-Proteine, zum einen den schlangenartigen Frizzled-Rezeptor und zum anderen den Rezeptor aus der Familie der LRP (Low density lipoprotein related proteins) ([55], [77]). Unterschiedliche Wnt-Klassen können unterschiedlich stark die einzelnen Wnt-Signalkaskaden auslösen. Beispiele sind im Abschnitt 1.3.1 „Hauptaufgaben im Zellstoffwechsel“ angeführt.

1.3.3.2 Frizzled

An den Zielzellen assoziieren die Wnt-Liganden mit den sieben Arten der Rezeptoren Frizzled. Der Frizzled-Rezeptor besitzt eine cysteinreiche Domäne (CRD) zur Bindung von Wnt, sieben Transmembran-Domänen mit G-Protein-Rezeptoren und eine kurze cytoplasmatische Domäne.

1.3.3.3 LRP5/LRP6

LRP-Moleküle zeigen eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem LDL-Rezeptor und sind in den Lipoprotein- und auch in den Cholesterinstoffwechsel eingebunden. LRP5 reguliert negativ die adipogenetischen Transkriptionsfaktoren. Es bindet Apolipoprotein E, welches genetisch mit Hyperlipoproteinämie und Diabetes korreliert, und beeinflusst den hepatischen Abbau von Chylomikronenremnants [27].

Zu LRP-Liganden zählen mehr als 30 Moleküle, die an den EGF-Wiederholungen der extrazellulären Domäne binden ([34], [84]). Die extrazelluläre Domäne ist somit als Aktivator anzusehen. Im Wnt-Pathway ist LRP5 als Corezeptor an der distalen Fortleitung des Wnt-Signals beteiligt. Alle LRP5/6-Moleküle besitzen eine intrazelluläre (cytoplasmatische) und eine Transmembran-Domäne. In der cytoplasmatischen Domäne können bis zu fünf sich wiederholende PPP(S/T)P-Motive vorkommen. Nach dem Wnt-Signal wird der PPPSP am Serin phosphoryliert und kann dann das Gerüstprotein Axin binden [86]. Für die Phosphorylierung des Serins ist wahrscheinlich GSK3 β verantwortlich. Die Axin-LRP-Interaktion ist wahrscheinlich für die LEF induzierte Transkription zuständig und andererseits unbedingt nötig für den Abbau von Axin ([52], [63]). Diese Tatsachen und die Ergebnisse von Brennan et al. lassen den LRP5 als einen möglichen Onkogen-Kandidaten ansehen [6].

Interessant ist außerdem, dass die Bindung von Wnt an LRP5 die glucoseinduzierte Insulinfreisetzung stimuliert. LRP5 trägt zusammen mit Wnts zur Aufrechterhaltung der normalen β -Zellfunktion in Pancreas bei. Effekte an GSK3 β sind sowohl durch Wnt als auch durch Insulin zu beobachten und führen zur GSK3 β -Inaktivierung [27].

1.3.3.4 Dishevelled

Die Verbindung von Rezeptoren zu den restlichen Komponenten des Wnt-Pathways ist wenig erforscht. Sicher ist, dass Dishevelled ein positiver Mediator des Prozesses ist und sowohl den „klassischen Wnt-Weg“ als auch die Zellpolarität beeinflusst. Über seine N-terminale DIX-Domäne interagiert es mit der DIX-Domäne des Axins. Die Dishevelled-DIX-Domäne ist auch für seine Interaktionen mit Aktinfilamenten und Vesikelmembranen nötig. Über seine DEP-Domäne kann Dishevelled den JNK(Stress)-Signalweg aktivieren. Dishevelled hat eine große Anzahl an Partnern, unter anderem scheinen auch Kinasen seine Funktion zu steuern. Die Caseinkinase 1 phosphoryliert die Moleküldomäne PDZ und führt über Zerfall des β TrCP-Komplexes zur Stabilisierung von β -Catenin. Wie diese andererseits auch als Primerkinase für die

GSK3 β zum Abbau des β -Catenins beiträgt, ist unklar. Die Caseinkinase 2 aktiviert Dishevelled in Folge einer Wnt-Frizzled-Bindung [51].

1.3.3.5 Axin

Axin wurde entdeckt als Produkt des Maus-Gens „*fused*“, welches als kritischer Faktor die Entwicklung der Körperachse während der Embryogenese steuert. Die Überexpression von *Axin* führt zur Achsenduplikation. Später wurde sein Effekt in der Regulation der β -Catenin-Konzentration entdeckt [73]. Axin enthält Bindungsdomänen für alle am β -Catenin-Abbau beteiligten essentialen Wnt-Komponenten und spielt somit in diesem Prozess die Schlüsselrolle. Axin steuert die Phosphorylierung von Serin/Threonin im β -Catenin, indem es einen Komplex mit APC und GSK3 β bildet. Als „Halteprotein“ spielt Axin den negativen Regulator im Wnt-Pathway. Strukturell besitzt Axin eine RGS-Domäne (regulator of G-protein-domain) für die APC-Bindung am N-Terminus, separate Bindungsstellen für β -Catenin, GSK3 β , CK1, Diversin, PP2A (Proteinphosphatase) im Zentrum des Moleküls und die DIX-Domäne zur Interaktion mit Dishevelled und einem anderen Axinprotein am C-Terminus [51].

1.3.3.6 APC

APC (Adenomatous Polyposis Coli) ist das häufigste in die Entstehung der Kolonkarzinome involvierte Tumorsuppressorgen. *APC*-Mutationen in Keimzellen führen zu einer dominant vererbten Erkrankung der Adenomatösen Polyposis Coli, einer obligaten Präkanzerose für das Kolonkarzinom. Es kodiert ein 300kDa großes Protein mit vielen einzelnen Domänen [15]. Es enthält mehrere Bindungsstellen für β -Catenin am N-Terminus und in der zentralen Region, zwei Domänen für die Assoziation mit Mikrotubuli und Axininteraktion. Außerdem wurden unterschiedliche nukleare Import- und Export-Signale in der *APC*-Struktur identifiziert. *APC* kann zwischen Zytoplasma und Zellkern pendeln. *APC* ist wie Axin ein negativer Regulator des Wnt-Pathways. Mutationen im *APC*-Molekül führen zur Stabilisierung von β -Catenin mit erhöhter Transkriptionsaktivität.

1.3.3.7 GSK3 β

GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) ist ein bekanntes Enzym des Glucose- und Insulinmetabolismus. Sie phosphoryliert mehr als 40 Proteine, unter anderem auch Transkriptionsfaktoren. Im Wnt-Signalweg ist sie als negativer Regulator anzusehen.

Direkte chemische Blockierung des Enzyms z.B. mit DMSO (Dimethyl Sulfoxid), Lithiumchlorid oder seiner Expression durch siRNA (small interfering RNA) beschleunigt die Proliferation der Krebszellen *in vitro* [78]. Die Phosphorylierung von β -Catenin wird durch deren Interaktion mit der Caseinkinase gesteuert.

1.3.3.8 CK1A

Die Mitglieder der CK1(Caseinkinase 1)-Familie sind evolutionär hoch konserviert und werden in vielen Eukaryonten - von Hefe bis zum Menschen - exprimiert. Mutationen sowie Deregulation der Expression und Aktivität von CK1 stehen mit verschiedenen Krankheitsbildern in Zusammenhang, z. B. bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson, Schlafrythmusstörungen sowie proliferativen Tumorerkrankungen [45]. Im Wnt-Signalling ist sie unentbehrlich für die Ubiquitinisation von β -Catenin. β -Catenin muss während seines Abbaus an vier Stellen phosphoryliert werden. Fällt nur eine Phosphorylierungsreaktion aus, so führt es zu einer nicht regulierbaren Stabilisierung von β -Catenin in Krebszellen [51]. Die entscheidende Kinasereaktion ist nicht GSK3 β -gesteuert und wird am Serin 45 im β -Catenin-Molekül von Caseinkinase 1A ermöglicht, was ihre Bedeutung als Primingkinase unterstreicht. Das Wissen über genauere Mechanismen der CK ist unvollständig, so dass man ihre Rolle im Wnt-Weg nicht eindeutig einordnen kann. Scheinbar kann sie sowohl hemmend über Axin-CK-Interaktion als auch fördernd über β -Catenin-Phosphorylierung in die β -Catenin Degradierung eingreifen.

1.3.3.9 β -Catenin / CTNNB1

β -Catenin ist das zentrale Molekül im Wnt-Pathway und gleichzeitig ein Onkogen. Zum einen aktiviert es zusammen mit TCF/LEF die Transkription und zum anderen ist es als strukturelles Adaptermolekül zwischen Cadherin und Actinfilamenten in die Zelladhäsion eingebunden [59]. Seine Konzentration und Lokalisation wird durch verschiedene Regulationsmechanismen bestimmt. Das Kerngehäuse des Proteins bilden zwölf so genannte Arm-Repeats. Sie wurden zuerst in *Drosophila* entdeckt und werden als *Armadillo* bezeichnet. In der Armadillo-Region binden Axin, APC, E-Cadherin und TCF. Das N-terminale Ende ist besonders kritisch für den Zerfall von β -Catenin. Hier liegen die Angriffsstellen für GSK3 β , CK1, β TrCP, aber auch die Bindungsstelle für α -Catenin. Mutationen im β -Catenin selbst oder in anderen Wnt-Komponenten können zu seiner Stabilisierung und Amplifikation der Wnt-Gene führen.

Ferner beeinflusst β -Catenin den Verlauf des Zellzyklus. Es akkumuliert während der S/G2-Phase und kann zum Zellzyklus-Abbruch und Apoptose führen [64].

1.3.3.10 T-Cell-Faktor (TCF) / Lymphoid-Enhancer-Faktor (LEF)

Im Zellkern assoziiert β -Catenin mit Transkriptionsfaktoren TCF/LEF. Alle Proteine dieser Familie enthalten eine HMG-Box (*high-mobility group*) aus mehr als 80 Aminosäuren, welche sequenzspezifisch an die DNA binden kann. Außer der Erkennung des richtigen DNA-Abschnitts ist die HMG-Box fähig, verschiedene Transkriptionsfaktoren zu binden, die als Aktivatoren oder Repressoren spezifischer Zielgene fungieren können. Da die TCF/LEF alleine keine Transkription auslösen können, benötigen sie Co-Aktivatoren, wie z.B. β -Catenin. In Abwesenheit des Wnt-Signals unterdrücken TCF/LEF das Ablesen der Wnt-Targetgene, indem sie mit einigen Co-Repressoren Komplexe eingehen. Zurzeit sind zwei solche Moleküle mit hemmenden Effekten auf TCF/LEF bekannt - Groucho, welches die Konfiguration des Chromatins beeinflusst, und die unten beschriebenen CtBPs [51].

1.3.3.11 CtBP1

C-terminal binding Proteine (CtBPs) wurden als Bindungspartner des Adenovirus E1A Onkoproteins entdeckt und später als mögliche Regulatoren der Transkription im Apoptoseprogramm beschrieben. CtBPs fungieren als transkriptionelle Co-Repressoren und fördern das Überleben der Zellen durch Hemmung der Expression unterschiedlicher proapoptotischer Gene [5]. Die CtBP-Familie umfasst vier Proteine: CtBP1, CtBP2, CtBP3 und RIBEYE. Sie enthalten nukleare Lokalisationssignale in ihrer Struktur, welche zu Akkumulation dieser Proteine im Zellkern führen. Die Moleküle können aber ihren Ort in der Zelle durch Wanderung zwischen Nukleus und Zytoplasma wechseln. CtBPs enthalten eine Bindungsstelle für NADH [91]. Im Wnt-Pathway hemmt CtBP die Signalübermittlung durch Bindung an TCF oder durch Verhinderung der Bindung von β -Catenin an TCF [22]. Seine hemmende Wirkung scheint von der Aktivität der Histon-Deazetylasen abhängig zu sein [89].

1.3.3.12 Targetgene

Momentan sind ca. 25 humane Targetgene des Wnt-Pathways dokumentiert, die meisten sind in die Kanzerogenese einbezogen und werden direkt über ihre Promotor vom TCF / β -Catenin-Komplex aktiviert. Hier werden nur einige Beispiele erläutert.

C-Myc und *Cyclin D* waren die ersten entdeckten β -Catenin-Zielgene, und beide sind

in den Kolonkarzinomen überexprimiert. *Cyclin D* ist unter normalen Bedingungen ein wichtiger Regulator des Zellzyklus´ und Bindungspartner der cyclin-abhängigen Kinasen Cdk4 und Cdk6 im G1-Stadium. C-Myc ist ein regulatorisches Protein während des Zellwachstums und der Apoptose [8].

Manche Wnt-Gene sind so interessant, weil sie parakrin das Zellwachstum modellieren. VEGF (vascular endothelial growth faktor) wirkt proangiogenetisch, fördert Metastasierung und korreliert mit schlechter Prognose im Kolonkarzinom [41]. Das sekretorische Peptid Gastrin ist ein weiteres direktes Produkt der TCF / β -Catenin-Aktivierung. Studien an APC-mutierten Mäusen mit erhöhter Gastrinproduktion zeigten eine verstärkte Neigung zur Bildung von Polypen, die entarten können [46].

Über C-Jun ist der Wnt-Transduktionsweg mit dem Apoptosekreislauf verknüpft.

Die Regulation der Expression von COX-2 (*Cyclooxygenase*) und *MDR-1* (*multidrug resistance-1-gene*) durch β -Catenin eröffnet die Möglichkeit zum therapeutischen Angriff z.B. mit NSAID (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*) oder TCF4-Antagonisten. COX-2 ist als proinflammatorisches Enzym für die Bildung von Prostaglandinen, Eiconasoiden und Leukotrienen bestens in der Medizin bekannt. Das COX-2-Produkt Prostaglandin 2 stimuliert das Wachstum von APC-mutierten Krebszellen, indem es Axin am Abbau des β -Catenins behindert [14]. Die Expression der *MDR*-Gene in den meisten Tumoren kann zur Resistenz gegenüber Chemotherapeutika führen [61].

1.3.4 Wnt-Pathway und kolorektales Karzinom

Im intestinalen Trakt ist die „klassische“ Wnt-Kaskade die treibende Kraft für die geregelte Proliferation und das Gleichgewicht unter den Epithelzellen [28]. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass β -Catenin in allen Entwicklungsstadien der Kolonkarzinome, einschließlich der Adenom-Karzinom-Sequenz, einbezogen ist. Die meisten Veränderungen im β -Catenin betreffen das Exon 3, welches die Aminosäuresequenz für den Phosphorylierungsangriff der GSK3 β kodiert. Unterschiedliche Studien haben demonstriert, dass *CTNNB1*-Mutationen in 50% aller Kolonkarzinome vorkommen. Die Überexpression seiner Targetgene *Cyclin D* und *Gastrin* wird bereits früh in der kolorektalen Karzinogenese beobachtet [61]. Die anderen Zielproteine wie CD44, Matrilysin und Plasminogen-Activator-Rezeptor scheinen spezifischer für die Tumorpheriferation als für ihre Initialisierung zu sein [42]. Aber auch Mutationen in anderen Wnt-Komponenten können zur Stabilisierung des β -

Catenins und zu erhöhter Transkription führen. Mutationen im Tumorsuppressorprotein APC lassen sich in 85% aller Kolonkarzinome bereits in früheren Stadien finden und sind andererseits mit der Adenomatösen Polyposis Coli assoziiert. Die Mutationsfrequenz von APC im HNPCC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*) liegt im Vergleich zu non-HNPCC niedriger, 21% versus 70% [51]. Defekte in den DNA Mismatch-Reparaturmechanismen hervorgerufen durch *Axin2*-Mutationen wurden im hepatozellulären und im kolorektalen Karzinom beobachtet [90]. Der Übergang vom benignen Polyp zum invasiven und metastasierenden Adenokarzinom umfasst mehrere genetische Veränderungen, von denen viele noch nicht genau charakterisiert sind.

1.4 Spleißen

1.4.1 Posttranskriptionale Modifikation

Spleißprozesse sind den im Zellkern stattfindenden pre-mRNA-Modifizierungen, dem Prozessieren, zuzuordnen. Das Prozessieren der pre-mRNA beginnt noch während der Transkription und umfasst drei Reaktionen, die das Überführen der pre-mRNA in die reife fertige mRNA steuern. Das sind Capping, Spleißen und Polyadenylierung. Alle diese Reaktionen werden von der RNA-Polymerase II koordiniert. In der pre-mRNA-Prozessierung spielt ihre C-terminale Domäne (CTD) die zentrale Rolle. Sie besteht aus 52-facher Wiederholung von jeweils sieben Aminosäuren (aa) und einer einmaligen Sequenz aus zehn Aminosäuren. Dabei scheint das 10 aa-Motiv am C-Terminus alle drei Reaktionsabläufe zu bestimmen, während der N-Terminus des Enzyms nur das Capping am 5'-Ende der mRNA katalysiert. Weiterhin scheint die Polymerase II selbständig die Intron-Exon-Grenzen erkennen zu können und die Verteilung von Spleiß- und Transkriptionsfaktoren im Zellkern zu bestimmen [47]. Der erst spät während der Prozessierung angefügte Poly-A-Terminus schützt die mRNA im Zytosol vor dem Abbau.

1.4.2 Mechanismus des Spleißens

Pre-mRNA-Spleißen ist ein essentieller, präziser Prozess, der im Anschluss an die Transkription einsetzt und noch vor der Translation abgeschlossen wird. Er umfasst das Entfernen der Introns aus der pre-mRNA und das Aneinanderreihen der Exons in der zum Export aus dem Kern bereiten reifen mRNA.

1.4.2.1 Introns

Die Intronextraktion wird durch den aus mehreren Komponenten bestehenden Spleißapparat vorgenommen. Für einen geordneten Spleißprozess ist die Intronstruktur entscheidend.

Die Introns variieren in ihrer Länge und Sequenz, enthalten aber immer vier funktionell wichtige Bestandteile:

- die 5´-Spleißstelle als *Acceptor site*,
- die 3´-Spleißstelle als *Donor site*,
- vor der 3´-Spleißstelle eine Polypyrimidin(U/C)-Sequenz,
- und etwas weiter upstream ein einzelnes Adenosin-Nukleotid innerhalb der so genannten *branch site* als zusätzliche Verzweigungsstelle (Abb. 4).

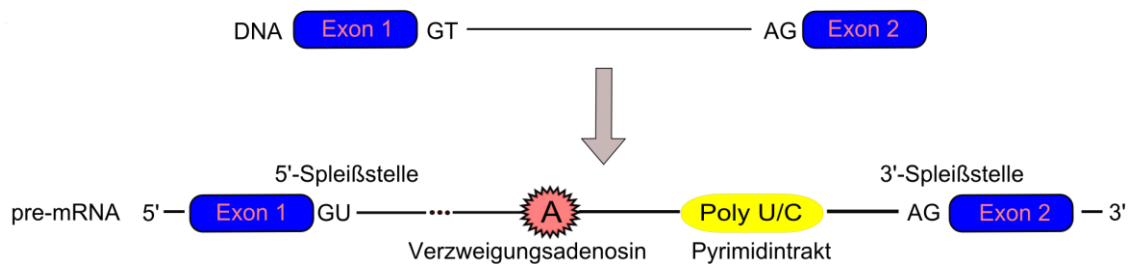


Abbildung 4: pre-mRNA-Sequenz mit dargestellten Exons als Kästchen und Introns als schwarze Linien.

99% der Introns bei Säugetieren weisen am 5'-Ende ein GU-Dinukleotid und am 3'-Ende eine AG-Sequenz auf. Um die Erkennung durch das Spleißosom zu erleichtern, existieren so genannte Hilfselemente wie *Exonic/Intronic Splicing Enhancers* (ESEs/ISEs) und *Exonic/Intronic Splicing Silencers* (ESS/ISS), an die sich unterschiedliche snRNP (*small nuclear Ribonucleoproteins*) und SR-Faktoren (*splicing regulation*) anlagern können. ESEs/ISEs unterstützen das Spleißosom-Andocken, während ESS/ISS dies behindern.

1.4.2.2 Spleißprozess

Komponenten der Spleißmaschinerie binden an die klassischen Spleißsequenzen und begünstigen den Aufbau des multimolekularen Spleißkomplexes, das sogenannte Spleißosom. Spleißosomen sind dynamische Strukturen. Sie werden speziell für jeden Spleißprozess aufgebaut und zerfallen dann wieder. Ein Spleißosom erfüllt zwei wesentliche Funktionen im Spleißprozess: die Erkennung der Exon-Intron-Grenzen und

die Katalyse von Reaktionen, wie dem Ausschneiden und Zusammenfügen der RNA-Sequenzen. Ein Spleißosom besteht aus fünf snRNPs (*small nuclear Ribonucleoproteins*) und über 100 weiteren Proteinen.

snRNPs enthalten bis zu 100-200 Nucleotide lange RNA-Komponenten mit vielen Uracil-Bausteinen. snRNAs werden in Subgruppen von U1 bis U6 unterteilt. Sie besitzen alle eine ausgeprägte Faltung in der Sekundärstruktur, wobei U4- und U6-snRNA nur gemeinsam in einem snRNP vorkommen und über Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft sind.

Im Initialstadium des Spleißens bindet ein U1-snRNP an die 5'-Spleißstelle und U2-snRNP an der *branch site*-Region durch die Interaktion der snRNA mit der pre-mRNA. Während dieser Paarung bleibt das Adenosin-Nukleotid der Verzweigungsstelle von der Bindung ausgeschlossen. Anschließend stellen auch die U5-snRNP und U4/U6-snRNP-Komplexe RNA-Kontakte her. Dies führt zum Zerfall des U4/U6-Komplexes, wobei die jetzt frei werdenden RNA-Sequenzen der U6-snRNA neue Basenbindungen mit U2-snRNA und der 5'-Spleißstelle des pre-mRNA-Introns unter Verdrängung des U1-snRNPs eingehen. Die U5-snRNA koordiniert die Zusammenführung der Exons. Somit liegen alle für die Transester-Reaktionen des Spleißprozesses wichtigen funktionellen Gruppen, die Intron-Exon-Grenzen und der Verzweigungspunkt räumlich beieinander.

Die Transester-Reaktion umfasst zwei Teilreaktionen. Bei der ersten wird 5'-Spleißstelle durch einen nukleophilen Angriff der 2'-OH-Gruppe des *branch site-A*-Nukleotids gespalten. Das nun freie 5'-Ende des Introns verbindet sich kovalent über eine 5'-2'-Phosphodiester-Bindung mit dem *branch site-A*-Nukleotid, wobei sich ein Ring (engl. *ariat*: Lasso) formt. Bei der zweiten Reaktion spaltet das entstandene freie 3'-Ende des 5'-Exons die RNA an der 3'-*splice site*, und die Phosphodiesterbindung der 3'-*splice site* wird auf das freie 3'-Ende des 5'-Exons übertragen. Das auf diese Weise herausgeschnittene Intron wird wieder linearisiert und rasch degradiert ([7], [44], [80]).

1.4.2.3 Kontrolle des Spleißprozesses

Zahlreiche Spleißregulatoren katalysieren diese chemischen Reaktionen. So sind die oben beschriebenen snRNPs sehr früh an der Bildung von Spleißosomen beteiligt. Aber auch Moleküle, welche nicht unbedingt Spleißosom-Bestandteile sind, steuern den geregelten Ablauf.

So wurden in Hefen mehr als 20 verschiedene Spleißfaktoren identifiziert und als

pRP-Proteine (*precursor RNA processing*) bezeichnet. Diese Proteingruppe ähnelt den RNA-Helicasen in ihrer Struktur und sorgt für Auflösung und Wiederaufbau der RNA-Doppelstrang-Strukturen während des Spleißprozesses.

SR-Proteine (*splicing regulatory*) bilden eine weitere Gruppe der Spleißfaktoren. Sie sind durch RRM (*RNA recognition motive*) für die RNA-Erkennung und RS-Domänen für die Proteininteraktionen gekennzeichnet [13]. So kommen diese z.B. im U2AF (*U2-snRNP auxillary factor*) vor. U2AF bereitet die Bindungsstelle für das U2-snRNP an der 3'-splice site vor, indem seine zwei Untereinheiten zwischen dieser und der Verzweigungsstelle binden. Andererseits kann U2AF von dem PTB (*pyrimidin tract binding protein*), einem Negativregulator des Spleißens, kompetitiv gebunden und inaktiviert werden.

Weiterhin spielen hnRNP-Komplexe (*heterogenes nukleares Ribonucleoprotein*) eine wichtige Rolle für den Spleißprozess. hnRNPs binden die neu entstandene RNA bereits bei der Transkription, damit diese nicht frei im Zellkern vorliegt und abgebaut wird. Sie binden die pre-mRNA spezifisch, verpacken diese und vermitteln ihre Vor- oder Zubereitung zum Spleißprozess. Einige von ihnen beteiligen sich an der Polyadenylierung oder an dem Transport der reifen mRNA ins Zytosol [44].

Untersuchungen *in vitro* haben gezeigt, dass die korrekte Basenpaarung zwischen Nukleotiden der 5'-Spleißseite und der U1-snRNA entscheidend für ein korrektes Erkennen der Spleißseite durch U1-snRNP ist. Weiterhin ist aber die U1-snRNP auch fähig in Abwesenheit der 5'-U1-snRNA die korrekte 5'-Spleißstelle in der pre-mRNA durch ihre U1-C-Untereinheit auszuwählen. Andererseits aber kann die Überexpression anderer SR-Faktoren *in vitro* das Fehlen des U1-snRNP kompensieren. Das lässt vermuten, dass der Spleißprozess auch erfolgen kann, wenn seine Schlüsselkomponenten fehlen [9].

1.4.3 Alternatives Spleißen

Während beim konstitutiven Spleißen die Introns nach einem festem Schema aus der pre-mRNA herausgetrennt werden (angefangen mit dem ersten 5'-wärts gelegenen Intron, weiter bis zum zweiten und dann weiter bis zum letzten, 3'-seitigen Intron), geschieht dies beim alternativen, auch differentiellen oder auch reguliertes Spleißen genannt, nicht nach dieser exakten Reihenfolge. Daher kann eine pre-mRNA unterschiedlich gespleißt werden und damit für unterschiedliche, wenn auch ähnliche

Proteine, kodieren. Alternatives Spleißen bietet viele Kombinationsmöglichkeiten für die entstehende mRNA-Sequenz [29]. Folgende Formen werden unterschieden (Abb. 5):

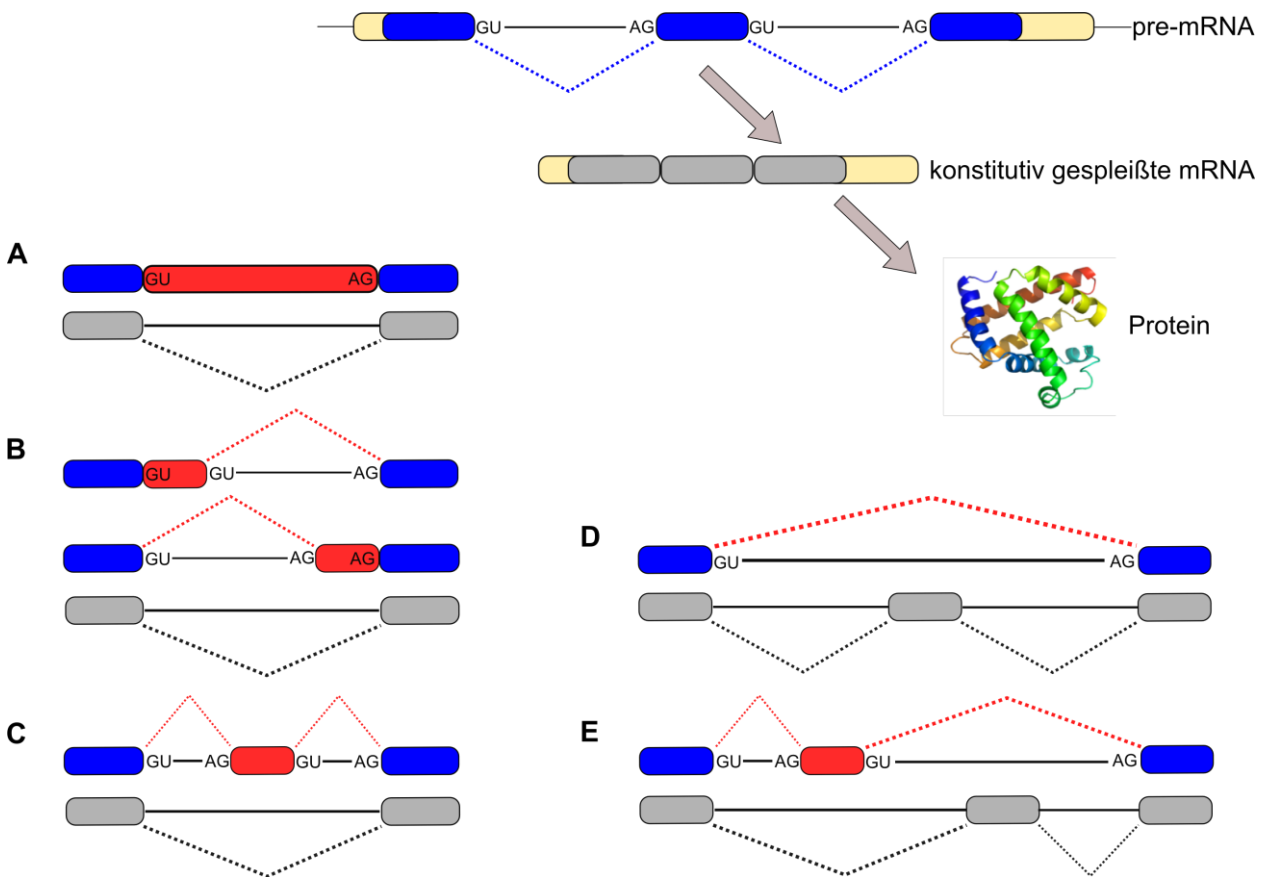


Abbildung 5: Alternatives Spleißen, Spleißmuster. Grau ist die konstitutive und farbig die alternative Spleißvariante dargestellt.

- Die einfachste Form (Abb. 5 A) ist die Übernahme eines Introns oder seiner Teilsequenz als Insert in die mRNA. Die Einbaufrequenz des Introns in die reife mRNA liegt bei ca. 15% der mehr als 21 000 beschriebenen Gene. Meistens sind die nicht codierenden UTR-Bereiche der pre-mRNA betroffen, bei denen dieses Ereignis 10mal häufiger im Vergleich zu codierender Sequenz auftritt.
- Die Spleißstelle kann innerhalb des Exons entweder 5´- oder 3´-wärts verschoben werden (Abb. 5 B).
- Ein Teil von Intron könnte als ein neues Exon dienen (Abb. 5 C).
- Exons können aus der pre-mRNA herausgeschnitten werden (Abb. 5 D). Dieses wird als „Skip“ bezeichnet. Gewöhnlich führen Mutationen der Donor-splice site zum „Skip“ des dazugehörenden Exons [9].
- Entweder das eine oder das andere Exon erscheint in der mRNA (Abb. 5 E).

Die Muster des Alternativen Spleißens können gewebs-, entwicklungs- oder erkrankungsspezifisch sein [44]. Die Komplexität der Erkennung von konstitutiven und alternativen Spleißseiten kann auf unterschiedlichen Ebenen reguliert werden.

Auf die Erkennung der Spleißgrenzen durch Spleißosom können so genannte cis-agierende Mutationen einwirken. Sie umfassen zum einen Mutationen, die direkt die Spleißsequenzen verändern und zum anderen Mutationen in Hilfsmotiven oder innerhalb der Introns, die zur Entstehung neuer Spleißstellen führen. Es sind häufig Einzel-Nukleotid-Substitutionen (SNPs). Ein Beispiel dafür ist das *NF1*-Gen. Bei 32% der Neurofibromatose1-Patienten ist sein alternatives Transkript für den Ausbruch der Erkrankung verantwortlich [7].

Die zweite Gruppe der Veränderungen umfasst die trans-agierenden Faktoren, die die Grundlagen der Spleißmaschinerie oder der Regulation durch SR-Faktoren zerstören. So korreliert die hohe Expression der SR-Proteine mit dem alternativen Spleißen des *CD44*-Gens. Dephosphorylierung der SR-Proteine ist mit einem alternativen Switch des proapoptotischen *bcl-x* und Caspase 9 verbunden. PTB modifiziert das Spleißen von *fibroblast growth factor receptor* (FGFR1), wobei das alternative Molekül eine höhere Affinität für die Liganden entwickelt. hnRNP A1 erleichtert das Einfügen eines zusätzlichen Exons in Caspase 2-mRNA, wobei die Funktion des Produkts von anti- auf pro-apoptotisch umschlägt [7].

Ferner kann die Promotor-Region eines Gens die Bindung der SR-Proteine bestimmen. Unterschiedliche Transkriptionsfaktoren, die mit dem Promotor interagieren, regulieren womöglich auch das zellspezifische Spleißen.

Die Elongationsrate der RNA-Polymerase II kann ebenfalls auf den Spleißprozess einwirken. In *in vitro*-Experimenten aktiviert die gereinigte und phosphorylierte RNA-Polymerase II den Spleißprozess. Eine langsame Elongationsrate oder Pausen im Ableseprozess führen zur Übernahme der alternativen Exons in die mRNA-Sequenz, während bei hoher Elongationsrate oder Fehlen von Pausen solche Exone übersprungen werden [47].

1.4.4 Alternatives Spleißen und die Tumorgenese

Bei vielen Genen sind Veränderungen in den alternativen Spleißmustern mit Neoplasien und Malignität assoziiert. Beispiele dafür sind *WT1* (*wilms tumor 1-Gen*) und Wilms Tumor, *BRCA1* und *BRCA2* und familiäres Mammakarzinom, *PSA* (*prostate*

specific antigen) und Prostatakarzinom, *FGFR 1-5* und die verschiedenen Tumoren der Blase, Pankreas und Prostata.

Die am besten bekannte Assoziation zwischen alternativem Spleißen und Erhöhung des Metastasierungspotentials wurde am Beispiel des *CD44*-Gens untersucht. *CD44* ist ein multifunktionaler Rezeptor mit Aufgaben in Zellinteraktionen, Zelltransporten, Lymphknoten-Homing, Präsentation von Chemokinen und Wachstumsfaktoren sowie Transmission der Wachstumssignale. Außerdem ist *CD44* an intrazellulärer Degradation der Hyaluronsäure, in der Signalübermittlung während der Hämatopoese und an Apoptose beteiligt. Sein Gen enthält 20 Exone, wobei das erste und die letzten fünf stark konserviert sind. Die dazwischen liegenden Exone unterliegen dem alternativen Spleißen. Einige Spleißvarianten des *CD44* (*CD44v*) werden zellspezifisch exprimiert. Beispiele sind *CD44v8-10* mit Exonen 8-10 in Epithelzellen, *CD 44* mit Exonen 3-10 in Keratinozyten und die *CD44*-Moleküle mit dem variablen Exon 6 in Plattenepithel-Karzinomen des Kopf- und Nackenbereichs. Experimente mit isoform-spezifischen Antikörpern erlauben die Unterscheidung zwischen metastatischen und nicht-metastatischen Zellen im Pankreaskarzinom anhand der *CD44v10*-Variante. *CD44v6*-Expression korreliert positiv mit fortgeschrittenem Magenkarzinom sowie mit niedriger 5-Jahresüberlebensrate der am Magen- oder Prostatakarzinom erkrankten Patienten. Es existieren weitere Beispiele der *CD44*-Varianten und Karzinomassoziation, so dass *CD44*-Isoformen als mögliche Karzinom-Biomarker fungieren können ([7], [24]).

1.4.5 Identifizierung alternativer Spleißtranskripte

Zur Vorhersage von alternativen Spleißereignissen sind verschiedene Methoden basierend auf sogenannten *Expressed Sequence Tags* (ESTs), die im Zuge von Sequenzierungsprojekten entstehen und in großer Zahl in Datenbanken vorliegen, entwickelt worden [56]. ESTs sind cDNAs, also reverse Transkripte der zugehörigen mRNAs. Ihre Sequenz umfasst nur einen kurzen Abschnitt der Gesamtlänge der mRNA, reicht aber aus, um sie eindeutig dem codierenden Abschnitt eines Gens zuzuordnen. Die Unregelmäßigkeiten beim Vergleich der ESTs mit den dazugehörigen Genen könnten auf mögliche alternative Spleißvorgänge hindeuten [68]. Zur genaueren Identifizierung der Spleißstelle wird genomische DNA mit EST-Sequenzen verglichen und die GT-AG Intronengrenzen im möglichen alternativen Spleißtranskript überprüft [56].

Die Informationen über EST-Herkunft (Zelltyp, in dem sie gebildet wurde, Gewebe, Stadium der Erkrankung oder Entwicklung) sowie Informationen über das bekannte dazugehörige Gen und seine Proteinprodukte, dienen der Auswahl der Kandidatengene mit möglichen alternativen Spleißstellen. Anschließend können alternative Spleißtranskripte je nach Fragestellung mit RT-PCR- oder Microarray-Techniken in unterschiedlichen Organgeweben oder Tumoren untersucht werden.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Im Zuge der Entschlüsselung von komplexen Genomen verschiedener Organismen wird die Bedeutung des alternativen Spleißens als grundlegender zellulärer Mechanismus zur Entstehung von Komplexität und Ausbildung von Differenzierungsmustern zunehmend deutlicher. Die Identifizierung von alternativen Spleißformen der mRNA mit differentieller Expression im Karzinomgewebe kann der Prognose und Therapie von Karzinomen neue Möglichkeiten öffnen. Das Ziel dieses Promotionsvorhabens ist es, nach tumorrelevanten Spleißformen von in Kolonkarzinom exprimierten Genen des Wnt-Pathways zu suchen. Nach einer stringenten bioinformatischen Analyse solcher putativen Spleißsequenzen, die in der Arbeitsgruppe Bioinformatik von Prof. Dr. J. Reich durchgeführt wurde, sollte deren tumorassoziierte Expression anhand von Gewebeproben aus der Tumorbank der Robert-Rössle-Klinik bestimmt werden. Die Expression von besonders interessanten Kandidatengenen sollte quantitativ mit Real-Time RT-PCR(TaqMan) untersucht werden. Zu weiteren Charakterisierung dieser Spleißvarianten wurden in der vorliegenden Promotionsarbeit zunächst folgende Fragestellungen formuliert:

- Ist das bioinformatisch beobachtete Spleißphänomen auch in den Patientenproben experimentell nachvollziehbar?
- Gibt es einen Unterschied in der Expression (qualitativ) der Spleißvarianten zwischen Tumorgewebe und gesunder Mucosa?
- Gibt es einen Unterschied in der Expressionsmenge (quantitativ) der Spleißvarianten zwischen Tumorgewebe und gesunder Mucosa?
- Gibt es einen Unterschied in der Expressionsmenge (quantitativ) zwischen konstitutiv und alternativ gespleißten mRNAs?
- Korreliert die Expression der Spleißvarianten mit bestimmten klinisch relevanten Patientenmerkmalen oder mit der Prognose der Erkrankung?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

In der unten stehenden Tabelle 1 sind die benutzten Chemikalien aufgelistet.

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
AmpliTaq DNA Polymerase	Perkin Elmer
Borsäure	Roth
Bovines Serumalbumin	Promega
Bromphenolblau	Roth
DEPC-behandeltes Wasser	Ambion
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP)	Amersham-Pharmacia Biotech
DNA-Längenstandards VIII (0,019-1,11kbp)	Roche
DNase	Qiagen
EDTA	Sigma
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Euparal	Roth
Ficoll 400	Amersham-Pharmacia Biotech
Glycerin	Roth
Hämatoxylin	Fluka
2-Mercaptoethanol	Fluka
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
M-MLV RT Puffer	Promega
Natronlauge (1N)	Merck
PCR-Puffer (1.5 mM MgCl ₂)	Applied Biosystems
RNasin Ribonuclease	Promega
SeaKem LE Agarose	Biozym
2 x SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems
Tris-Base	Roth

Tabelle 1: Chemikalien und Enzyme.

2.1.2 Lösungen und Puffer

LÖSUNG / PUFFER	KOMPONENTEN
10xTBE (Tris-borate), 1 Liter	54 g TrisBase, 27,5 g Borsäure, 20ml 0.5M Na ₂ EDTA (pH 8), auf 1 Liter mit Wasser auffüllen.
1xTBE (Tris-borate), 1 Liter	100 ml 10xTBE, 900 ml Wasser
RNA-/DNA- Loading Puffer, 32 ml	0,05 g Bromphenolblau 3 g Ficoll 400 8,7 ml Glycerin 0,05 g Xylene Cyanon FF 20 ml DEPC-Wasser
0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8), 1 Liter	146 g EDTA in 800ml Wasser geben, ca.20 g NaOH-Pellets zugeben bis sich der Niederschlag löst, den pH-Wert überprüfen bzw. korrigieren und mit Wasser auf Endvolumen von einem Liter auffüllen.
1% Agarosegel, 50 ml	0,5 g Agarose in 50 ml 1xTBE kochen, anschließend 5 µl Ethidiumbromid zugeben.
DNA-Längenstandards VIII (0,019-1,11kbp), 200 ml	20 µl Stammlösung vom Hersteller 20 µl RNA-/DNA-Loading Puffer 160 µl DEPC-Wasser

Tabelle 2: Lösungen- und Pufferbestandteile.

2.1.3 Molekularbiologische Kits

BEZEICHNUNG	FUNKTION	HERSTELLER
RNAse-Free DNase Set	DNase-Verdau während der RNA-Gewinnung	Qiagen
Rneasy [®] Mini Kit	Total-RNA-Isolierung	Qiagen
Qiaschredder TM	Homogenisierung von Zell- / Gewebelysaten	Qiagen
One Step RT-PCR Kit	RT-PCR	Qiagen
Qiaex II	DNA-Extraktion aus dem Agarosegel	Qiagen
Turbo Nucleic Acid Purification Kit	DNA-Extraktion aus Agarosegel oder PCR-Ansatz	GeneClean

Tabelle 3: Molekularbiologische Kits.

2.1.4 Primerdesign

Zur Identifizierung von Spleißvarianten wurden die Primer (Tab.4) jeweils vor und nach den vorhergesagten Spleißgrenzen oder auch spleißgrenzenübergreifend gelegt. In der PCR würde man dann bei erfolgtem Spleißereignis zwei unterschiedlich lange PCR-Produkte erwarten.

GEN	SEQUENZ	T [°C]	PCR-PRODUKT KONST. / ALT. [BP]
<i>β-Actin</i>	V:GGCATCGTGATGGACTCCG R:GCTGGAAGGTGGACAGCGA	62,0 62,0	622
<i>CTNNB1</i>	V:GACCTCATGGATGGGCTG R:AGGCTAGGGTTTGCTAAATTCC	60,0 60,0	329 / 168
<i>CtBP1(1)</i>	V:GATGGGCAGCTCGCACTT R:TTCATGATCGGAGGTCGGAC	59,0 59,0	63 / 257
<i>CtBP1(2)</i>	V:C meta AATGAAGACGGCA R:CATCAGCAGGACGGCACTG	58,2 60,0	144 / 120
<i>CK1A1</i>	V:GCCATGGCAAGGGCTAAA R:CATCGCAAATTCTGCAGGAA	59,0 59,0	118 / 82
<i>GSK3β</i>	V:AATGAACCCAAACTACACAGAATTTAAA R:CAATTGCCTCCGGTGGAGT	59,0 59,0	135 / 96
<i>Axin1</i>	V-A:GCGCCGGTGCTGCA R-A:ACCCACAGTCAAACCTCGTC	60,0 62,0	A:264
	V-B:GGAGGAGGAAGAAAAGAGAGCC R-B:TGCCGATGATCTTCTCCTCAA	68,0 62,0	B:428 / 286
<i>LRP5</i>	V-A:CCCTCTACTCACCCATGGACA R-A:AGGCACAGGTGGGAGCAG	58,0 58,0	A:103
	V-B:CAGCACCCGGAAGATCATTGT R-B:TCGTTGATCTCGGTGTTGACC	61,0 60,0	B:702 / 571

Tabelle 4: Primer. Abkürzungen: V-Vorwärtsprimer; R-Rückwärtsprimer; T-Schmelztemperatur; KONST.-konstitutives, ALT.- alternatives PCR-Produkt. Alle Sequenzen sind in der 5'-3'-Richtung angegeben.

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma BioTez (Berlin) kommerziell synthetisiert. Die Sequenzen für das Primerpaar (außer *β-Actin* und Random-Primer) wurden mit Primer Express-Software (Applied Biosystems) selbstständig entworfen. Mit diesem Programm wurde auch das optimale Primerpaar mit ähnlicher Schmelztemperatur ausgewählt. Es wurde besonders darauf geachtet, dass die Primersequenzen an ihren 3'-Enden weder intra- noch intermolekular komplementär sind. Dadurch wurde die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Primerdimeren während der PCR reduziert. Vor der Bestellung bei BioTez (Berlin) wurde die Spezifität der Primer für die „Ziel“-Sequenz

mittels BLAST [2] ermittelt, um ein spezifisches PCR-Produkt zu gewährleisten.

Für die reverse Transkription wurde ein Random-Primer verwendet. Die Sequenz der Random-Primer wurde von der Firma BioTez (Berlin) vorgegeben und war jeweils zufällig entworfen.

2.1.5 Zelllinien

Die Zelllinien wurden bei ATCC (American Type Culture Collection) erworben.

Für die Optimierungsexperimente und die Kontrollansätze innerhalb der PCR wurden folgende Zelllinien verwendet (Tab. 5).

	SW 480	HT 29	HCT 116	LS 174T	MCF 7	MDA MB 435
ATCC-Nummer	CCL-228	HTB-38	CCL-247	CL-188	HTB-22	HTB-129
Organism	Homo sapiens					
Gewebe	Colon, kolorektales Adenokarzinom				Mamma, Adenokarzinom	Mamma, ductales Karzinom
Wachstum	adhärent					
Morphologie	epithelial					
Zelluläre Produkte	CEA, Keratin, TGF β , GM-CSF	CEA, Mucin, Sekretorische Komponente von IgA, TGF β -binding Protein	CEA, Keratin, TGF β 1, TGF β 2	CEA, Mucin, IL-10, IL-6	IGFBP-2, -4, -5;	Tubulin, Actin
Rezeptoren	EGF	U-PAR, Adrenalin α 2A, Vitamin D			Östrogen	
Ethnische Zugehörigkeit	CEU, 50 J., männlich	CEU, 44 J., weiblich	männlich	CEU, 58 J., weiblich	CEU, 69 J. weiblich	CEU, 31 J., weiblich

Tabelle 5: Zellen und ihre Eigenschaften. Abkürzungen: CEU, Kaukasier; J., Jahre.

2.1.6 Gewebeproben von Patienten

Die Patientenproben wurden von der Tumorbank der Robert-Rössle-Klinik zur Verfügung gestellt. Von jedem Patient ist ein Probenpaar vorhanden, das jeweils gesundes und krebsverändertes Gewebematerial enthält. Zur Verschlüsselung enthält jeder Patient eine Identifikationsnummer, der als Zusatz das Jahr des operativen

Eingriffs zur Tumorentfernung nachsteht (Beispiel: 398/96). In der Tumorbank der Robert-Rössle-Klinik sind unter solchen Nummern auch klinische Daten wie z.B. TNM-Status, Alter, Geschlecht, Todeszeitpunkt, betroffener Darmabschnitt u. a. festgehalten.

In dieser Arbeit wurden Gewebeproben von insgesamt 14 Patienten untersucht. Zur Gruppe der Patienten gehörten sieben Frauen und sieben Männer im Alter von 51 bis 78 Jahren. Das mittlere Alter betrug zum Zeitpunkt des Eingriffs 64,5 Jahre. Betroffen waren verschiedene Regionen des Dickdarms. Bei vier Patienten war das Karzinom im Rektum, bei drei im Colon ascendens, bei weiteren drei im Caecum, bei den nächsten drei im Sigma und bei einem im Colon transversus lokalisiert. Sechs Patienten hatten zum OP-Zeitpunkt bereits Fernmetastasen. In den anschließenden 2-4 Jahren post OP sind sechs Patienten an ihrem Leiden verstorben. Die Überlebenszeit nach dem operativen Eingriff lag zwischen drei und 105 Monaten bei einer mittleren Überlebenszeit von 46 Monaten.

PATIENT	DIAGNOSE: ADENOKARZINOM IM	EXITUS	T	N	M	LOKALISATION DER METASTASEN	G	L	V	R
1943	Rectosigmoid	n	2	0	0		2	0	0	0
1626	Colon ascendens	n	3b	0	0		2	0	1	0
2184	Caecum	n	3c	0	0		2	0	1	0
214	Colon ascendens	n	3b	0	0		2	0	0	0
2456	Caecum	n	3	0	0		2	0	0	0
2887	Colon sigmoideum	n	4a	0	0		2	0	0	0
2914	Rectum	n	4b	2	0		2	0	1	0
398	Rectum	n	3	3	1	Leber	3	1	1	0
2104	Caecum	j	2	0	0		2	1	0	0
2571	Colon ascendens	j	3d	2	1	Leber, Peritoneum	2	1	0	2
1112	Rectum	j	3b	3	1	Leber, Lunge	2	1	0	0
2760	Colon sigmoideum	j	4	2	1	Leber, Lunge, Peritoneum	2	0	0	0
2886	Caecum	j	3c	2	1	Leber, Niere	3	1	1	0
3032	Colon transversum	j	4	1	1	Peritoneum	3	1	0	0

Tabelle 6: Klinische Daten der Patienten. Abkürzungen: n - nein, j - ja, zu weiteren Abkürzungen siehe Tumor Classification Correspond to AJCC Cancer Staging Forms 6th Ed. (2003) [98].

Das Tumorgewebe wurde sorgfältig aus dem Karzinomgebiet entnommen. Die gesunde Mucosa wurde ebenfalls vom gleichen Patienten im Mindestabstand von 50 mm vom Tumorrand während der OP entnommen. Die Gewebeproben wurden in

flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die chirurgischen Proben wurden nach der WHO/UICC Richtlinien klassifiziert und charakterisiert (Tab. 6). Außerdem wurde noch als Kontrolle zum normalen Gewebe endoskopisch gewonnenes Material während einer Koloskopie von tumorfreien Patienten eingesetzt.

2.1.7 Geräte

BEZEICHNUNG	HERSTELLER
ABI PRISM 7000 Sequence Detection System Thermal Cycler	Applied Biosystems
Elektrophorese-Apparatur	Bächler Feintech
Spannungsversorgung	Biotech Fischer
Zentrifuge 5415C Minizentrifuge	Eppendorf
Zentrifuge Sepatech Biofuge 28RS	Heraeus
UV-Tisch UVT-28MP	Herolab
BioPhotometer 6131	Eppendorf
Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermocycler	MJ Research, Biozym
Mikrotom-Kryostat Jung CM 3000	Leica
Vortexe-Genie 2	Scientific Industries

Tabelle 7: Geräte.

2.2 Methoden

2.2.1 Bioinformatische Analysen als Basis für die anschließenden Experimente

2.2.1.1 EASED (Extended Alternatively spliced EST-Database)

In der Arbeitsgruppe Bioinformatik am Max-Delbrück-Center wurde eine Datenbank alternativer Spleißformen entwickelt, die alle potentiell alternativ gespleißten mRNAs für neun verschiedene Organismen (*Aradiopsis thaliana*, *Bos taurus*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Xenopus laevis*) zusammenfasst [99]. Zur Identifizierung dieser alternativen Spleißformen wurde ein sequenzbasierter Algorithmus entwickelt, der mRNA-Sequenzen mit ESTs (*Expressed Sequence Tags*) vergleicht. Als Besonderheit der Datenbank wurde die Möglichkeit der Suche nach gewebespezifischen Spleißformen

entwickelt [68]. Als Informationen für den Benutzer wurden in der Datenbank die Sequenzdaten aus GenBank, Ensembl, ASD zusammengestellt.

2.2.1.2 Auswahlkriterien für relevante EST-Sequenzen

Bei der Kandidatensuche aus den möglichen alternativen Spleißformen diente die Anzahl der EST, die diese Form definieren, als wichtigstes Kriterium. Die Größe des unterschiedlich gespleißten Bereiches und die Homologie der überlappenden Bereiche dienten als Ausschlusskriterien. In dieser Arbeit wurde die Auswahl der Spleißformen auf Gene des Wnt-Signalweges beschränkt (Abb. 5). Die Gene aus dem Wnt-Pathway wurden der CGAP-Liste entnommen [99]. Als weitere Bedingung wurde möglichst differenzierte Verteilung der kolon- und tumorspezifischen ESTs zwischen normalen und alternativen Spleißform aufgestellt (Tab. 8).

2.2.1.3 Sonstige Datenbanken und Programme

Zur Sequenzsuche diente die Genbank am NCBI, dem National Center for Biotechnology Information, als Datenquelle. NCBI wurde als zentrales Institut zur Datenspeicherung und Datenverarbeitung in der Molekularbiologie gegründet. Über die Accessionnummer können in der Genbank die Sequenz und die Annotation mit allen bekannten Daten zum Zeitpunkt des Eintrages sowie zugehörigen Veröffentlichungen abgerufen werden. Über Webinterfaces stellt das NCBI einen Zugang zu den wichtigsten DNA-, RNA- und Protein-Datenbanken zur Verfügung, des Weiteren eine Taxonomie-Suchfunktion zur Suche nach Daten zu bestimmten Spezies, eine Datenbank mit Inhaltsangaben wissenschaftlicher Literatur (PubMed) sowie diverse Standardsoftware der Bioinformatik [102].

Ensembl ist ein bioinformatisches Forschungsprojekt, welches eukaryontische Genome katalogisiert und verwaltet. Es wird in Zusammenarbeit mit dem Wellcome Trust Sanger Institute und dem European Bioinformatics Institute (EBI) auf einem Außenposten des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) betrieben [103].

Aus der SwissProt Datenbank wurden Informationen über die Proteinfunktion und Proteinstruktur zusammengetragen, um eventuelle Veränderungen in der Struktur oder den Proteinaufgaben durch die Spleißformen vorherzusagen [100]. Bereits die in Pubmed publizierte Informationen für Kandidatengene wie das Auftreten von Spleißformen im Krebsgewebe wurden zur Auswahl hinzugezogen [101].

Alle Suchergebnisse wurden in Form einer Tabelle zusammengefasst und zu

weiteren Untersuchungen im Labor zur Verfügung gestellt. Es enthält unter anderem das alternative Spleißprofil, welches die Anzahl der alternativ gespleißten ESTs (NAEs), Anzahl der konstitutiv gespleißten ESTs (NCEs) wiedergibt (Tab. 8).

GEN	SPLEIßEREIGNIS	NAE	NAE*	NCE	NCE*	AUSWAHLKRITERIEN
CTNNB1 (1) β-Catenin	NM_001904 / ENST00000301829 exon 16, Teil (160 bp skip)	34	7	47	2	(i) hohe Anzahl NAE*
CTNNB1 (2) β-Catenin	NM_001904 / ENST00000301829 vollständiger intron (303 bp insert)	6	0	18	1	(i) 100% der AE aus Krebsgewebe (81% der CE aus Karzinomen) (ii) nicht veröffentlichte Spleißvariante
CtBP1 (1) C-terminal binding protein 1	NM_001328 / ENST00000336543 vollständiger intron (194 bp insert)	32	2	23	0	(i) hohe Anzahl NAE* (ii) keine CE aus dem gastrointestinalen Gewebe
CK1A1 Casein Kinase 1 alpha 1	NM_001892 / ENST00000261798 alternatives exon 9 (37 bp skip)	34	0	26	0	(i) hohe Anzahl AE und CE aus Krebsgewebe
GSK3B Glycogen synthase kinase-3 beta	NM_002093 / ENST00000264235 alternatives exon 9 (39 bp skip)	26	2	1	0	(i) hohe Anzahl NAE* (ii) 100% der AE aus Krebsgewebe (keine Auskunft über CE)
AXIN1	NM_003502 / ENST00000262320 alternatives exon 8 (108 bp skip)	18	0	5	0	(i) 10 AE aus Krebsgewebe (1 CE aus Krebsgewebe) (ii) 2 AE aus Magen
LRP5 Low-density lipoprotein receptor- related protein 5 precursor	NM_002335 / ENST00000294304 alternatives exon 5 (132 bp skip)	4	0	4	0	(i) 100% der AE aus Krebsgewebe (67% der CE aus Krebsgewebe) (ii) nicht veröffentlichte Spleißvariante

Tabelle 8: Auswahl der alternativ gespleißten Wnt-Kandidatengene. Abkürzungen: NAE, Anzahl der alternativ gespleißten ESTs; NCE, ESTs-Anzahl, die die normale konstitutive Isoform wiedergeben; NAE* und NCE*, aus dem kolorektalen Karzinom stammende ESTs; AE, alternativ; CE, konstitutiv gespleißte ESTs.

2.2.2 Anfertigung der Kryoschnitte

Vor der Anfertigung von Gewebeschnitten wurde für jede Gewebeprobe ein Eppendorfgefäß mit 350 µl mercaptoethanolhaltigen Lysepuffer aus dem Rneasy® Mini Kit vorbereitet.

Mit dem Kryostat gelang es, dünne Schnitte von gefrorenem Gewebematerial anzufertigen. Zuerst aber musste die Schnittfläche begradigt werden, um dann einheitliche und den ganzen Querschnitt umfassende Sektionen anfertigen zu können. Der erste und der letzte Schnitt (5 µm Schnittdicke) von jedem Gewebestück wurden zur pathologischen Begutachtung auf einem Objektträger fixiert. Dazwischen erfolgten 25 bis 30 Schnitte für die spätere RNA-Extraktion, die mit Hilfe einer Kapillare vom Mikrotomtisch abgelöst und sofort ins Eppendorftube mit 350 µl Lysepuffer gegeben wurden. Um das Gewebe zu homogenisieren wurde das Gemisch kurz zentrifugiert und bis zur RNA-Extraktion mindestens bei -80°C gelagert.

Die Objektträger mit zwei entfernt voneinander liegenden Schnitten wurden mit Hämatoxylin gefärbt. Die Färbereihe umfasste folgende Abfolge:

- 2 Minuten Färbung im Hämatoxylin,
- Spülen mit Wasser,
- Aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung:
- Zweimal 1 Minute im 70%-Ethanol,
- Zweimal 1 Minute im 100%-Ethanol.

Nach dem Lufttrocknen wurden Gewebeschnitte luftdicht mit Euparal als Zwischenmedium und mit dem Deckglas auf dem Objektträger fixiert. Die fertigen Schnitte wurden dem Pathologen zur Beurteilung vorgestellt, so dass für weitere Untersuchungen nur eindeutig ausgewiesenes Tumormaterial bzw. Normalgewebe verwendet wurde, d.h. die Gewebelysate, die Verunreinigungen mit Fett-, Bindegewebe oder Nekrosen enthalten, wurden von der weiteren Verwendung ausgeschlossen.

2.2.3 RNA-Extraktion

Die RNA-Isolation erfolgte mit Rneasy® Mini Kit und DNase Verdau aus dem RNase-Free DNase Set (beide von Qiagen).

Zur Extraktion von Total-RNA wurden 350 µl eines Gewebe-Lysepuffergemisches auf Homogenisierungssäulchen aus Qiaschredder™ gegeben und zwei Minuten bei

maximaler Geschwindigkeit (ca. 15.000 rpm) zentrifugiert.

Dem flüssigen viskösen Filtrat wurde das gleiche Volumen an 70%-Ethanol zugesetzt, gemischt und die 700 µl der Probe dann auf die Extraktionssäule des Rneasy® Mini Kits pipettiert. Anschließend wurden alle Zentrifugationschritte für eine Minute bei 10.500 rpm durchgeführt. Der Durchfluss nach der Zentrifugation wurde verworfen und auf die Membran der Extraktionssäule 350 µl RW1-Puffer zum Waschen gegeben und zentrifugiert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Behandlung mit DNase. Dazu wurde jeder Probe ein Gemisch aus 10 µl DNase stock solution und 70 µl RDD-Puffer zugesetzt. Die Extraktionssäule musste 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

Dann folgte noch ein Waschschrift mit 350 µl RW1-Puffer und das Zentrifugieren. Die Säulchen wurden in neue Sammelgefäße umgesetzt und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen, wobei im letzten Schritt bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurde.

Zur Elution der RNA wurden die Säulchen in 1,5 µl-Eppendorfgefäße eingesetzt, auf die Membran 40 µl DEPC-Wasser pipettiert und zum Schluss eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration von RNA in wässriger Lösung (1 µl RNA + 59 µl DEPC-Wasser) wurde durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge und bei einer Küvetten-Schichtdicke von einem cm entspricht ein gemessener Absorptionswert von eins ungefähr einer Konzentration von 40 µg/ml. Die optische Dichte wurde zusätzlich bei 280 nm gemessen. Der Quotient zwischen den bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorptionskoeffizienten gab Aufschluss über die Reinheit der RNA-Extraktion. Bei sehr reinen RNA-Lösungen ist der Quotient größer als 1,9. Kleinere Werte weisen auf die Kontamination mit Proteinen oder aromatischen Substanzen hin.

2.2.5 One Step RT-PCR

Um sicher zu sein, dass in den RNA-Proben keine genomische DNA-Beimengungen vorhanden sind, wurde One Step RT-PCR mit RNA-Eluat, *β-Actin*-Primern und One Step RT-PCR Kit von Qiagen angesetzt (Tab.9 und Tab.10).

KOMPONENTEN	VOLUMEN
<i>Mastermix:</i>	
RNase freies Wasser	16,8 µl
5 x Qiagen One Step RT-PCR Puffer	5,0 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,0 µl
β -Actin-Vorwärtsprimer	0,1 µl
β -Actin-Rückwärtsprimer	0,1 µl
Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1,0 µl
Template RNA	1,0 µl
<i>Totalvolumen:</i>	25 µl

Tabelle 9: One Step RT-PCR Pipettierschema pro Reaktion.

STEP	TEMPERATUR	DAUER
Reverse Transkription	50°C	30,0 min
Aktivierungsschritt	95°C	15,0 min
<i>Dreischrittverlauf:</i>		
Denaturierung	94°C	1,5 min
Annealing	68°C	1,0 min
Elongation	72°C	2,0 min
	<i>Wiederholung: 30 Zyklen</i>	
Finale Elongation	72°C	10,0 min

Tabelle 10: Thermocycler-Programm für One Step RT-PCR für β -Actin.

2.2.6 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese wurden von jeder Probe ca. 2,5-3 µg RNA eingesetzt. Das entsprechende Volumen der wässrigen RNA-Lösung wurde rechnerisch bestimmt. Zu diesem Ansatz wurde DEPC-Wasser zugesetzt, um auf Endmenge von 23 µl zu kommen. Dann wurde zu jeder Probe 2 µl Random Hexamer Primer (50 µM) dazu pipettiert. Diese 25 µl wurden dann für 10 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend 10 Minuten auf Eis abgekühlt.

In der Zwischenzeit wurde ein Mastermix nach folgendem Schema pro Reaktion vorbereitet:

- 10 µl 5 x RT-Puffer (Promega),
- 5 µl Bovines Serumalbumin (1 mg/ml),
- 2,5 µl dNTP (25 mM),
- 1 µl RNAsin (Promega),
- 2 µl M-MLV Reverse Transkriptase (Promega),
- 4,5 µl DEPC-Wasser.

Nach der Mastermixzugabe musste das Gemisch für eine Stunde bei 37°C inkubiert werden. Die Random Primer binden gleichzeitig an unterschiedlichen komplementären Stellen der mRNA und führen zur Synthese unterschiedlich langer cDNAs durch reverse Transkriptase.

Um die cDNA zu fällen, wurde den Reaktionsansätzen je 100 µl 100%-Ethanol zugesetzt und über Nacht bei -40°C präzipitiert. Am nächsten Morgen erfolgte dann die Zentrifugation bei 15.000 rpm und 4°C für 20 Minuten. Das Pellet wurde vorsichtig mit 500 µl 70%-Ethanol gewaschen (2 min bei 4°C bei 15.000 rpm) und anschließend 10 Minuten lang luftgetrocknet.

Durch Zugabe in 50 µl DEPC-Wasser wurde das Pellet aufgelöst und die cDNA-Lösung bei -20°C eingefroren.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion

2.2.7.1 Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, vom englischen *polymerase chain reaction*) ist eine Technik, mit der jedes beliebiges DNA-Fragment *in vitro* sehr schnell amplifiziert werden kann.

Das Ausgangsmaterial für die PCR ist die sich in Lösung befindliche doppelsträngige DNA, die die „Ziel“-Sequenz enthält. Daneben benötigt man als Starthilfe Oligonukleotidprimer, eine hitzestabile Polymerase, einen Mix aus vier Desoxynukleotiden (dNTPs) und Puffer mit optimalem Salzgehalt.

Die PCR ist ein zyklischer Prozess aus drei Schritten.

Zuerst wird die doppelsträngige DNA-Matrize durch Hitzedenaturierung in ihre Einzelstränge zerlegt.

Es folgt die Abkühlung des Reaktionsgemisches, bei der sich die Primer über Wasserstoffbrücken an den Enden der zu amplifizierenden Sequenz komplementär binden (Annealing).

Im dritten Schritt der Reaktion erkennt die DNA-Polymerase die kurzen, durch die Primer komplementären Elemente als Startsignal und beginnt diese durch Einbau der entsprechenden Nukleotide zum Gegenstrang zu verlängern (Elongation). Am Ende des ersten Zyklus wurde die „Ziel“-Sequenz verdoppelt.

Ab dem vierten Zyklus vermehrt sich die „Ziel“-Sequenz exponentiell. Erfahrungsgemäß wiederholt man den Zyklus zwanzig- bis vierzigmal, um nicht die

exponentielle Amplifikationsphase zu überschreiten, denn dann würde die neugebildete DNA-Menge im Überschuss gegenüber dem Enzym vorliegen. Die Enzymsättigung würde die Produktbildung hemmen („Plateau-Effekt“). Außerdem nimmt die Aktivität des Enzyms während der PCR nach und nach ab, auch die Konzentrationen anderer Reagenzien und die spezifische Hybridisierung der Einzelstränge miteinander sinken [60].

2.2.7.2 β -Actin-PCR

Um die Expression der zu untersuchenden Spleißformen vergleichen zu können, wurde mit den cDNA-Proben zuerst eine PCR mit Primern für das housekeeping-Gen β -Actin durchgeführt (Tab. 11 und 12).

KOMPONENTEN	VOLUMEN
DEPC-Wasser	11,65 μ l
PCR-Puffer (1.5mM MgCl ₂)	2,0 μ l
dNTP (2 μ M)	2,0 μ l
Vorwärtsprimer(5 μ M)	0,4 μ l
Rückwärtsprimer(5 μ M)	0,4 μ l
AmpliTaq DNA Polymerase	0,25 μ l
cDNA	3,3 μ l
<i>Totalvolumen:</i>	20 μ l

Tabelle 11: β -Actin-PCR Pipettierschema pro Reaktion.

STEP	TEMPERATUR	DAUER
Aktivierungsschritt	94°C	3,0 min
<i>Dreischrittverlauf:</i>		
Denaturierung	94°C	0,5 min
Annealing	59°C	0,5 min
Elongation	72°C	1,0 min
	<i>Wiederholung: 25 Zyklen</i>	
Finale Elongation	72°C	10,0 min

Tabelle 12: Thermocycler-Programm für β -Actin-PCR.

Housekeeping-Gene (Haushaltsgene) sind gleichmäßig in jedem Zelltyp exprimierte Strukturgene, die für ständig benötigte Proteine wie zum Beispiel Enzyme des Grundstoffwechsels oder Proteine des Cytoskeletts kodieren. β -Actin zeigte sich geeignet für PCR-Experimente mit Kolongewebe oder entsprechenden Zelllinien auch deshalb, da die PCR das Unterscheiden zwischen amplifizierter genomischen DNA und cDNA ermöglicht. Das wird durch exonübergreifende Primer gesichert (cDNA-Amplikon ca. 622 bp, genomische DNA-Produkt > 622 bp).

Das Ziel war es, in der anschließenden Gelelektrophorese und Fluoreszenzmessung der amplifizierten DNA ein auswertbares β -Actin-Signal zu erhalten, das zudem bei allen Proben gleiche Intensität aufwies.

2.2.7.3 PCR als Expressionstest für putative Spleißformen

Für jede einzelne PCR wurden jeweils die optimalen Konzentrationen, Temperatur und Reaktionszeiten experimentell ermittelt. Die Volumina im Standardansatz (Tab.13) wurden für *Axin(A)*-PCR variiert: je 0,1 μ l von Primern A und AmpliTaq DNA Polymerase.

KOMPONENTEN	VOLUMEN
DEPC-Wasser	17,4 μ l
PCR-Puffer (1,5 mM MgCl ₂)	2,5 μ l
dNTP (2 μ M)	2,0 μ l
Vorwärtsprimer (50 μ M)	0,2 μ l
Rückwärtsprimer (50 μ M)	0,2 μ l
AmpliTaq DNA Polymerase	0,2 μ l
cDNA	2,5 μ l
<i>Totalvolumen:</i>	25 μ l

Tabelle 13: PCR-Standardpipettierschema pro Reaktion.

STEP	<i>CTNNB1</i>		<i>CtBP1 (1)</i>		<i>CtBP1 (2)</i>		<i>Ck1a1</i>	
	°C	min	°C	min	°C	min	°C	min
Aktivierungsdenaturierung	94,0	3,0	94,0	3,0	94,0	3,0	94,0	3,0
<i>Dreischrittverlauf:</i>								
Denaturierung	90,0	1,5	90,0	1,5	92,0	2,0	90,0	1,5
Annealing	66,0	1,0	58,0	1,0	59,0	1,0	60,0	1,0
Elongation	72,0	1,0	72,0	1,5	72,0	1,5	72,0	1,5
<i>Wiederholung:</i>	33 Zyklen		30 Zyklen		30 Zyklen		30 Zyklen	
Finale Elongation	72,0	10,0	72,0	10,0	72,0	10,0	72,0	10,0
STEP	<i>GSK3β</i>		<i>AXIN1 (A)</i>		<i>AXIN1 (B)</i>		<i>LRP5</i>	
	°C	min	°C	min	°C	min	°C	min
Aktivierungsdenaturierung	94,0	3,0	94,0	3,0	94,0	3,0	94,0	3,0
<i>Dreischrittverlauf:</i>								
Denaturierung	90,0	1,5	92,0	1,5	90,0	2,0	92,0	1,5
Annealing	63,0	1,0	63,0	1,0	65,0	1,0	64,0	1,0
Elongation	72,0	1,0	72,0	1,5	72,0	1,5	72,0	1,5
<i>Wiederholung:</i>	30 Zyklen		30 Zyklen		30 Zyklen		30 Zyklen	
Finale Elongation	72,0	10,0	72,0	10,0	72,0	10,0	72,0	25,0

Tabelle 14: Übersicht über die einzelnen Thermocyclerprogramme.

Material und Methoden

Alle Temperaturen, Zeitdauer der Reaktionsschritte sowie Anzahl der Zyklen wurden für jedes Gen einzeln experimentell ermittelt. Die endgültigen Reaktionsbedingungen sind der Tabelle 14 zu entnehmen. Um zu zeigen, dass die PCRs nicht unter streng festgelegten, gesättigten Bedingungen verlaufen sind, werden unten als Beispiel die Optimierungsergebnisse in Form von Gelelektrophoresebildern für die *GSK3β*-PCR angeführt.

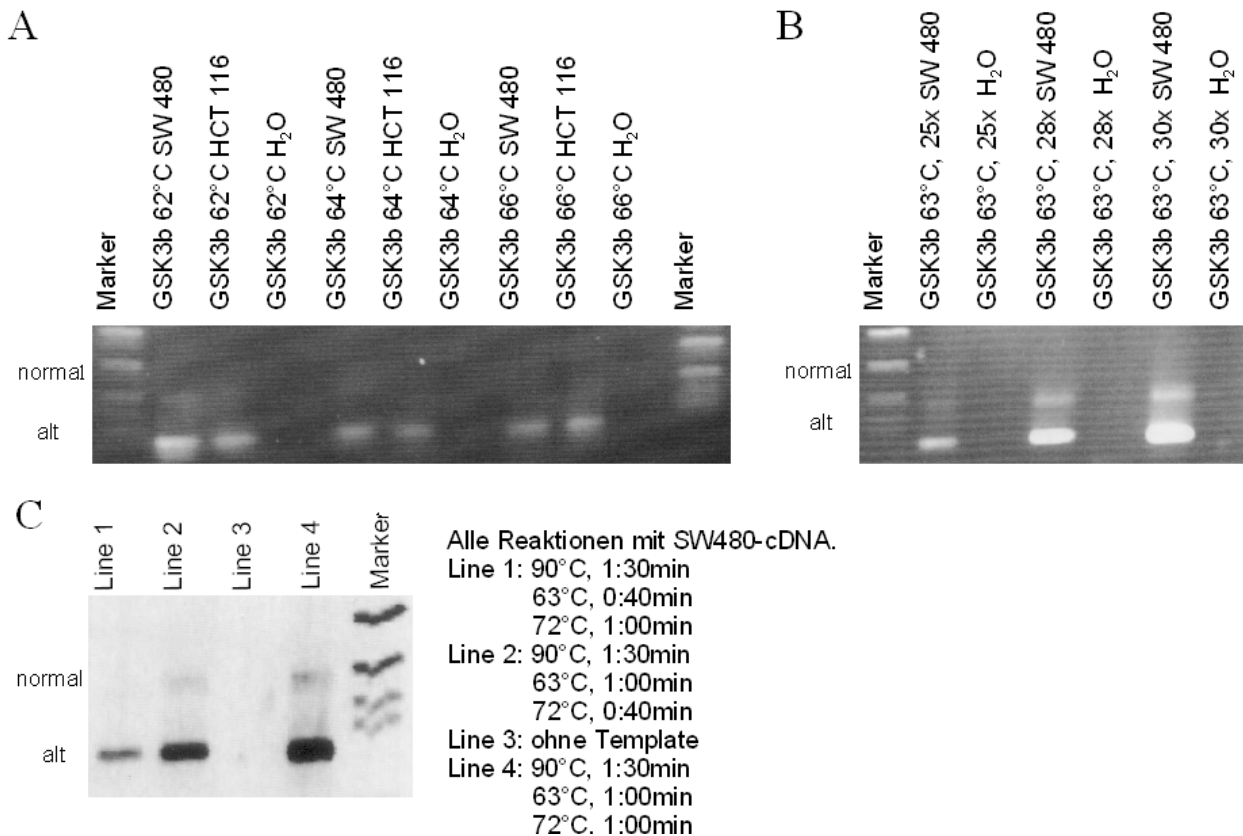


Abbildung 6: Optimierung der PCR-Bedingungen am Beispiel der *GSK3β*-PCR. (A) Expression von *GSK3β* bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen; (B) Abhängigkeit der Expression von der Zyklenanzahl; (C) Expression bei unterschiedlicher Dauer der Annealing- als auch Elongationsphase. Abkürzungen: H₂O, Negative Kontrolle; normal, konstitutives; alt., alternatives Spleißprodukt.

Die Optimierung der *GSK3β*-PCR wurde mit der Zelllinien-cDNA von SW480 und HCT 116 durchgeführt. Das Amplifikationsvolumen von 25 µl pro Reaktion setzt sich entsprechend dem Standardansatz zusammen. Auf dem ersten Elektrophoresegel sind Ergebnisse bei Annealingtemperatur von 62, 64 und 66°C bei je 30 Zyklen dargestellt (Abb. 6A). Die übrigen Zeiten und Temperaturen für das Cyclerprogramm sind in der Tabelle 14 zu finden. Wie in der Abb.6A zu sehen ist, ist die Expression der längeren normalen *GSK3β*-Isoform bei 64°C und höher schwach nachzuweisen. Deswegen

wurden im nächsten Lauf PCR-Ansätze bei 63°C und verschiedener Zyklusanzahl (25, 28, 30) amplifiziert, um die Identifizierung der Splicing-Isoformen zu optimieren (Abb. 6B). Bei der Annealingtemperatur von 63°C und Zyklusanzahl von 30 können beide Spleißformen am deutlichsten auf dem Gel gesehen werden.

Außerdem ist zu beachten, dass die Expression der Spleißisoformen im Gewebelysat der Patienten meistens schwächer ausfällt als in der verwendeten Zelllinien-cDNA, so dass die Anzahl der Zyklen von 30x für weitere Untersuchungen beibehalten wurde. Weiterhin wurde die Reaktion bei unterschiedlicher Dauer der Annealing- und der Extensionszeit ausprobiert (Abb. 6C). Bei kürzerer Elongationszeit von 40 sec ist das normale längere Spleißprodukt sehr schwach zu sehen, deswegen erscheint die Extensionszeit von 1,0 min als auch die Annealingzeit von 1,0 min für den Nachweis beider Isoformen günstiger.

2.2.8 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente für die Analyse erfolgte in 2%-Agarosegelen im elektrischen Feld. 1 g Agarose wurde in 50 ml 1xTBE-Puffer aufgenommen und in der Mikrowelle gekocht, solange bis sie sich vollständig gelöst hat. Die Gelflüssigkeit wurde nach der Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid in eine Gelkammer gegossen und ein passender Taschenkamm eingesetzt. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die DNA interkaliert und so bei der UV-Bestrahlung die DNA sichtbar macht. Das Gel wurde 30 min zur Verfestigung stehen gelassen und dann mit 1xTBE-Puffer begossen. Jeweils 7 µl DNA-Probe wurden mit 1,5 µl Loading Puffer vermischt, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Zur Größenbestimmung der Amplikons wurde mindestens eine Geltasche mit DNA-Längenstandards VIII (0,019-1,11 kbp) von Roche gefüllt. Die angelegte Spannung betrug 140 V. Im elektrischen Feld wanderte jedes DNA-Makromolekül von der Kathode zur Anode und zwar mit einer Geschwindigkeit, die in erster Linie durch seine Größe und Ladung bestimmt wurde. Längere Spleißformen trugen mehr negative Ladungen (Phosphatgruppen) einerseits und wurden wegen ihrer Größe andererseits vom Gel wie von einem „Molekularsieb“ stärker in ihrer Wanderung behindert. So befanden sich größere PCR-Produkte schließlich näher zur ursprünglichen Auftraglinie. Die Gele wurden mit dem Geldokumentationssystem E.A.S.Y. Win32 (Herolab) im UV-Durchlicht aufgenommen.

2.2.9 Sequenzierung

Die Extraktion des gewünschten Amplikons aus dem Agarosegel wurde nach der Anleitung zum Qiaex II von Qiagen oder Turbo Nucleic Acid Purification Kit von GeneClean durchgeführt.

Unabhängig von der DNA-Reinigungsmethode wurden 1-2 µl DNA-Eluats zur Kontrolle elektrophoretisch aufgetrennt. Um zu wissen, welche Menge an dsDNA im Eluat vorhanden ist und in welcher Qualität, wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung der Probe durchgeführt.

- DNA-Banden Extraktion aus dem 2%-Agarosegel mit QiagenKit QIAEX II wurden unter UV-Licht zügig mit einem sterilen Skalpel ausgeschnitten und in einen 1,5 ml oder 2,0 ml Eppendorfgefäß gepackt (ca. 250 mg Agarose). Anschließend wurden die Sammelgefäße gewogen, und zu den Gelstückchen wurde das dreifache Volumen an QX1-Puffer zugegeben. QX1-Bestandteile spalten Bindungen zwischen Agarosemolekülen. Dann wurden 20 µl der QIAEX II (einer Suspension, die die DNA bindet) zum Gel-QX1-Gemisch zugesetzt. Die Proben wurden bei 50°C für 10 min inkubiert und alle zwei Minuten gemixt, um die QIAEX II in der Lösung zu halten. Es folgten mehrere Waschschrte mit je 500 µl QX1-Puffer, zweimal PE-Puffer. Dazwischen wurde bei 13.000 rpm 30 Sekunden zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Der Pellet wurde 10-15 min luftgetrocknet bis es weißlich wurde. Zur DNA-Elution wurde der Pellet in 20 µl DEPC-Wasser durch Mixen aufgelöst und je nach Länge des Amplikons bei Raumtemperatur oder bei 50°C über 5-10 min inkubiert. Letztens wurde bei 13.000 rpm 30 Sekunden zentrifugiert und der DNAhaltiger Überstand vorsichtig in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt.
- DNA-Extraktion aus dem 2%-Agarosegel mit Turbo Nucleic Acid Purification Kit von GeneClean basiert auf einem ähnlichen Prinzip wie QiagenKit QIAEX II, nur es werden bei der DNA-Extraktion spezielle „GeneClean® Turbo Cartridges“, Glasmilchmembransäulen zur Bindung der DNA, verwendet.

Alle Sequenzbestimmungen von PCR-Produkten wurden von SEQLAB Göttingen nach dem Prinzip der asymmetrischen Sequenzierung durchgeführt.

Die Proben für die Sequenzierung bei SEQLAB in Göttingen wurden nach dem folgenden Pipettierschema zusammengestellt (Tab.15).

KOMPONENTEN	VOLUMEN
dsDNA, 100 ng	~ 2-6,6 µl (konzentrationsabhängig)
Vor- oder Rückwärtsprimer, 20 pmol	~ 0,4 µl (50 pmol-Stammlösung)
DEPC-Wasser	restliches Volumen
<i>Totalvolumen:</i>	7 µl

Tabelle 15: Pipettierschema für die Sequenzierungsreaktion.

Die Sequenzierungsergebnisse wurden dann zugeschickt und mit den vorhergesagten Sequenzen verglichen (Alignment). Durch Überprüfung in BLAST wurde die Identität der PCR-Produkte bestimmt.

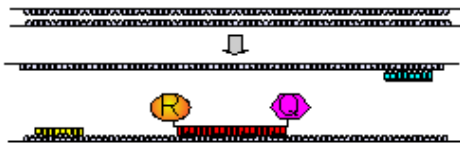
2.2.10 Real-Time PCR

2.2.10.1 Grundprinzip der Real-Time PCR

Dieses von Lee et al. 1993 bei Applied Biosystems entwickelte sogenannte TaqMan[®] PCR Assay basiert auf dem ursprünglichen 5'-Nuclease-Assay und macht sich zunächst ebenfalls die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA Polymerase, wie bei der Polymerase Kettenreaktion, zu Nutze. Mit Hilfe des homogenen Assays wurde es möglich, während der Amplifikation den Nachweis des PCR-Produkts simultan in einem Reaktionsgefäß vorzunehmen. Hierfür wird eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist, um eine Extension des 3'-Endes während der PCR zu vermeiden.

Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des „Reporter“-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum „Quencher“ durch einen Fluoreszenz-Energietransfer unterdrückt, so dass nur die Emission des „Quenchers“ messbar ist (Abb. 7A). Während der PCR hybridisieren Primer und Sonde zunächst an den Matrizenstrang (Abb. 7B). In der Extensionsphase trifft die Taq-Polymerase dann auf die Sonde und beginnt sie vom DNA-Strang zu verdrängen (Abb. 7C). Dabei entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird (Abb. 7D). Freie, nicht-hybridisierte Sondenmoleküle bleiben dagegen intakt.

A. Denaturierung, Annealing von Primern und Sonde



B. Hybridisierung, Primer-Extension



C. Ausbildung der Y-förmigen Struktur



D. Sondenhydrolyse, Abschlußpolymerisation



Abbildung 7: Prinzip der TaqMan-PCR [1]. Abkürzungen: R, Reporter; Q, Quencher.

Durch die Sondenhydrolyse werden die räumliche Nähe und damit auch der Fluoreszenz-Energietransfer zwischen „Reporter“ und „Quencher“ unterbrochen. „Reporter“ und „Quencher“ fluoreszieren nun in zwei getrennten Wellenlängenbereichen. Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes steigt auch die Fluoreszenz des freigesetzten „Reporters“ mit jedem Amplifikationszyklus an. Dabei führt weder die unspezifische Bindung der Primer noch die der Sonde zu einem Anstieg der „Reporter“-Fluoreszenz, da die Sondenhydrolyse nur dann erfolgt, wenn zwischen den Primern auch die Sonde bindet bzw. die Sequenz, an die die Sonde bindet, während der PCR amplifiziert wird. Die Veränderung der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe wird mit Hilfe des ABI PRISM 7000 Sequence Detection System Thermal Cycler im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst [1].

2.2.10.2 Real-Time PCR für Axin

Für die TaqMan-PCR wurde der „TaqMan[®] Universal PCR Master Mix“ von Applied Biosystems verwendet. Dieser bereits optimierte Puffer enthält alle notwendigen Substanzen außer den Primern, der Sonde und der zu untersuchenden cDNA. An Stelle von dTTP wird dUTP eingesetzt. Außerdem sind noch das Enzym AmpErase UNG und der Referenzfarbstoff SYBR[®] GREEN enthalten. Das Enzym verhindert die Reamplifikation von Kontaminationen aus vorangegangenen PCRs, indem es die Uracil-Reste aus doppelsträngiger DNA entfernt. SYBR[®] GREEN besitzt die Eigenschaft, sich in die „Minor Groove“ („kleine Furche“) der Doppelstrang-DNA einzulagern (Abb. 8B). Durch diese Bindung wird die ermittelte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein vielfaches verstärkt und man erhält ein Signal, dessen

Intensität direkt proportional zu der Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist (Abb. 8C), so dass auf die Hybridisierungssonde verzichtet wurde [11].

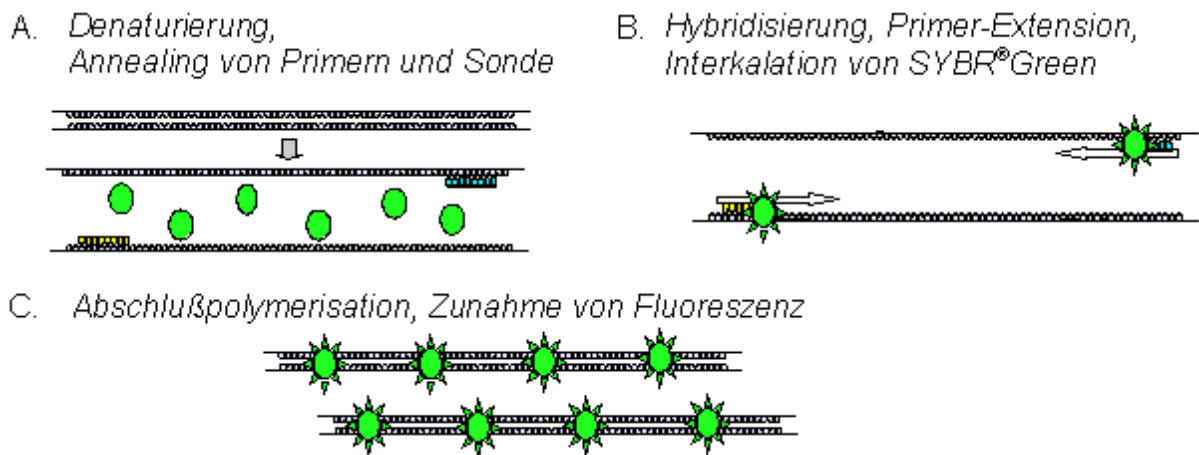


Abbildung 8: Prinzip der Taqman-Axin1 Real-Time PCR mit interkalierendem Farbstoff SYBR[®] Green.

Die Verwendung von SYBR[®] GREEN verlangt eine hohe Spezifität bei der Auswahl von Primern. Unten sind Sequenzen von in der TaqMan Real-Time PCR verwendeten Primern angegeben. Sie wurden mit der ABIPRISM[®] Primer Express[®] Software für die TaqMan-PCR unter Verwendung der voreingestellten Parameter ausgewählt.

Die Lage von Primer in der *Axin* DNA-Sequenz ist in der Abb. 9 schematisch dargestellt. Die Lokalisation des T1 For-Primer erlaubt den Nachweis nur der konstitutiven *Axin*-Isoform, während der die Skipstelle überspannender T2 For-Primer spezifisch für das kurze alternative Produkt ist (Sequenzinformation in Tab.16). Durch strenge Primerplatzierung wurde auf den Einsatz spezieller Sonden verzichtet.

	SEQUENZ	T [°C]	PCR-PRODUKT [BP]
<i>Axin1</i>	F-T1:AGCCGTGTCGGACATGGA	59,6	T1:104
	R-T1:AAGTAGTACGCCACAACGATGCT	58,9	
	F-T2:GCACCCTCCAAGCAGAGAGA	59,1	T2:94
	R-T2:CGCAGAAGTAGTACGCCACAAC	58,6	

Tabelle 16: Primer für die *Axin1* Real-Time-PCR. Abkürzungen: T - Schmelztemperatur, F - Vorwärtsprimer, R - Rückwärtsprimer.

Zur Optimierung der PCR wurde die Amplifikation bei verschiedenen Primerkonzentrationen (50–900 nM) ausprobiert. Die optimalen Endkonzentrationen, bei denen ein möglichst niedriger C_T-Wert und gleichzeitig ein möglichst hoher Rn-Wert

erreicht werden, liegen für T1-Primer bei 100 nM und für T2-Primer bei 200 nM.

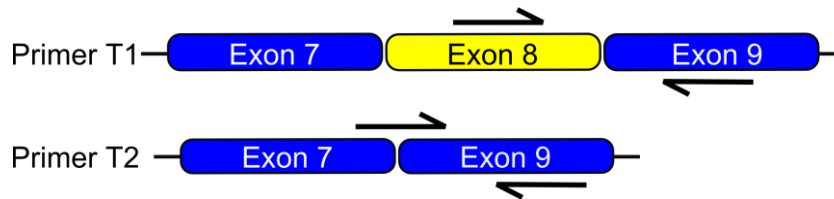


Abbildung 9: *Axin1*, Primer-Lokalisation für Real-Time Amplikons. T1 - weist nur die normale, konstitutive gespleißte Isoform und T2 - nur die alternative Isoform nach.

Die PCR erfolgte in 20 µl-Ansätzen, wobei für die Patienten cDNA-Proben jeweils Dreifachansätze mit jedem Primerpaar nach dem unten stehenden Pipettierschema amplifiziert wurden (Tab.17).

KOMPONENTEN	VOLUMEN PRO REAKTION, FÜR REAL-TIME PCR DES ZIELGENS:		
	<i>β-Actin</i>	<i>Axin1 Konst. Isoform</i> (100 nM T1-Primer)	<i>Axin1 Alt. Isoform</i> (200 nM T2-Primer)
cDNA	100 ng	100 ng	100 ng
2x SYBR Green			
Master Mix	10,0 µl	10,0 µl	10,0 µl
Vorwärtsprimer	0,6 µl	0,4 µl	0,8 µl
Rückwärtsprimer	0,6 µl	0,4 µl	0,8 µl
DEPC	8,0 µl	9,2 µl	8,4 µl
<i>Totalvolumen:</i>	20 µl	20 µl	20 µl

Tabelle 17: Real-Time PCR-Pipettierschema pro Reaktion für Zielgene *β-Actin* und *Axin1*-Isoformen.

Die Ansätze erfolgten in MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate. Die Daten wurden gemessen und analysiert im ABI PRISM 7000 Sequence Detection System Thermal Cycler. Die Bedingungen für die TaqMan-PCR wurden wie folgt gewählt: Initialisierungsphase 10 min bei 95°C, danach 40 Zyklen zusammengesetzt aus 15 sec bei 95°C und 1 min bei 62°C. Nach der Amplifikation wurden die Dissoziationsschmelzkurven aufgezeichnet. Dabei kommt es durch schrittweise erfolgten Temperaturanstieg zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge entsprechend ihrer jeweiligen Schmelzpunkte in ihre Einzelstränge. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme von SYBR[®] GREEN wird als Graph aufgezeichnet. Aufgrund der Schmelztemperaturen kann zwischen spezifischen Produkten und Primerdimeren unterschieden werden. Primerdimere zerfallen bei geringeren Temperaturen als die spezifischen, größeren PCR-Produkte.

2.2.10.3 Auswertung der Real-Time PCR für Axin mittels relativer Quantifizierung nach der vergleichenden CT-Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)

Im Verlauf der weiteren Analyse wurden nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode entsprechend der Anwendungsbeschreibung im ABI PRISM 7000 Sequence Detection System User Bulletin ausgewertet [1].

Bei dieser Form der Quantifizierung soll die Zielsequenz (*Axin*) relativ in ihrer Expression zu einer zweiten, nicht verwandten Sequenz bestimmt werden. Dabei wird die unbekannte Menge der Zielsequenz semiquantitativ (bezogen auf das Signal der zweiten Sequenz) abgeschätzt. Als Standard diene hier das Housekeeping-Gen β -*Actin*.

In der frühen Phase der PCR ändert sich das Fluoreszenzsignal kaum. In diesem Bereich wird das Hintergrundsignal ermittelt (Abb. 10). Als Maß für die Fluoreszenz dient der ΔR_n -Wert, der aus dem normalisierten „Reporter“-Signal (R_n) abzüglich des Hintergrundsignals berechnet wird. Der R_n -Wert entspricht dabei dem Quotienten der Emissionsintensität des „Reporter“-Farbstoffs dividiert durch die Emissionsintensität des Referenzfarbstoffes. Die Normalisierung durch den Referenzfarbstoff dient dem Ausgleich unspezifischer Schwankungen, wie z.B. Konzentrationsschwankungen aufgrund von Volumenänderungen (z. B. bei Pipetierfehlern). In der *Axin*-Real-Time PCR wurde der interkalierende Farbstoff SYBR[®] GREEN verwendet.

Die Quantifizierung der PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes, dem so genannten Threshold cycle oder C_T -Wert (Abb. 10). Der C_T -Wert drückt diejenige Zyklenzahl aus, an dem die „Reporter“-Fluoreszenz erstmals einen bestimmten Schwellenwert (*engl. threshold*) oberhalb der Basislinie erreicht. Der Schwellenwert wird so gewählt, dass er die Amplifikationskurven der zu vergleichenden Proben in der exponentiellen Phase schneidet. Je höher die Ausgangskonzentration der Zielsequenz zu Beginn der PCR ist, desto eher wird der Schwellenwert erreicht und desto niedriger ist der C_T -Wert.

Im Gegensatz zur „absoluten Quantifizierung“, bei der die Startkopienzahl des Standards bekannt ist, wird bei dieser Form der Quantifizierung die Expression der Zielsequenz relativ zu einem Kalibrator (Standardprobenmaterial/-gewebe) bestimmt. Für die *Axin*-Real-Time PCR wurden die C_T -Werte der Zelllinie LS174T als Kalibrator gewählt. Die LS174T wurde bei jedem PCR-Durchgang mitamplifiziert. Sie wird in der Auswertung auf alle Werte der Patientenproben bezogen, um so Ansätze aus

verschiedenen Amplifikationsläufen miteinander zu vergleichen. Der Kalibrator wird dadurch zur „1 x Probe“, und die Expression der unbekanntes Proben kann als n-facher Unterschied relativ zum Kalibrator angegeben werden.

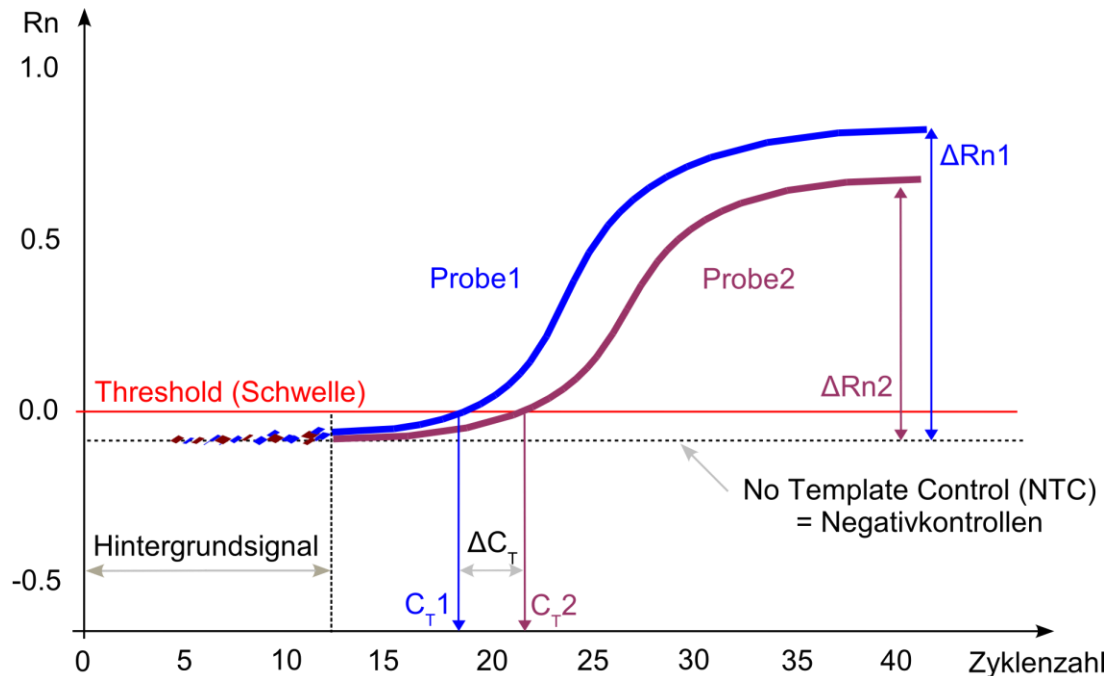


Abbildung 10: Schema eines Taqman-Amplifikationsplots.

2.2.10.4 Grundlagen zur Berechnung der relativen Expressionsmenge einer Zielsequenz

Im Folgenden sind die zur relativen Quantifizierung verwendeten Formeln dargestellt (Auszug aus Schild T.: 7700 SDS Workshop, Einführung in die Real-Time TaqMan[®] PCR-Technologie. Applied Biosystems GmbH Weiterstadt; Version 2.1 [75]):

Die PCR ist eine exponentiell verlaufende Reaktion, bei der unter Annahme einer 100%igen Effizienz der Reaktion eine Verdopplung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus erfolgt. Sie kann daher mathematisch wie folgt beschrieben werden:

$$(1) \quad Y = X * (1 + E)^n$$

Y = Menge an hergestelltem Amplifikat

X = Startkopienzahl zu Beginn der PCR

E = Effizienz der Reaktion

n = Anzahl der PCR Zyklen

Die Grundgleichung der PCR (Formel 1) lässt sich zum Zeitpunkt des Überschreitens des Schwellenwerts (C_T -Wert) für die Zielsequenz (A_{xin}) wie folgt beschreiben:

$$(2) \quad X_T = X_0 * (1 + E)^{C_{T,X}} = konst.$$

X_T = Anzahl der hergestellten Zielsequenzmoleküle beim C_T -Wert

X_0 = Startkopienzahl Zielsequenzmoleküle

E_X = Effizienz der Zielsequenz-Amplifikation

$C_{T,X}$ = Thresholdwert für die Zielsequenz

Dementsprechend lautet sie für die endogene Referenz (β -Actin):

$$(3) \quad R_T = R_0 * (1 + E_R)^{C_{T,R}} = konst.$$

R_T = Anzahl der hergestellten Referenzmoleküle beim C_T -Wert

R_0 = Startkopienzahl Referenzmoleküle

E_R = Effizienz der Referenz-Amplifikation

$C_{T,R}$ = Thresholdwert für die Referenz

Wenn man X_T durch R_T dividiert, erhält man die folgende Gleichung (wobei K eine Konstante ist):

$$(4) \quad \frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 * (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 * (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = K$$

Wenn die Effizienzen der beiden Reaktionen gleich sind ($E_X = E_R = E$) dann gilt:

$$(5) \quad \frac{X_0}{R_0} * (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K$$

oder:

$$(6) \quad X_N * (1 + E)^{\Delta C_T} = K$$

$X_N = X_0/R_0$, d.h. normalisierter Wert der Zielsequenz.

$\Delta C_T = C_{T,X} - C_{T,R}$, d.h. der Unterschied an Thresholdzyklen für Zielsequenz und Referenz.

Die C_T -Werte wurden aus dem ABI Prism 7000 SDS Software exportiert. Für jede Patientenprobe wurden drei Werte für die jeweils zu untersuchende Gensequenz gemessen, so dass sich der ΔC_T -Wert der Probe wie folgt berechnet:

$$\Delta C_T (\text{Probe}) = \text{Mittelwert-}C_T (\text{Probe}) - \text{Mittelwert-}C_T (\text{Referenz})$$

Das Ergebnis ist ein ΔC_T -Wert, der größer oder kleiner ist als der des Kalibrators. Proben mit einem positiven ΔC_T -Wert haben eine höhere Ausgangskonzentration als

der Kalibrator, während Proben mit einem negativen ΔC_T -Wert eine niedrigere Ausgangskonzentration besitzen.

Die Gleichung 6 lässt sich wie folgt zur Berechnung des normalisierten Zielsequenzwertes umstellen:

$$(7) \quad X_N = K * (1 + E)^{\Delta C_T}$$

Schließlich muss noch X_N für jedes Gewebe (=x) durch den $X_{N,KB}$ -Wert des Kalibrators dividiert werden:

$$(8) \quad \frac{X_{N,X}}{X_{N,KB}} = \frac{K * (1 + E)^{-\Delta C_{T,X}}}{K * (1 + E)^{-\Delta C_{T,KB}}}$$

$$(9) \quad \frac{X_{N,X}}{X_{N,KB}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

wobei: $\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,X} - \Delta C_{T,KB}$

Für die empfohlene Amplifikatgröße von <150 bp liegt die Effizienz der Reaktion sehr nahe bei 100 %. Deswegen lässt sich die Konzentration der Zielsequenz (*Axin1*), normalisiert mit einer endogenen Referenz (*β -Actin*) und relativ zu einem Kalibrator (LS174T-Zelllinie) näherungsweise wie folgt berechnen:

$$(10) \quad X_{N,Kalibrator} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

2.2.11 Datenverarbeitung und Statistik

Die im Testreport vom TaqmanCycler herausgegebenen Roh- C_T -Werte wurden exportiert und anhand der oben genannten Formeln zur Ermittlung der relativen Expressionsmenge weiterverarbeitet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Softwarepaket SPSS für Windows, Version 10. Die Unterschiede zwischen der mRNA-Expression im Tumorgewebe und in gesunder Mucosa der Patienten wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Rangtestes ausgewertet. Der Zusammenhang zwischen klinischen Daten der Tumorpatienten und der Expression beider *Axin*-Formen wurde im Mann-Whitney-Test untersucht. Als signifikant wurde der Wert $p < 0,05$ angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 β -Catenin (CTNNB1)

- Information zur Spleißstelle:

Für das *CTNNB1*-Gen wurde die Spleißstelle an der Position 2573 untersucht. Bioinformatisch vorhergesagt war ein 160bp-langer Skip, bei dem die Sequenz zwischen der Position 2573 und 2734 in der reifen mRNA fehlen soll (Abb. 11). Das Spleißereignis betrifft Teile von Exon 16, das zum 3'-UTR-Bereich gehört. In der EASED Datenbank am MDC ist die konstitutive Form (lange Sequenz ohne Skip) durch insgesamt 47 ESTs (davon 27 ESTs aus Krebsgewebe) beschrieben. Für die alternative Spleißform (kurze Sequenz mit Skip) wurden folgende Angaben gemacht: insgesamt 34 ESTs und 21 davon aus Tumor.

Da die Spleißstelle außerhalb des codierenden DNA-Bereiches liegt, hat sie keinen Einfluss auf die Proteinfunktion, obwohl regulatorische Aufgaben auf der RNA-Ebene denkbar sind.

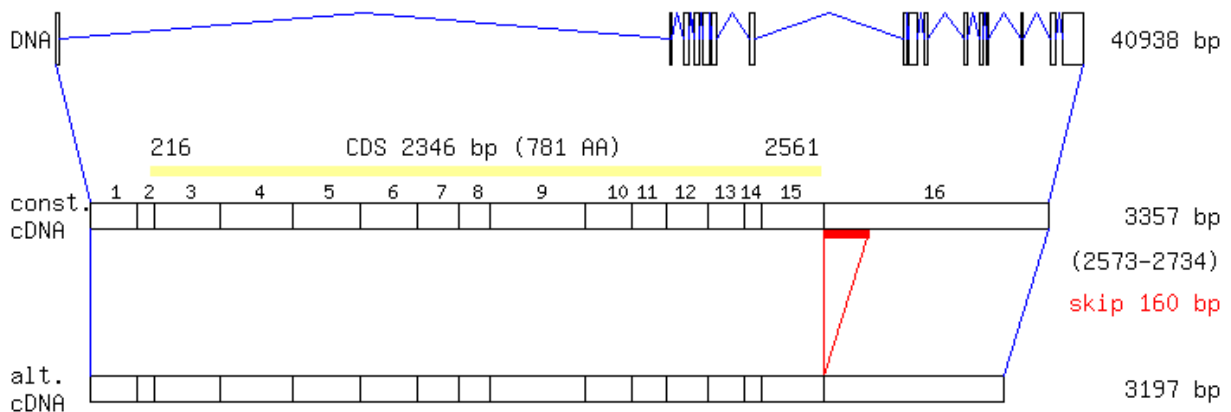


Abbildung 11: *CTNNB1* konstitutive und alternative Spleißform (*CTNNB1(a)*). Dargestellt ist die genomische DNA mit Exons als Kästchen und Introns als blaue Linien; in der Mitte in gelb der codierende DNA-Bereich; der Skip entspricht der dicken roten Linie. Abkürzungen: const. cDNA - normale oder konstitutive Spleißisoform, alt. cDNA - alternative Spleißisoform, bp – Basenpaare, AA-Aminosäuren.

- PCR-Ergebnisse:

Die Reaktion wurde mit der cDNA aus sechs Zelllinien (Kolon: LS 174T, SW480, HCT 116, HT 29; Mamma: MDA MB 435, MCF 7), OP-Material (jeweils gesundes und

krebsverändertes Gewebe von 10 Patienten, also 20 PCR-Ansätze) und 2 Proben von endoskopisch gewonnenen gesunder Mucosa durchgeführt.

Unter der Anwendung von speziellen Primern sind zwei PCR-Produkte von 329 bzw. 168 bp-Länge möglich.

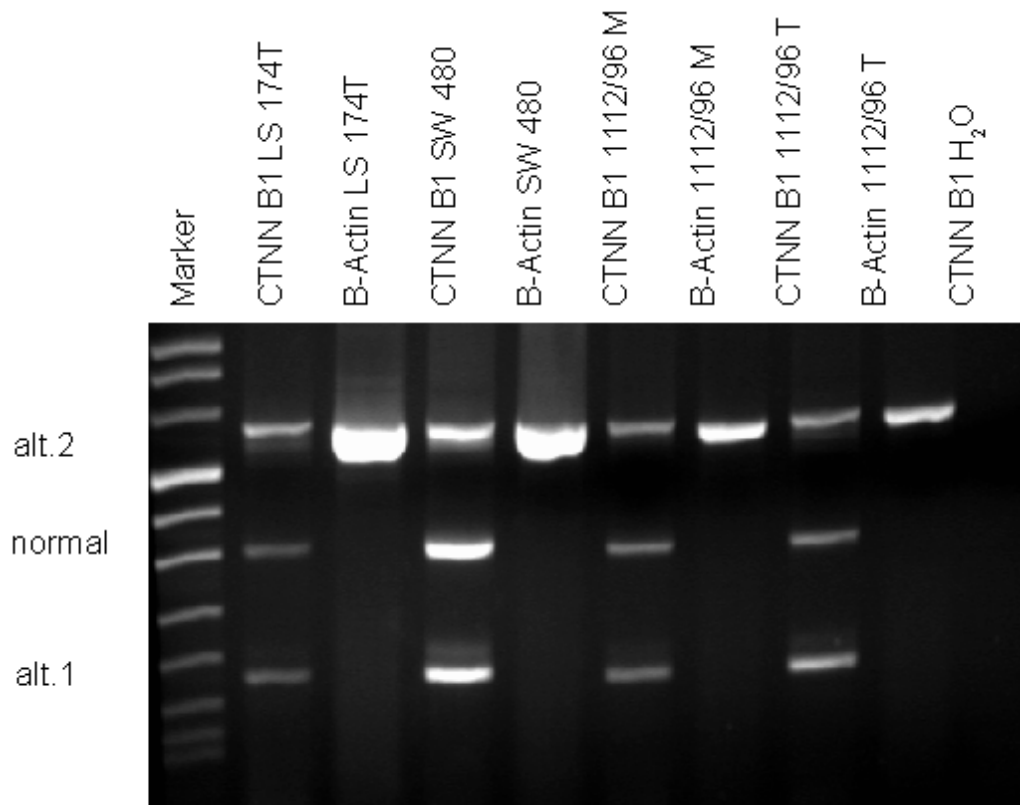


Abbildung 12: *CTNNB1* und β -Actin Expression. Abkürzungen: M, Mucosa ; T, Krebsgewebe; H₂O, negative Kontrolle; normal, konstitutive *CTNNB1*-Isoform; alt.1 und alt.2, Alternative Spleißprodukte.

Ähnliches Verhalten wie in der ausgewählten Geldokumentation (Abb. 12) ist auch in allen anderen Zell- und Patientenproben zu beobachten. In allen Proben zeigte sich sowohl das Vorkommen konstitutiver als auch alternativer Spleißform auf dem gleichen Expressionslevel, so dass weder von einem qualitativen noch von einem quantitativen Expressionsunterschied zwischen Tumor und Normalgewebe gesprochen werden kann. Die bioinformatisch vorhergesagte Isoform entspricht dem mit alt.1 in der Abbildung bezeichneten PCR-Produkt.

Ebenfalls in allen PCR-Ansätzen kam ein ca. 692bp-langes bisher nicht bekanntes Produkt, in der Abbildung als alt.2 gekennzeichnet, vor.

- Sequenzierung:

Von allen drei Produkten wurden die Sequenzen bestimmt. Exakt konnten konstitutive und alternative Form bei der Sequenzierung bestätigt werden (Abb. 13A, 13B).

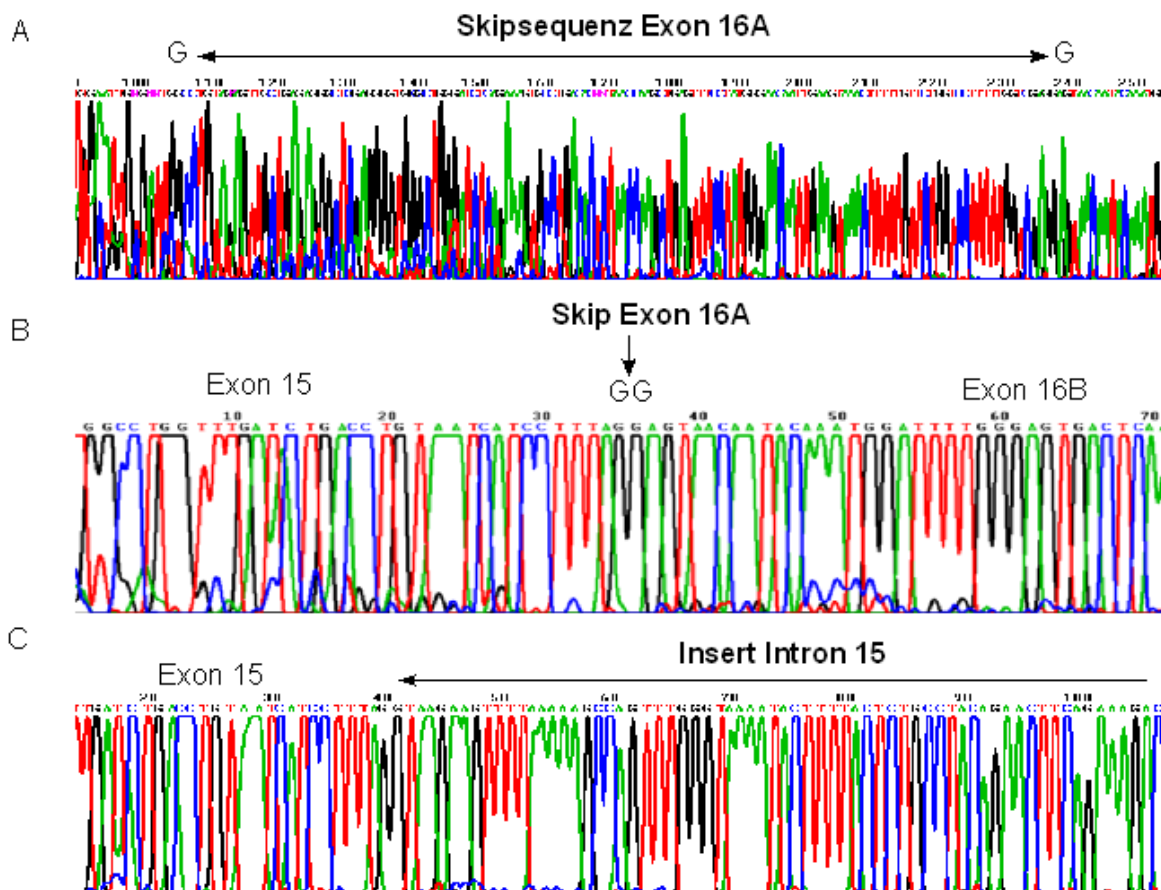


Abbildung 13: *CTNNB1* Sequenzierungsergebnisse. (A) Konstitutive Form mit Skipsequenz des Exons 16A, schwarzer Pfeil; (B) Alternative Form *CTNNB1(a)* mit Skip, die Spleißgrenzen umfassende Nukleotide GG des 15.- und 16B.-Exons liegen beieinander; (C) Alternative Form *CTNNB1(b)* mit Insert des Introns 15, schwarzer Pfeil.

Der unerwarteten 692bp-Form konnte in der GenBank die Sequenz Ab062292:2224 zugeordnet werden. Dieses längste Spleißprodukt enthält sowohl das vorangehende Intron 15 in seiner ganzen Länge wie auch die Skipsequenz, die dem 5'-Anteil von Exon 16 entspricht (Abb.13C und 14). Durch erneutes Durchsuchen der EASED- Datenbank des MDC konnte auch die *CTNNB1(b)*- Form als mögliche Spleißvariante identifiziert werden.

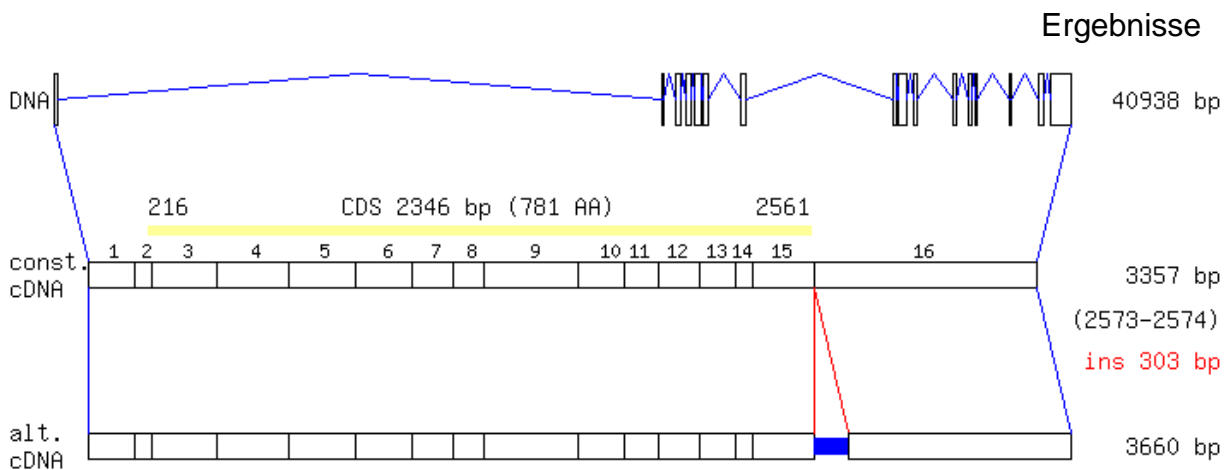


Abbildung 14: *CTNNB1* konstitutive und zweite alternative Spleißform (*CTNNB1(b)*). Dargestellt ist die genomische DNA mit Exons als Kästchen und Introns als blaue Linien; in der Mitte in gelb der codierende DNA-Bereich; das Insert entspricht der dicken blauen Linie. Abkürzungen: const. cDNA - normale oder konstitutive Spleißisoform, alt. cDNA - Alternative Spleißisoform, bp - Basenpaare, AA - Aminosäuren.

3.2 CtBP1

Für das Gen *CtBP1* wurden zwei Spleißereignisse zur experimentellen Testung ausgewählt.

3.2.1 CtBP1 (1), erste Spleißvariation

- Information zur Spleißstelle:

Hier bestimmt ein Insert von 194 bp an der mRNA-Position 79/80 die alternative Isoformsequenz (Abb. 15). Als Insert wird ein vollständiges Intron 1 eingebaut. Die Existenz der insertenthaltenden alternativen Spleißform wird durch 32 ESTs vorhergesagt.

Im Protein der alternativen Spleißform sollen durch das geänderte Startcodon 51 Aminosäuren fehlen und die 2Hacid-DH-Domäne kürzer sein.

- PCR-Ergebnisse:

Die Reaktion wurde mit der cDNA aus sechs Zelllinien (Kolon LS 174T, SW480, HCT 116, HT 29; Mamma MDA MB 435, MCF 7), OP-Material (jeweils gesundes und krebserkranktes Gewebe von 10 Patienten, also 20 PCR-Ansätze) und 2 Proben vom koloskopisch gewonnenen gesunden Gewebe durchgeführt. Ein 63 bp-langes Produkt soll der konstitutiven und ein 258 bp-langes Amplikon der alternativen Form entsprechen (Abb. 16).

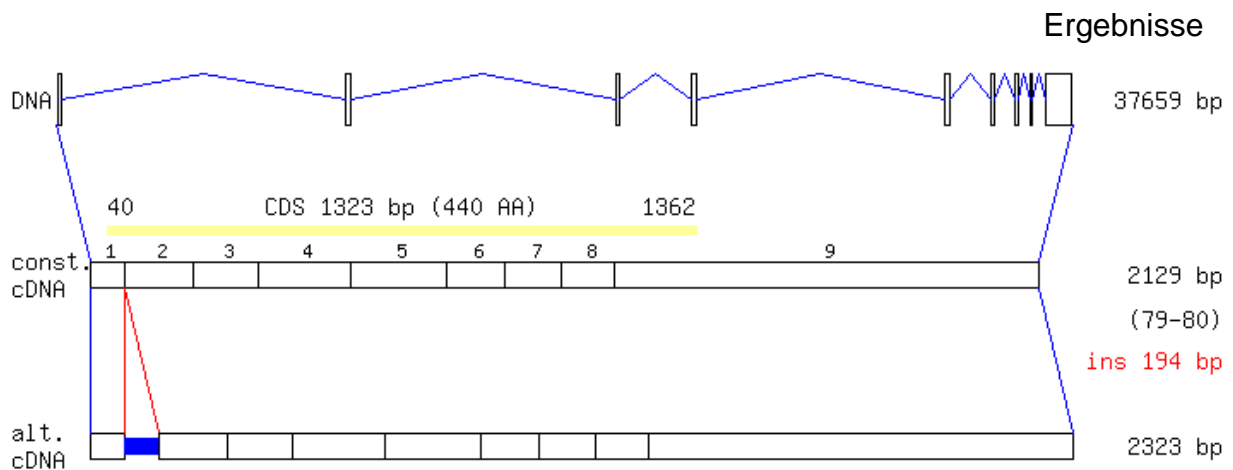


Abbildung 15: *CtBP1* (1) konstitutive und alternative Form. Dargestellt ist die genomische DNA mit Exons als Kästchen und Introns als blaue Linien; in der Mitte in gelb der codierende DNA-Bereich; das Insert entspricht der dicken blauen Linie. Abkürzungen: const. cDNA - normale oder konstitutive Spleißisoform, alt. cDNA - Alternative Spleißisoform, bp - Basenpaare, AA - Aminosäuren.

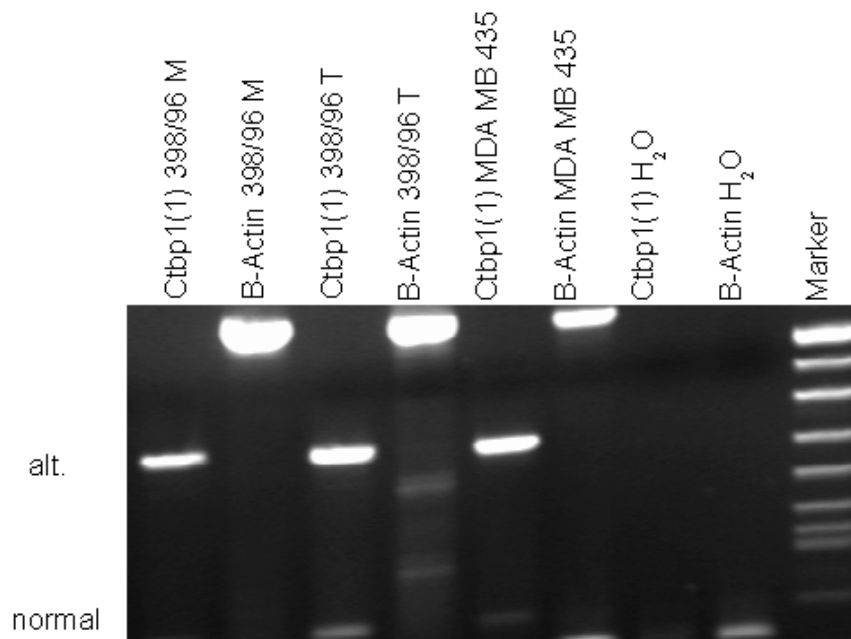


Abbildung 16: *CtBP1* (1) und β -Actin Expression. Abkürzungen: M, Mucosa; T, Krebsgewebe; H₂O, Negative Kontrolle; normal, konstitutive *CtBP1*-Isoform; alt., Alternatives Spleißprodukt.

Es liegt kein qualitativer oder quantitativer Expressionsunterschied zwischen gesundem und krebserkranktem Gewebe vor. In allen Patientenproben und in Zelllinien sind beide Spleißformen zu finden. Im Bezug aber auf jede einzelne PCR-Reaktion zeigt die als konstitutiv angenommene Spleißform in allen Reaktionsansätzen ein sehr schwaches Signal.

- Sequenzierung:

Die Sequenz der alternativen Spleißform zeigt in den Sequenzierungsergebnissen deutlich das Insert. In Ensembl gibt es keine Sequenz, die diese alternative Form beschreibt. NCBI aber gibt genau die bestimmte alternative Form NM_001328.2 wieder. Im Vergleich zur alten Ensembl-Version 28 Februar 2005 (Intronlänge 195 bp) zeigt das aktuelle Release 40 einen 10.578 bp-langen Intron 1-2, welches die alte Insertsequenz von 195bp als ein Exon an der Positionen 7397(3182)-7591(2988) enthält.

3.2.2 CtBP1 (2), zweite Spleißvariation

Diese Spleißstelle wurde, ohne Benutzung der EASED-Datenbank, durch Test des EASED-Algorithmus mit der Refseq NM_001892.1 ausgewählt und ist daher nicht in der Tabelle 8 aufgeführt.

- Information zur Spleißstelle:

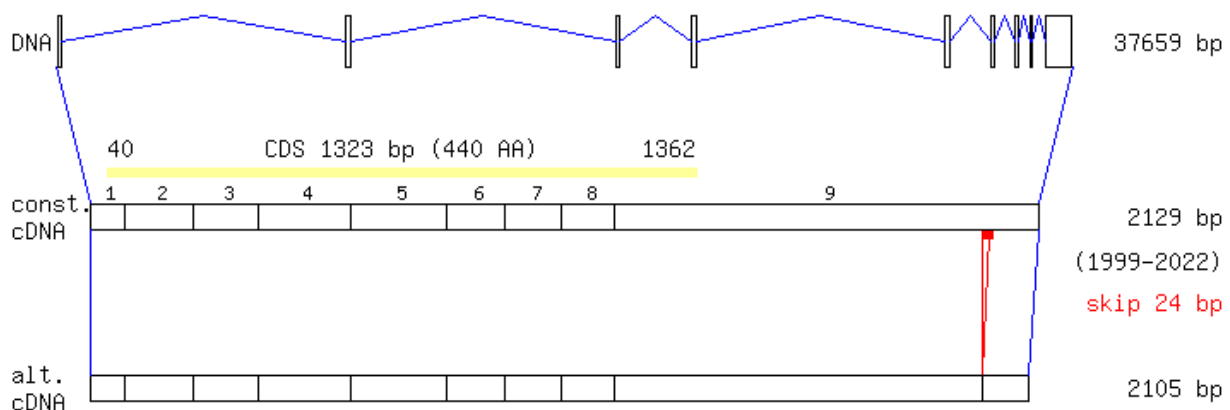


Abbildung 17: *CtBP1* (2) konstitutive und alternative Form. Dargestellt ist die genomische DNA mit Exons als Kästchen und Introns als blaue Linien; in der Mitte in gelb der codierende DNA-Bereich; der Skipbereich entspricht der dicken roten Linie. Abkürzungen: const. cDNA - normale oder konstitutive Spleißisoform, alt. cDNA - Alternative Spleißisoform, bp - Basenpaare, AA - Aminosäuren..

Als interessant wurde der Skip von 24 bp an der mRNA-Position 1999/2000 eingestuft (Abb. 17). Dabei soll ein winziges Stück aus dem Inneren des Exons 9 entfernt werden. 70 ESTs haben die alternative Form vorhergesagt, aber keine die konstitutive Form. Allerdings liegt das Spleißereignis außerhalb des codierenden mRNA-Bereiches. Diese Spleißstelle wird von GenBank angegeben, nicht jedoch in Ensembl.

Die Spleißstelle liegt im nicht codierenden DNA-Bereich und hat wahrscheinlich

keine Auswirkung auf die Proteinsequenz.

- PCR-Ergebnisse:

Die Reaktion wurde mit der cDNA aus sechs Zelllinien (Kolon LS 174T, SW480, HCT 116, HT 29; Mamma MDA MB 435, MCF 7), OP-Material (jeweils gesundes und krebserkranktes Gewebe von 10 Patienten, also 20 PCR-Ansätze) und 2 Proben vom koloskopisch gewonnenen gesunden Gewebe durchgeführt.

Eine PCR mit speziellen Primern soll dann zu 120 bp- und 144 bp-langen Produkten führen.

Es wurde nur die konstitutive 144bp-Form in allen Reaktionsansätzen nachgewiesen (Abb. 18).

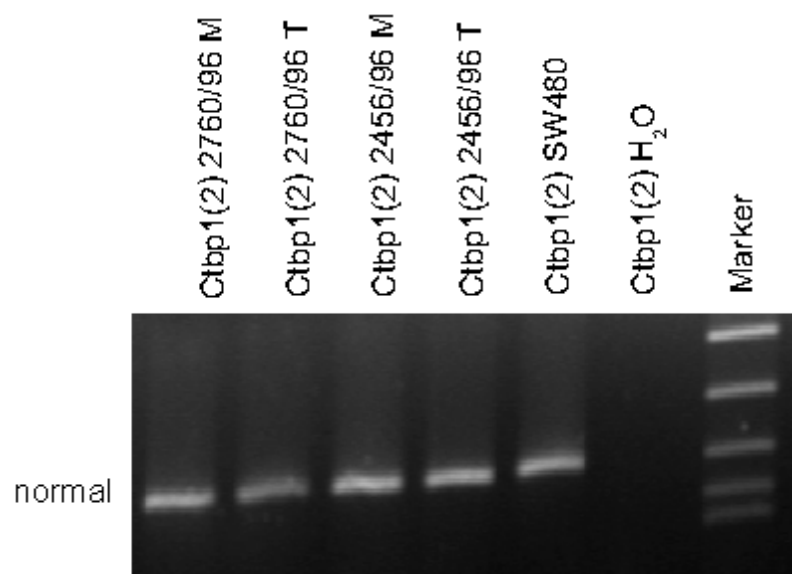


Abbildung 18: *CtBP1* (2) Expression. Abkürzungen: M, Mucosa ; T, Krebsgewebe; H₂O, Negative Kontrolle; normal, konstitutive *CtBP1* (2)-Isoform.

- Sequenzierung:

Die Sequenz von der konstitutiven Form wurde von SEQLAB Göttingen bestätigt.

3.3 CK1A1

- Information zur Spleißstelle:

Das Interesse erweckte bei diesem Gen ein Skip an der mRNA-Position 1104-1145 (Abb. 19). Die fehlenden 40 Basenpaare in der alternativen Form stammen aus dem Exon 9. 34 ESTs sprechen für das Vorkommen der alternativen Spleißform.

Ergebnisse

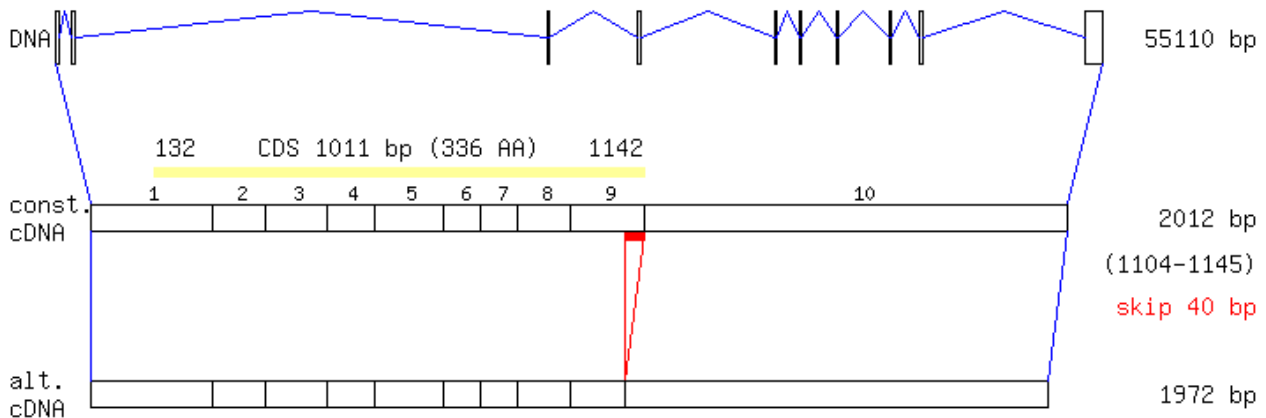


Abbildung 19: *CK1A1* konstitutive und alternative Form. Dargestellt ist die genomische DNA mit Exons als Kästchen und Introns als blaue Linien; in der Mitte in gelb der codierende DNA-Bereich; der Skipbereich entspricht der dicken roten Linie. Abkürzungen: const. cDNA - normale oder konstitutive Spleißisoform, alt. cDNA - Alternative Spleißisoform, bp - Basenpaare, AA - Aminosäuren.

Ein Skip von ca. 13 Aminosäuren nah am C-Terminus der alternativen Form soll das Protein innerhalb der Low Complexity-Domäne mit unbekannter Funktion am C-Terminus verkürzen.

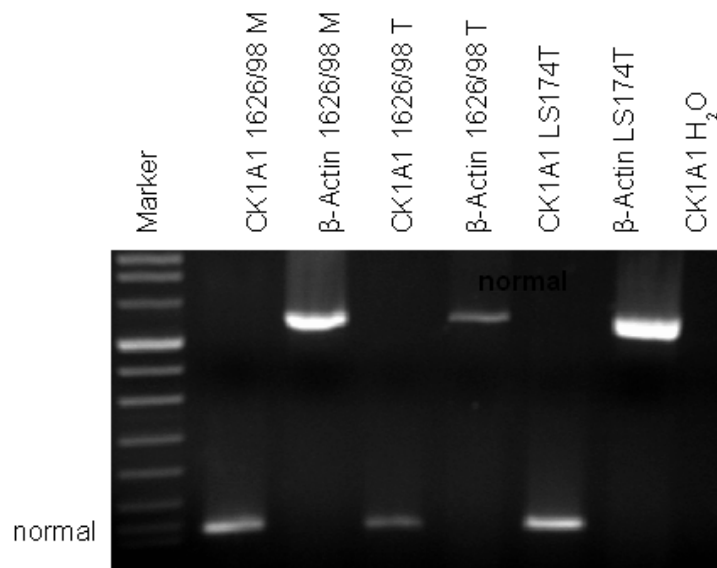


Abbildung 20: *CK1A1* Expression. Abkürzungen: M, Mucosa ; T, Krebsgewebe; H₂O, Negative Kontrolle; normal, konstitutive *CK1A1*-Isoform.

- PCR-Ergebnisse:

Untersucht wurden fünf Zelllinien (Kolon LS 174T, SW480, HCT 116, HT 29; Mamma MDA MB 435), OP-Material (jeweils gesundes und krebsverändertes Gewebe von 10

Patienten, also 20 PCR-Ansätze) und 2 Proben von koloskopisch gewonnenen gesunden Geweben. Die erwarteten Amplikonlängen sollen 118 und 82 bp betragen. Gefunden wurde nur das lange konstitutive Fragment (Abb. 20).

- Sequenzierung:

Die konstitutive Form wurde bestätigt.

3.4 GSK3 β

- Information zur Spleißstelle:

Ein Skip von 39 bp in der Position 1141-1181 beschreibt diese Spleißstelle. 26 ESTs enthalten die alternative Form. Als Zielsequenz für das Spleißen fungiert das gesamte Exon 9 (Abb. 21).

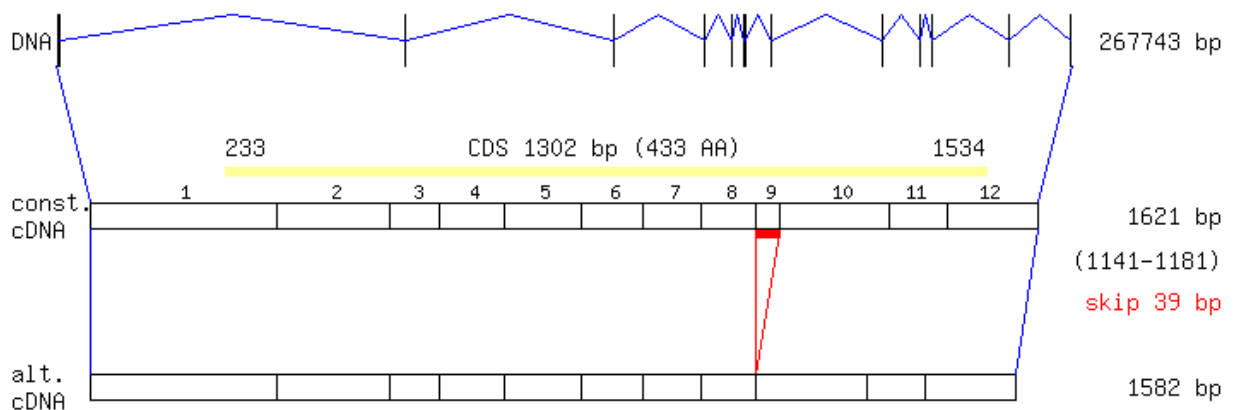


Abbildung 21: *GSK3 β* konstitutive und alternative Form. Dargestellt ist die genomische DNA mit Exons als Kästchen und Introns als blaue Linien; in der Mitte in gelb der codierende DNA-Bereich; der Skipbereich entspricht der dicken roten Linie. Abkürzungen: const. cDNA - normale oder konstitutive Spleißisoform, alt. cDNA - Alternative Spleißisoform, bp - Basenpaare, AA - Aminosäuren.

Beide Transkripte sind schon in Ensembl (ENST00000264235, ENST00000316626) notiert. Ebenfalls ist in Ensembl festgehalten, dass die Proteinkinase-Domäne [56-353 Aminosäure, aa] um 13 Aminosäuren [304-316aa] verkürzt ist.

- PCR-Ergebnisse:

Der konstitutiven Form soll das 134 bp- und der alternativen Form das 96 bp-lange Produkt entsprechen. 5 Zelllinien (Kolon LS 174T, SW480, HCT 116, HT 29; Mamma MDA MB 435), OP-Material, jeweils gesundes und krebserkranktes Gewebe von 12 Patienten (=24 PCR-Ansätze), und 2 Proben der endoskopisch entnommener gesunden Mucosa standen für die Experimente zur Verfügung.

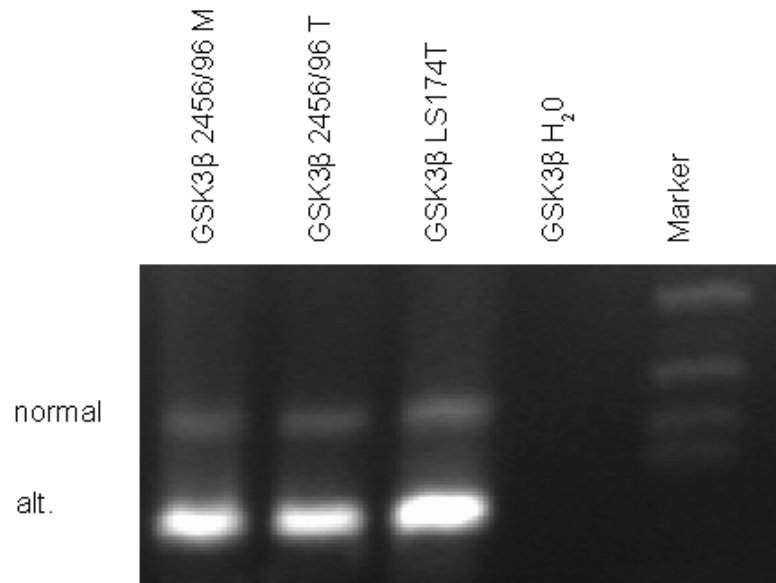


Abbildung 22: *GSK3β* Expression. Abkürzungen: M, Mucosa ; T, Krebsgewebe; H₂O, Negative Kontrolle; normal, konstitutive *GSK3β*-Isoform; alt., Alternatives Spleißprodukt.

In allen PCR-Ansätzen wurde die alternative Form auf einem höheren Level produziert. Es besteht aber weder ein quantitativer noch ein qualitativer Expressionsunterschied zwischen den Tumorproben und gesundem Gewebe (Abb. 22). Beide Transkripte sind schon in der Ensembl-Datenbank (ENST00000264235, ENST00000316626) notiert. Beide Formen wurden sowohl im Kolonkarzinom als auch in der gesunden Mucosa nachgewiesen.

- Sequenzierung:

Die konstitutive Form wurde in ihrer Sequenz bestätigt.

3.5 LRP5

- Information zur Spleißstelle:

Das gesamte Exon 5 wird ab der mRNA-Position 965 ausgeschnitten (Abb. 23). Der Skip beinhaltet 132 bp. ENSG00000162337-Sequenz beschreibt die konstitutive Form. Nur 4 ESTs lassen auf die Existenz der alternativen Form schließen. Alle Klone stammen aus drei verschiedenen Bibliotheken aus Karzinomen (Knochenmark, lymphatisches Gewebe). Im Protein entspricht die Skipsequenz Abschnitten der EGF-like- und PF008-Domäne.

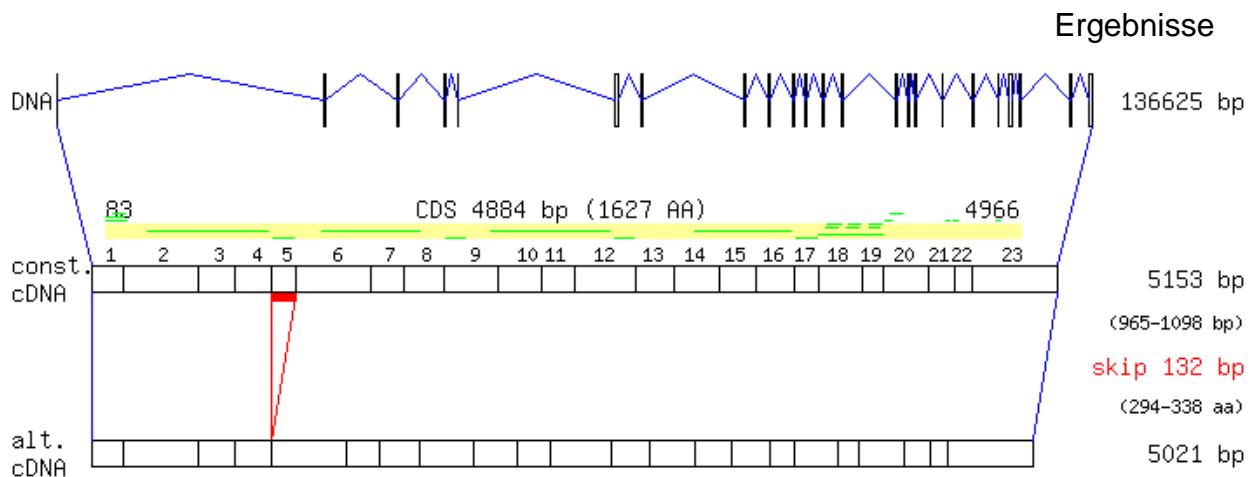


Abbildung 23: *LRP5* konstitutive und alternative Form. Dargestellt ist die genomische DNA mit Exons als Kästchen und Introns als blaue Linien; in der Mitte in gelb der codierende DNA-Bereich; der Skipbereich entspricht der dicken roten Linie. Abkürzungen: const. cDNA - normale oder konstitutive Spleißisoform, alt. cDNA - Alternative Spleißisoform, bp - Basenpaare, AA - Aminosäuren.

- PCR-Ergebnisse:

Der reverse Primer A liegt in der *LRP5*-Sequenz mitten im Skipbereich. Primer B liegen in den benachbarten Exons (Abb. 24). Die PCR wurde mit allen drei Primernukleotiden in einem Reaktionsansatz in Form einer Multiplex PCR durchgeführt. Für die konstitutive Form sprechen demnach PCR-Produkte von 702 und 384 bp, für die alternative nur von 570 bp.

```

601  GCCCCGGATT GAGCGGGCAG GGATGGATGG CAGCACCCGG AAGATCATTG
651  TGGACTCGGA CATTACTGG CCCAATGGAC TGACCATCGA CCTGGAGGAG
701  CAGAAGCTCT ACTGGGCTGA CGCCAAGCTC AGCTTCATCC ACCGTGCCAA
751  CCTGGACGGC TCGTTCGGGC AGAAGGTGGT GGAGGGCAGC CTGACGCACC
801  CCTTCGCCCT GACGCTCTCC GGGGACACTC TGTACTGGAC AGACTGGCAG
851  ACCCGCTCCA TCCATGCCTG CAACAAGCGC ACTGGGGGGA AGAGGAAGGA
901  GATCCTGAGT GCCCTCTACT CACCCATGGA CATCCAGGTG CTGAGCCAGG
951  AGCGGCAGCC TTTCTTCCAC ACTCGCTGTG AGGAGGACAA TGGCGGCTGC
1001 TCCCACCTGT GCCTGCTGTC CCCAAGCGAG CCTTCTACA CATGCGCCTG
1051 CCCACGGGT GTGCAGCTGC AGGACAACGG CAGGACGTGT AAGGCAGGAG
1101 CCGAGGAGGT GCTGCTGCTG GCCCGGCGGA CGGACCTACG GAGGATCTCG
1151 CTGGACACGC CGGACTTCAC CGACATCGTG CTGCAGGTGG ACGACATCCG
1201 GCACGCCATT GCCATCGACT ACGACCCGCT AGAGGGCTAT GTCTACTGGA
1251 CAGATGACGA GGTGCGGGCC ATCCGCAGGG CGTACCTGGA CGGGTCTGGG
1301 GCGCAGACGC TGGTCAACAC CGAGATCAAC GACCCCGATG GCATCGCGGT

```

Abbildung 24: *LRP5*-mRNA-Sequenz. Skip (rot) und Primer (gelb - Primerpaar B, blau – reverser Primer A).

Die PCR wurde mit der cDNA aus 6 Zelllinien (Colon LS 174T, SW480, HCT 116, HT 29; Mamma MDA MB 435, MCF 7), OP-Material (jeweils gesundes und

Ergebnisse

krebsverändertes Gewebe von 10 Patienten, also 20 PCR-Ansätze) und 2 Proben vom gesunden Gewebe, das koloskopisch entnommen wurde, durchgeführt. Das konstitutive und das alternative Spleißprodukt wurden in allen Ansätzen gebildet (Abb. 25). Das alternative Produkt hatte in allen Ansätzen ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal bei der Elektrophorese.

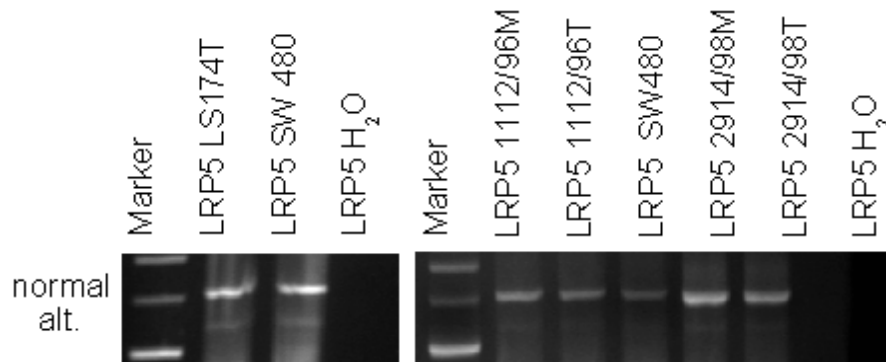


Abbildung 25: *LRP5*-Expression. Abkürzungen: M, Mucosa ; T, Krebsgewebe; H₂O, Negative Kontrolle; normal, konstitutive *LRP5*-Isoform; alt., Alternatives Spleißprodukt.

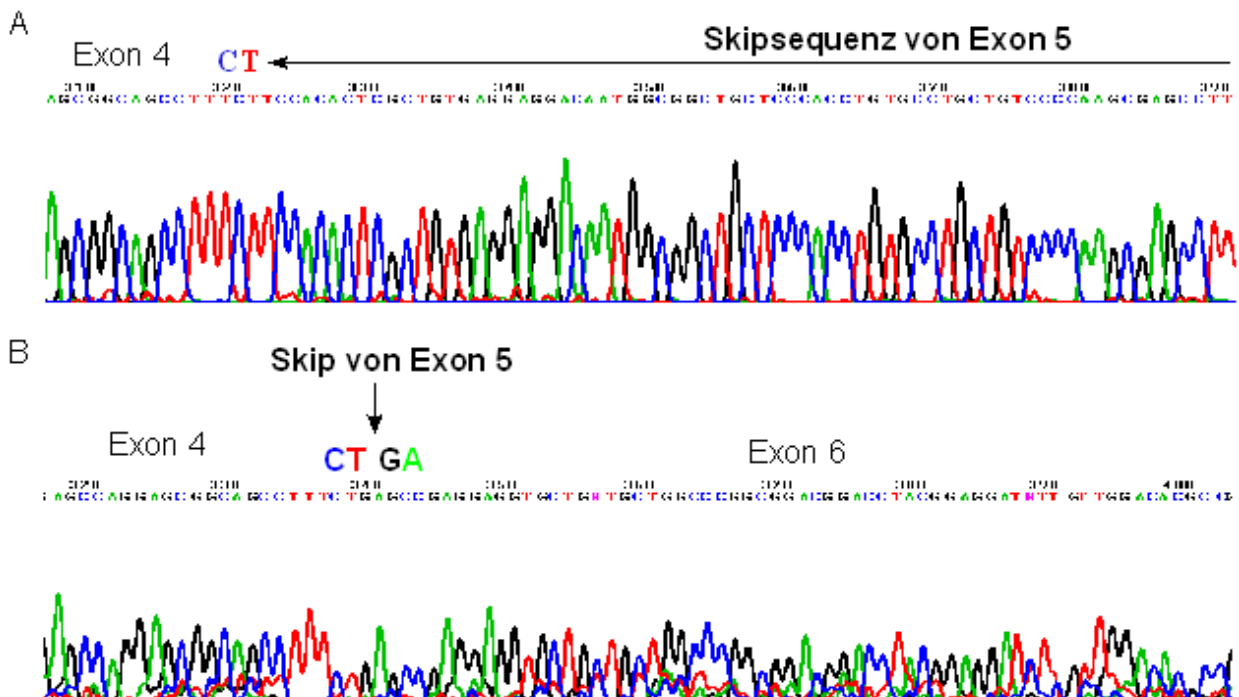


Abbildung 26: *LRP5* Sequenzierergebnisse. (A) Konstitutive Form mit Skipsequenz des Exons 5, schwarzer Pfeil; (B) Alternative Form mit Skip, die Spleißgrenzen umfassende Nukleotide CT-GA des 4. und 6. Exons liegen beieinander.

- Sequenzierung:

Beide Formen wurden von SEQLAB bestätigt. Im konstitutiven Spleißprodukt ist die Skipsequenz vom Exon 5 vorhanden, während in der alternativen mRNA nach dem Exon 4 gleich das Exon 6 folgt (Abb. 26).

3.6 Axin1

- Information zur Spleißstelle:

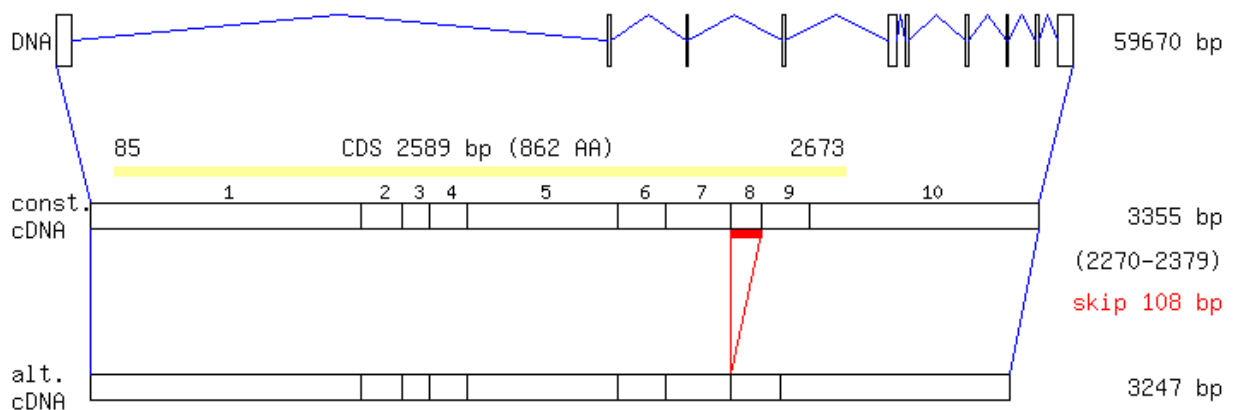


Abbildung 27: *Axin1* konstitutive und alternative Form. Dargestellt ist die genomische DNA mit Exons als Kästchen und Introns als blaue Linien; in der Mitte in gelb der codierende DNA-Bereich; der Skipbereich entspricht der dicken roten Linie. Abkürzungen: const. cDNA - normale oder konstitutive Spleißisoform, alt. cDNA - Alternative Spleißisoform, bp - Basenpaare, AA - Aminosäuren.

Im Axingen wurde ein Skipereignis an der Position 2270-2379 untersucht. Die 108 bp lange Skipsequenz enthält das ganze Exon 8 (Abb. 27). Die alternative Form kam in 18 ESTs und die normale nur in fünf vor. Bei der alternativen Form soll im Protein ein Stück der DIX-Domäne (780-794aa) fehlen.

- PCR-Ergebnisse:

Diese Spleißstelle wurde mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren untersucht. Der Vorwärts-Primer A (blau in Abb. 28) lag mitten in der Skipsequenz, so dass das PCR-Produkt A nur die konstitutive Form nachweisen kann. Bei der Reaktion mit Primern B wären theoretisch zwei Amplikons zu erwarten (gelb in Abb. 28). Gefunden wurde aber nur das kürzere alternative 286bp-Produkt (Abb. 29).

Ergebnisse

```

2281 AACCCCTAA CCCAGCTGGA GGAGGCGCGC CGACGTCTGG AGGAGGAAGA AAAGAGAGCC
2341 AGCCGAGCAC CCTCCAAGCA GAGGTATGTG CAGGAGGTTA TGCGGCGGGG ACGCGCCTGC
2401 GTCAGGCCAG CGTGC GCGCC GGTGCTGCAC GTGGTACCAG CCGTGTCCGA CATGGAGCTC
2461 TCCGAGACAG AGACAAGATC GCAGAGGAAG GTGGGCGGGC GGAGTGCCCA GCCGTGTGAC
2521 AGCATCGTTG TGGCGTACTA CTTCTGCGGG GAACCCATCC CCTACCGCAC CCTGGTGAGG
2581 GGCCGCGCTG TCACCCTGGG CCAGTTCAAG GAGCTGCTGA CCAAAAAGGG CAGCTACAGA
2641 TACTACTTCA AGAAAGTGAG C GACGAGTTT GACTGTGGGG TGGTGTTTGA GGAGGTTCGA
2701 GAGGACGAGG CCGTCCTGCC CGTCTTTGAG GAGAAGATCA TCGGCA AAGT GGAGAAGGTG
  
```

Abbildung 28: *Axin1*-mRNA-Sequenz. Skip (rot) und Primer (gelb - Primerpaar B, blau – Primerpaar A).

Beide Reaktionen wurden mit der cDNA aus 6 Zelllinien (Colon LS 174T, SW480, HCT 116, HT 29; Mamma MDA MB 435, MCF 7), OP-Material (jeweils gesundes und krebsverändertes Gewebe von 10 Patienten, also 20 PCR-Ansätze) und 2 Proben vom gesunden Gewebe, das endoskopisch entnommen wurde, durchgeführt.

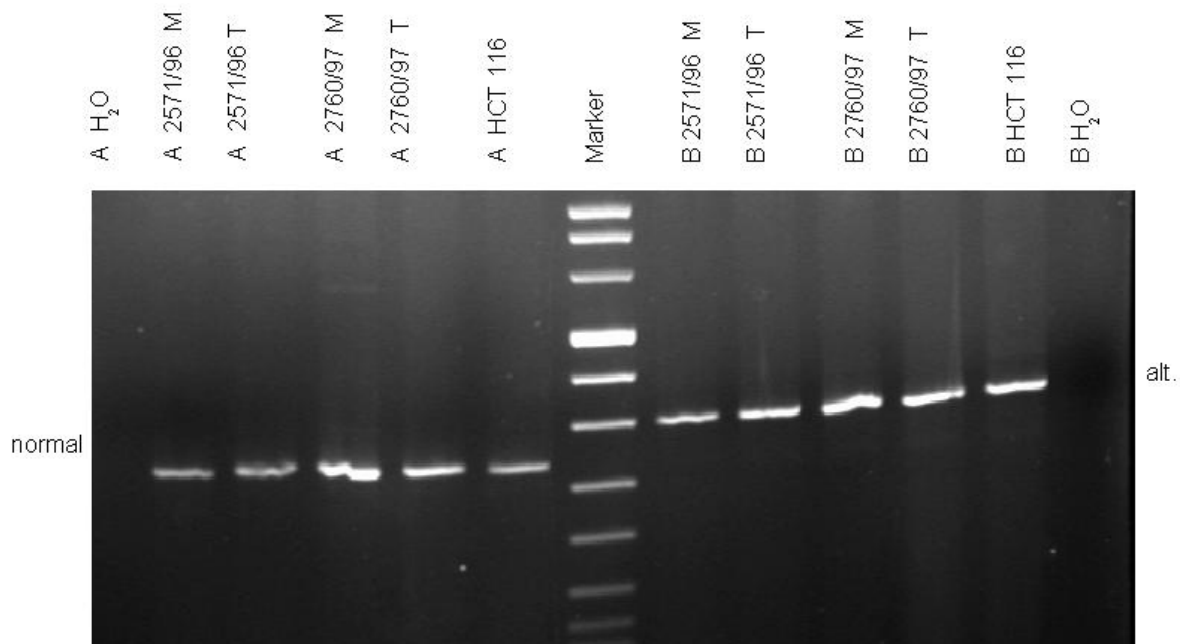


Abbildung 29: *Axin1*-Expression. Linke Bildhälfte: konstitutives Produkt nach der PCR mit Primer A. Rechte Bildhälfte: alternatives Produkt nach der PCR mit Primer B. Abkürzungen: M, Mucosa ; T, Krebsgewebe; H₂O, Negative Kontrolle; normal, konstitutive *Axin1*-Isoform; alt., Alternatives Spleißprodukt.

- Sequenzierung:

Die konstitutive cDNA (Produkt A) wurde bestätigt. Die Sequenzierung vom Produkt B hat die Sequenz mit einem Skip gezeigt und somit die alternative Form nachgewiesen.

- Real-Time-PCR:

Da die RT-PCR mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren gewisse Diskrepanz im Befund ergab, wurde für Axin eine RT-PCR mit SYBR[®] GREEN entwickelt, um die Expression von beiden Formen quantitativ zu untersuchen. Für den Nachweis der Formen wurden mit allen Proben jeweils zwei verschiedene PCRs durchgeführt, mit Primerpaar T1 zum Nachweis der normalen und Primerpaar T2 spezifisch für die alternative Isoform (Abb. 30). Als Kalibrator wurde die Zelllinie LS174T in jedem TaqMan PCR-Gang mitamplifiziert.

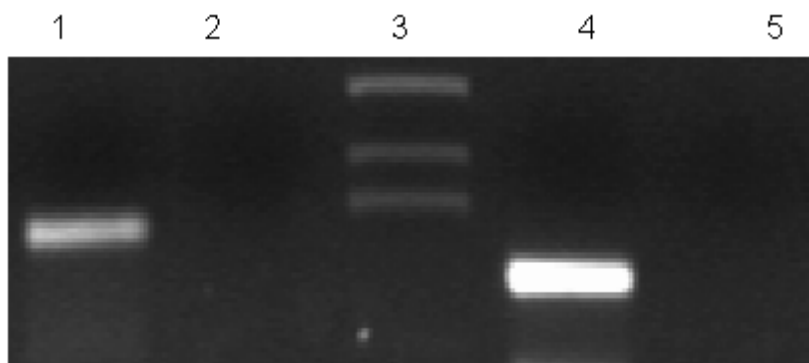


Abbildung 30: *Axin1*-Gelelektrophorese nach Real-Time PCR. 1 - LS 174T, T1-Primer Produkt, normale Isoform; 2 - T1-H₂O, Negative Kontrolle; 3 - Marker; 4 - LS 174T, T2-Primer Produkt, alternative Isoform; 5 - T2-H₂O, Negative Kontrolle.

Der C_T-Mittelwert für das Referenzgen *β-Actin* in Patientengewebe lag beim 19,38 Amplifikationszyklus, während die Schwelle bei der Bildung des konstitutiven nach ca. 27,51 und des alternativen Spleißproduktes erst nach 29,09 Zyklen überschritten wurde. Die Auflistung der in den Patientenproben erreichten C_T-Werte ist in den Tabellen im Anhang dargestellt.

In den Tabellen 19-20 im Anhang ist die relative Expressionsstärke beider Isoformen im Untersuchungsmaterial angegeben. Zur Verdeutlichung der Veränderungen wurden hierzu die ΔC_T -Werte entsprechend dem User Bulletin von Applied Biosystems nach der Formel $X_N = 2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ in die relative Expressionsmenge der zugehörigen Patientenprobe umgerechnet.

Im folgenden Schritt wurde die Expressionsmenge beider Spleißformen in nicht-neoplastischen Mucosa und Tumorgewebe gegenübergestellt (Tab. 18).

Durch Gegenüberstellung der Expression in normaler Mucosa und Tumor wird schon beim bloßen Durchsehen deutlich, dass die Werte für die Expression im Krebsgewebe

bei den meisten Patienten etwas höher liegen. Um mögliche Trends in der Expression von beiden Isoformen aufzuspüren, wurden die Daten mit der SPSS-Software weiter ausgewertet.

PATIENT	<i>Axin1</i> REAL-TIME PCR: RELATIVE EXPRESSIONSMENGE			
	MUCOSA		TUMOR	
	normal	alt.	normal	alt.
1943	0,62	0,56	1,65	1,59
1626	1,09	0,52	0,62	1,14
2184	0,56	0,31	1,08	1,72
214	0,91	0,72	0,27	0,34
2456	1,10	0,54	1,37	0,89
2887	0,59	0,51	0,43	0,34
2914	0,39	0,26	0,40	0,26
398	1,22	0,34	1,13	0,34
2104	1,06	0,52	2,21	0,84
2571	0,54	0,35	0,40	0,28
1112	0,85	0,65	0,19	0,14
2760	0,29	0,17	2,23	1,26
2886	0,63	0,34	0,76	0,38
3032	0,11	0,17	0,32	0,34

Tabelle 18: Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR für *Axin1*. Werte der relativen Expressionsmenge, in blau bedeuten eine Down-Regulation und in rot eine Up-Regulation der *Axin*-Isoformen im Vergleich zu der Pool-cDNA der LS 174T Kalibrator-Zelllinie. Abkürzungen: normal – konstitutive und alt. – alternative Spleißform.

Wird die Expression von beiden Formen in Mucosa und Tumorgewebe betrachtet (Abb. 31), so fällt auf, dass die Medianwerte der Expressionsstärke für die jeweilige Isoform im Tumor und Mucosa auf dem gleichen Level liegen. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass keine der Formen spezifisch für Tumor oder gesunde Mucosa sei. Außerdem zeigen für die relative Expressionsmenge Werte für T-con eine viel größere Verteilung, während sich die Werte für M-alt um das Median stärker konzentrieren. Außerdem ist die Bildung der alternativen Form im Vergleich zu der normalen in den meisten Patientenproben geringer.

In der Abb. 32 ist die *Axin*-Expression in Korrelation mit der Tumordinvasion dargestellt. Zuerst wird die Expression der konstitutiven Form im Tumor T-con betrachtet. Die Werte in T3- und T4-Stadien nach der TNM-Klassifikation haben eine große Streuung und lassen sich voneinander schwach unterscheiden. Die relative Expressionsstärke von T-con im T2-Stadium ist stark um den Wert 1,9 konzentriert, so dass die Vermutung aufgestellt werden kann, dass Patienten mit Werten > 1,5 für T-con

wahrscheinlich der T2-Klasse nach TNM-Klassifikation angehören. Ein ähnliches Verhalten zeigt auch die alternative Form im Tumor T-alt, wobei aber ihre Produktion in den fortgeschrittenen Tumorstadien sich auf einem niedrigeren Niveau befindet.

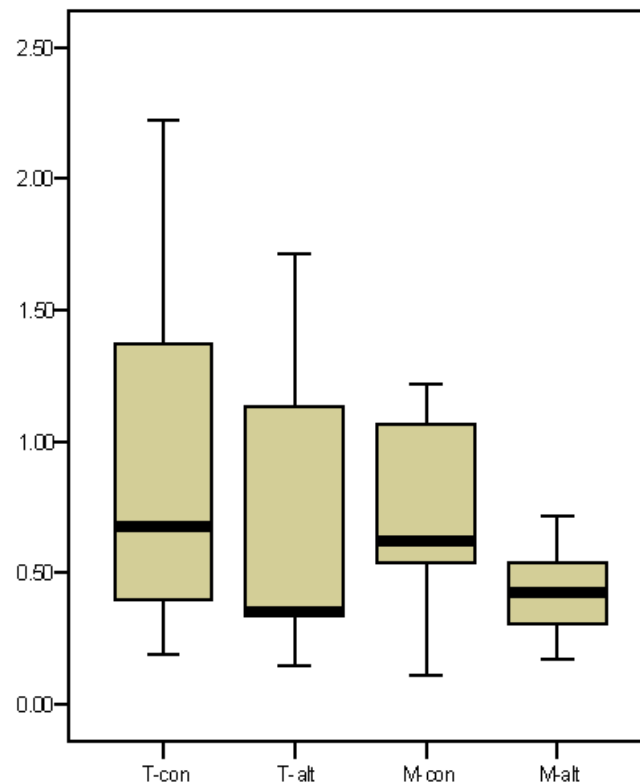


Abbildung 31: Box-plots für die Expression der konstitutiven (con) und alternativen (alt) *Axin1*-Isoform in T, Tumor und M, Mucosa.

In der Abb. 33 ist der Zusammenhang zwischen *Axin*-Expression und Fernmetastasen zu sehen. Hier lassen sich vor allem aus der stark unterschiedlichen Expression der alternativen Form bei m0- und m1-Patienten Vermutungen aufstellen: Patienten mit niedrigen Expressionswerten für *Axin* entwickelten bereits Metastasen. Liegt die relative Expressionsmenge für T-alt unter 0,4 so ist es sehr wahrscheinlich, dass der Patient Fernmetastasen hat.

Für die *Axin*-Expression und die übrigen klinisch pathologischen Eigenschaften der Patientenproben lassen sich keine weiteren Zusammenhänge erkennen.

Als Zusammenfassung lässt sich folgendes formulieren:

Es besteht weder qualitativ noch ein großer quantitativer Expressionsunterschied der beiden *Axin*-Isoformen zwischen gesunder Mucosa und Tumorgewebe. Die alternative Spleißform wird in den meisten Patientenproben auf einem niedrigeren Level

Ergebnisse

gebildet. Die *Axin*-Expression nimmt mit der fortschreitenden Tumorinvasion ab und ist ebenfalls reduziert bei Patienten mit bereits zum Operationszeitpunkt vorhandenen Fernmetastasen.

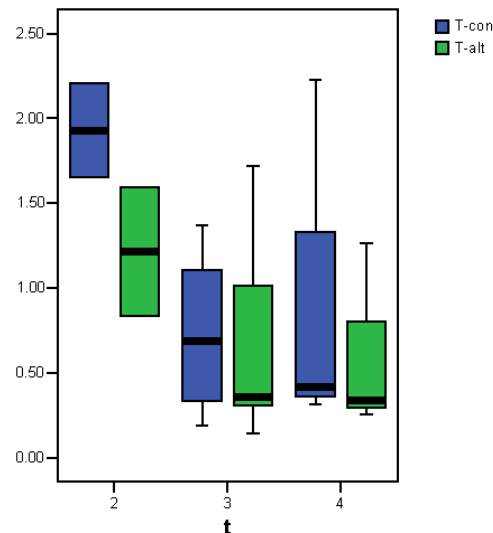


Abbildung 32: Box-plots für die Expression der konstitutiven (con) und der alternativen (alt) *Axin1*-Isoform in Abhängigkeit von dem t (Tumorinvasion)-Stadium nach der TNM-Klassifikation. T, Tumor.

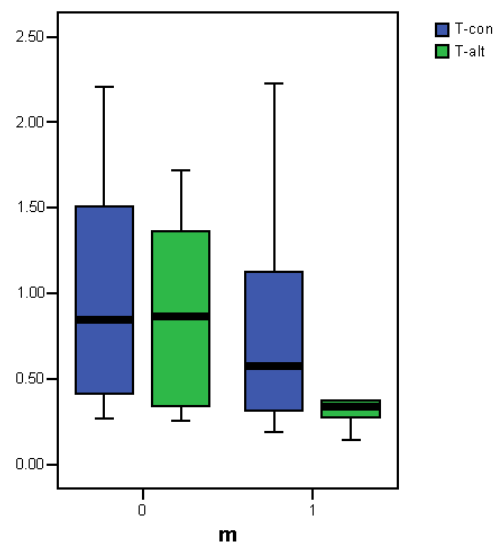


Abbildung 33: Box-plots für Expression der konstitutiven (con) und der alternativen (alt) *Axin1*-Isoform im Tumor in Abhängigkeit zur Bildung von Fernmetastasen; m=0 (keine Fernmetastasen), m=1 (Fernmetastasen zum Operationszeitpunkt).

4 Diskussion

4.1 Evaluation der bioinformatischen Spleißstellen-Vorhersage

4.1.1 Bewertung der Realisierbarkeit der Spleißstellen-Vorhersage

Aus der Zusammenfassung der Ergebnisse lässt sich das Potential der bioinformatischen Vorhersage von Spleißereignissen mit Hilfe von EASED erkennen. Auch der Nachweis bisher unbekannter Spleißstellen für *CTNNB1* und *LRP5* in Rahmen dieser Arbeit zeigt die Zuverlässigkeit des an der AG Bioinformatik MDC-Berlin entwickelten Algorithmus zur Auswahl und Existenznachweis von Spleißstellen. Die korrekte Übereinstimmung der PCR-Produktsequenzierung mit durch bioinformatische Analyse vorhergesagten Sequenzen berechtigt zur Verwendung von EST-Daten zur Suche nach Spleißstellen.

Bei zwei der acht vorhergesagten Spleißstellen (*CtBP1* (2), *CK1A1*) konnte nur die bekannte Spleißisoform gefunden werden. Diese Tatsache könnte auf Artefakten in den EST-Daten beruhen oder die Spleißform wird zwar nicht in Kolongewebe, womöglich aber in anderen Geweben gebildet. Die ESTs werden gewöhnlich vom 5'- oder 3'-Ende der cDNA abgeleitet, während die zentralen Regionen der langen mRNA in der EST-Sequenz nicht adäquat repräsentiert sind. Die EST-Datenbanken enthalten keine Sammlungen der Sequenzen von jedem Stadium der Erkrankung oder jedem Zelltyp, was die Suche nach erkrankungs- oder gewebespezifischen RNA-Spleißevents erschwert. Eine computergestützte Vorhersage bietet eine Menge an scheinbar perfekten Spleißsequenzen, die aber tatsächlich von dem Spleißosom nicht benutzt werden. So werden viele nicht existierende mRNA-Varianten vorhergesagt.

4.1.2 Fehlende Expressionsunterschiede zwischen Tumor und gesunder Mucosa und Problematik der EST-Qualität

Die restlichen identifizierten Spleißisoformen zeigen weder qualitative noch große quantitative Unterschiede zwischen Expression in gesunder Mucosa und im Tumorgewebe. Dies lässt vermuten, dass die meisten ESTs eher auf die Existenz der alternativen Form im Krebsgewebe hinweisen. Die meisten ESTs wurden aus Tumoren

isoliert, während die Anzahl bekannter EST aus nicht-tumorösen Geweben im Vergleich dazu geringer ausfällt. So stammen auch für die ausgewählten Spleißstellen deutlich mehr EST-Daten aus Karzinomen als aus gesundem Intestinalgewebe. Die tumorassoziierten Spleißformen sind in der GenBank doppelt so stark vertreten wie ihre normalen gewebesassoziierten Formen, wahrscheinlich weil 70% der mRNAs in der GenBank aus Tumorproben geklont wurde. Roy et al. zeigten, dass etwa zwei Drittel der alternativ gespleißten Gene auch die unbekannt alternative Form im normalen Gewebe exprimieren und bei 40% diese neue Form auch das dominierende Produkt im normalen Gewebe ist [72]. Dies ist unbedingt zu berücksichtigen und erschwert somit erheblich die Aussagekraft der bioinformatischen Vorhersage bei der Suche nach tumorspezifischen Spleißereignissen, da aus den EST-Daten nicht auf die Expression im gesunden Gewebe geschlossen werden kann.

Fehlerhafte EST-Sequenzen könnten in der Vergangenheit durch fehlende Standards und Qualitätskontrollen in die öffentlichen Datenbanken integriert worden sein [69]. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse stimmen gut mit den Aussagen von Gupta et al. überein. Er berichtet, dass die durch EST-Daten vorhergesagte Tumorspezifität sich meistens nicht in der experimentell beobachteten Expression widerspiegelt [31]. Noch schwieriger gestaltet sich die Frage, gewebsspezifische Spleißprodukte mittels ESTs zu finden, da nur schwer zwischen Gewebs- und Tumorspezifität unterschieden werden kann [95].

4.2 Problematik der Methoden

4.2.1 RNA-Qualität

Bereits während der RNA-Isolierung tauchen sehr schnell Probleme auf, die die Validität der Methoden in Frage stellen. Je nach Menge und Art des eingesetzten Materials (Zellen oder Gewebelysat), der Methode der Aufarbeitung und den Degradierungsprozessen, abhängig vom Alter und Lagerungsdauer der Proben, können die RNA-Konzentrationen erheblich schwanken. Auch im nächsten Schritt der Vorbereitung des PCR-Templates bei der reversen Transkription lies sich unterschiedliche Effektivität beobachten, die vor allem durch Störfaktoren, wie z.B. nach der RNA-Präparation verbliebenen Salze oder Alkohol, die die Aktivität der Reversen Transkriptase hemmen, begründet wird. Die Reinheit der isolierten RNA konnte mit Hilfe

des Photometers beurteilt werden. Das Prinzip beruht auf unterschiedlichen Absorptionsmaxima der RNA (ca. 260 nm), der DNA (ca. 265 nm), des Phenols (ca. 270 nm) und der Proteine (ca. 280 nm), aufgrund deren Gehalts an aromatischen Aminosäuren wie z. B. Tyrosin und Tryptophan. Der Quotient zwischen den bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorptionskoeffizienten gibt Aufschluss über die Reinheit der RNA-Extraktion. Bei sehr reinen RNA-Lösungen ist der Quotient größer als 1,9. Kleinere Werte weisen auf die Kontamination mit Proteinen oder aromatischen Substanzen hin.

Um aber die Quantität der mRNA in verschiedenen Proben in etwa vergleichen zu können wird eine Bezugsgröße, die die Menge an eingesetzter Gesamt-mRNA oder cDNA widerspiegelt, zur Hilfe genommen. Als solche Bezugsgrößen fungieren in der molekularen Genetik die so genannten „housekeeping“-Gene, wie z.B. *β-Actin*. Durch den Vergleich der *β-Actin*-mRNA-Expression als interner Standard in verschiedenen Reaktionsansätzen werden für spätere RT-PCRs der Zielgene möglichst gleiche Proben im Bezug auf Gesamt-mRNA-Gehalt ausgewählt. Als positive Kontrollen wurden bekannte Zelllinien ausgewählt, da davon ausgegangen werden kann, dass z.B. *β-Actin* in den Zellen immer auf dem gleichen Level exprimiert wird. Da jedoch der interne Standard keine absolute Bezugsgröße darstellt, muss eine solche Quantifizierung immer als semiquantitativ angesehen werden.

4.2.2 Aussagekraft der RT-PCR

Unterschiedliche RT-PCR-Produkte werden bei verschiedenen mRNA-Matrizen unterschiedlich stark exprimiert. Wird z.B. für jede Spleißform eine separate PCR mit einem spezifischen Primerpaar durchgeführt, so kann man nicht aus der stärkeren Bande während der Elektrophorese auf die stärkere Expression der dazugehörigen mRNA schließen. Daher wurden für alle Spleißevents die Primer so in der Sequenz gelegt, dass sie beide Spleißprodukte nachweisen können. Dieses Prinzip bezeichnet man als kompetitive PCR, d.h. hier konkurrieren das alternative und das normale Template unter denselben Reaktionsbedingungen um die gleichen Primer und die übrigen Reaktionskomponenten. Die Reaktionsprodukte unterscheiden sich allein in der Länge. Es ist vorstellbar, dass dem kürzeren Fragment dadurch während der Elongation ein Vorteil zukommt. Dies ist jedoch bei ausreichend lang gewählten Elongationszeiten und einer nur geringen Längendifferenz der beiden Fragmente

vernachlässigbar. Zeigen nach Ablauf der kompetitiven RT-PCR in der Elektrophorese zwei Banden ein gleich starkes Signal, so kann die identische Menge der beiden amplifizierten cDNAs bzw. zugrunde liegenden mRNAs in der untersuchten Probe vermutet werden. Jedoch verhalten sich die optischen Dichten der resultierenden Gelbanden von zwei unterschiedlichen Spleißformen aus dem gleichen PCR-Ansatz nicht proportional zu ihren zugrunde liegenden mRNA-Mengen. Dieses erklärt sich daraus, dass während der Konkurrenzreaktionen der beiden Templates die in größerer Menge vorliegende mRNA einen überproportionalen Vorteil gewinnt. Die Aussage über die Quantität der jeweiligen mRNA-Matrize gestaltet sich in der RT-PCR schwierig, so dass speziell für *Axin* eine Messmethode basierend auf der TaqMan Real-Time PCR Technologie entwickelt wurde. Die Frage der Diskrepanz zwischen der Expression im Tumor und normalen Mucosa lässt sich mit der RT-PCR aber sicherlich beantworten.

4.2.3 Probleme bei der Durchführung der Real-Time-RT-PCR

Die Diskrepanz der Ergebnisse bei der Durchführung RT-PCR für *Axin* regte uns an, eine quantitative Bestimmung der Expression beider Isoformen für dieses Gen zu entwickeln.

Um die Schwankungen zwischen Untersuchungsmaterial verschiedener Patienten auszugleichen, wurden für jeden PCR-Ansatz 100 ng/µl RNA (konvertiert als cDNA) eingesetzt. Obwohl die MikroAmp-Reaktionsplatte Platz für 96 Proben bietet, konnten pro Gang nur cDNAs von jeweils vier Patienten untersucht werden. Dieses erklärt sich dadurch, dass für jedes Primerpaar (T1, T2, β -Actin) für die gleiche cDNA dreifache Ansätze für die spätere Mittelwertbestimmung benötigt wurden und das diese jeweils doppelt für nicht-neoplastische Mucosa und Tumorgewebe erfolgten.

Die Amplifikation der Kalibrator-cDNA der Zelllinie LS174T sowie der Negativkontrollen für jedes Primerpaar zur Überprüfung der Reinheit von eingesetzten Reagenzien im jedem TaqMan-Durchlauf ermöglicht den Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher MikroAmp-Platten.

Ein anderer Vorteil der Methode ist, dass die Volumina der zur Quantifizierung benötigten RNA wesentlich geringer sind als bei konventionellen Methoden. Als Vergleich wurden für die konventionelle *Axin*-PCR 2,5 µl Patienten-cDNA eingesetzt, während für die Real-Time PCR schon 1,67 bis 2µl cDNA genügten.

Weiterhin konnte mit diesen Experimenten gezeigt werden, dass die Real-Time PCR

sich genauso hervorragend zum quantitativen Nachweis von Spleißisoformen eignet wie von gewöhnlichen Amplifikaten. Eine Voraussetzung dafür ist, spezifische Bedingungen für die Amplifikation jeder Spleißform auszuwählen. In der *Axin* Real-Time PCR wurden die Primeroligonukleotide sorgfältig für die alternative und konstitutive Form in separaten Reaktionsansätzen eingesetzt. Eine andere Option wäre natürlich nur ein Primerpaar zu verwenden, wie das bei den meisten konventionellen PCRs der Fall ist, um in einer Reaktion gleichzeitig beide Spleißformen mit der Real-Time-PCR nachzuweisen. Die Unterscheidung der beiden Formen wäre allerdings nur anhand der Schmelztemperatur der PCR-Produkte bei Anfertigung der Dissoziationskurve möglich und eine Aussage über die Quantität wäre eher schwierig. Eine sichere Unterscheidung zwischen der kürzeren alternativen Form und der während der PCR anfallenden Primerdimere könnte nur durch Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgen, so dass der separate Nachweis der Isoformen hier vorteilhaft ist.

Auf den Entwurf spezifischer Hybridisierungs sonden konnte durch den Einsatz des Referenzfarbstoffes SYBR[®]Green und spezifischen, die Spleißstelle übergreifenden, Primer verzichtet werden ([67], [94]). Natürlich ist das Problem gegeben, dass die Farbstoffe, die sich in die kleine Kurve der DNA einlagern, die *Minor Groove Binders* (MGBs), sich auch unkontrolliert in jeden beliebigen Abschnitt der Doppelstrang-DNA einlagern können. Die Auswahl spezifischer Primer und die meist kurzen Amplifikate (hier 104 und 94 bp) kompensieren dies [12]. So wurden die Schwierigkeiten des Sondendesigns umgangen, denn es ist schwierig, für jede Spleißvariante eine spezifische Sonde bei fast vollständig übereinstimmender Sequenz zu beschaffen. Der SYBR[®]Green-Assay gewährleistet somit viel Flexibilität bei der Auswahl des Zielgens ([12], [32]). Eine akkurate Durchführung der SYBR[®]Green-PCR bietet zudem eine kostengünstige Methode zur Bestimmung der Expression von Spleißvarianten [67].

4.3 Mögliche Rolle alternativer Spleißprodukte im Wnt-Pathway und Zellstoffwechsel

Auf die Bedeutung des Wnt-Pathways in der Tumorigenese wurde bereits im Abschnitt 1.3 eingegangen. Auch den Spleißprozessen könnte eine große Rolle während der Kanzerogenese zukommen, so z.B. sind *CD44*, *Wilms-Tumor Gene WT1*, *BRCA1/2* und Gene der Kallikrein-Gruppe bestens bekannt und zeigen auch

tumortypische Spleißformen [7]. Parallel zu der Bedeutung des Wnt-Pathways in der Tumorprogression wurden in dieser Arbeit wichtige Gene aus diesem Signalweg ausgesucht, die zentrale Moleküle kodieren und die auch potentiell als biologische Marker fungieren können. Es ist umso schwerer, die Bedeutung der Spleißformen dieser Moleküle für den Ablauf des Zellstoffwechsels vorherzusagen. Noch schwieriger gestaltet sich dieses für durch alternatives Spleißen resultierenden Rezeptorproteine wie in dieser Arbeit, z.B. LRP5, wenn bestimmte Regionen der intrazellulären oder extrazellulären Kette strukturell verändert werden. Weiterhin ist die Funktion vieler Domänen noch nicht definiert, was die Einschätzung der Konsequenz einer Strukturänderung erschwert. Es kann nicht aus der Änderung der Primärstruktur eines Proteins auf die Folgen für seine dreidimensionale Struktur geschlossen werden. Hier wird weiter auf die möglichen Spleißfolgen für die untersuchten Wnt-Gene eingegangen.

4.3.1 CTNNB1

β -Catenin ist ein „Schlüsselmolekül“ des Wnt-Signalweges. Seine Akkumulation im Zytoplasma mit anschließender Diffusion in den Zellkern aktiviert die Transkription vieler Targetgene, wie z.B. *c-Myc*, *Cyclin D*, *fra1*, *c-Jun*, *matrilysin*, *CD44*, *urokinase-type-plasminogen activator receptor* und anderen [42]. Alle diese Gene sind in den Prozess der Tumorigenese eingebunden, da ihre Funktionen in der Zellformation, Apoptose und Zellzyklusregulation liegen. Eine weitere Aufgabe des β -Catenins besteht in der Interaktion mit E-Cadherin zur Aufrechterhaltung der Zelladhäsion [38]. Eine hohe Konzentration von β -Catenin im Zytoplasma ist sehr kritisch für das Wachstum kolorektaler Karzinome [17].

In der RT-PCR konnten zum ersten Mal zwei alternative Spleißformen von β -Catenin in Tumorproben und gesundem Gewebe von am Kolonkarzinom erkrankten Patienten nachgewiesen werden. Die erste alternative Spleißform (Abb. 11) wurde bereits während der Sequenzuntersuchung des *CTNNB1*-Gens durch Nollet für möglich erklärt [62]. Bei der zweiten zusätzlichen Spleißvariante wird das gesamte Intron 15 in die mRNA-Sequenz übernommen. Diese zweite *CTNNB1*(b)-Isoform (Abb. 14) ist in der Genbank unter der Nummer AB062292 registriert. Beide Spleißereignisse liegen zwar außerhalb der codierenden mRNA-Region, können aber für regulatorische Aufgaben auf der RNA-Ebene eine Rolle spielen. Die RT-PCR-Ergebnisse zeigen, dass alle

Spleißformen im Kolongewebe sowohl im Tumor als auch in normaler Mucosa ohne Expressionsunterschiede auftreten.

Thiele et al. beschreiben, dass AU-reiche Sequenzelemente und alternatives Spleißen in 3'-UTR-Bereich die Stabilität der β -Catenin-mRNA beeinflussen können. Somit wird alternatives Spleißen zu einer Kontrollebene für die zelluläre β -Catenin-Konzentration. Die Höhe der β -Catenin-mRNA Expression verhält sich in Monozyten des peripheren Blutes isoformspezifisch. Dort kommen alle drei Varianten stets im Zytoplasma vor und steuern die Synthese als Transkriptions-Koaktivatoren, führten aber zu unterschiedlichen Stabilität im Zytoplasma [87]. Auch im Kolongewebe wurden alle drei Spleißprodukte gebildet.

In die mRNA übernommene Intronabschnitte, wie bei der zweiten alternativen Spleißform, können positive Auswirkungen auf die Expression bestimmter Gene haben [44]. Es kann aber nicht gesagt werden ob die Expression von β -Catenin selber oder von seinen Targetgenen im Kolon davon profitiert. Suriano G. et al. behaupten, dass die hohe Amplifikation der *CTNNB1* Targetgene ebenfalls ein möglicher, aber eher seltener Mechanismus zur Erklärung der β -Catenin-Überexpression in Karzinomen ist [85]. Im Ösophaguskarzinom gelten die *CTNNB1*-Spleißisoformen als Marker für die neoplastische Progression. So korreliert die erniedrigte Ratio von 16A/16B-Form, was in dieser Arbeit der konstitutiven/alternativen *CTNNB1(a)* oder alternativen 1-Spleißform entspricht, eindeutig mit der Zunahme der *myc*-Expression [71]. Hier liegt die Vermutung nah, dass die erste Spleißvariation auf die stärkere Targetgentranskription und die zweite, intronhaltige Form auf die erhöhte eigene β -Catenin-Expression oder erhöhte Stabilität des Moleküls einwirkt.

Die Bedeutung von alternativen Spleißprodukten von β -Catenin ist sehr schwer vorherzusehen, zumal dieses Molekül auch von anderen Faktoren außerhalb des Wnt-Pathways kontrolliert wird wie z.B. von Bcl-2 und Leukotrienen [53]. *CTNNB1* liefert ein interessantes Beispiel von alternativen Spleißprozessen außerhalb der codierenden Sequenz mit noch zu erforschenden Auswirkungen.

4.3.2 CtBP1

CtBP1 kann selektiv die epitheliale Zelladhäsion und die Transkription unterschiedlicher proapoptotischer Gene unterdrücken. Durch die Interaktion mit dem TCF4, Histondeacetylasen hemmt CtBP1 die Expression der Wnt-Targetgene [89]. Es

gibt Berichte, die *CtBP1*-knockout-Zellen als hypersensitiv zur Apoptose beschreiben [30], so dass CtBP1 als negativer Regulator der Tumorprogression angesehen werden kann.

Für das *CtBP1*-Gen wurde aus zwei vorhergesagten Spleißereignissen, nur jenes mit einem Insert von 196 bp mit RT-PCR nachgewiesen. Die Übernahme des gesamten Intron 1 in die mRNA-Sequenz führt zur Verschiebung des Leserasters, so dass das zugehörige Protein durch geänderten Startcodon um 13 Aminosäuren kürzer sein müsste. Betroffen wäre die 2-Hydroxyacid-Dehydrogenase-Domäne, eine katalytische Domäne mit Bindungsstelle für das Coenzym NAD. Womöglich kann das Protein dann nicht korrekt seine katalytischen Funktionen ausüben.

Die zweite Spleißvariation mit einem 24 bp-langen Skip im Exon 9 konnte weder in Zelllinien noch in Patientengewebe aus Kolon identifiziert werden. Für die Identifizierung dieser Spleißform wurde die mRNA-Referenzsequenz NM_001328.1 benutzt. Zwischenzeitlich wurde sie geändert und entspricht jetzt der Sequenz NM_001328.2, die diese 24bp enthält. Die falsche Spleißstellenvorhersage ist demnach auf Fehler der genomischen mRNA-Sequenz zurückzuführen.

4.3.3 CK1A1

Es ist bekannt, dass die große Caseinkinasen-Enzymgruppe (CK1 α , β , δ , ϵ , γ 1, γ 2, γ 3) selbst Folge des alternativen Spleißens ist. Die in dieser Arbeit betrachtete Caseinkinase 1A1 gehört zu den Serin/Threonin Proteinkinasen. Dieses Enzym ist neben dem Ablauf des Zellzyklus, auch an Membrantransporten und während der RNA-Prozessierung beteiligt [21]. Im Wnt-Pathway fungiert CK1 als Priming-Kinase der unten beschriebenen GSK3 β . Außerdem kann die aktive, phosphorylierte CK1A direkt an Axin binden und erst dann das Proteinsubstrat, z.B. β -Catenin, phosphorylieren. Die Präsenz von *Axin* erleichtert die Bindung von CK1 α an β -Catenin, aber nicht wesentlich. Die Affinität des Enzyms zu β -Catenin muss stärker sein, als die zum Axin [82].

In der RT-PCR mit Gewebeproben aus Dickdarm gelang es nur, die normale Spleißform zu identifizieren. Denkbar wäre, dass die geringe Längendifferenz zwischen Spleißprodukten sich während der PCR negativ auswirkt. Weitere Risikofaktoren für das negative Ergebnis sind die bereits oben beschriebene Problematik der EST-Qualität und/oder die Tatsache, dass diese Form im Kolon nicht vorkommt. Das alternative Protein hätte eine um 13 Aminosäuren verkürzte ATP-Bindungsdomäne am C-

Terminus, was eventuell eine Konsequenz für die Phosphorylierung der Bindungspartner der Kinase hätte.

Die Untersuchungen von *CK1A*-Spleißformen in Oozyten von Goldfisch ergab, dass Spleißtranskripte sowohl in reifen und unreifen Zellen, aber in gewebsspezifischem Expressionsmuster vorkommen [37]. So können im Kolon eventuell auch andere Enzyme der Caseinkinase-Gruppe die Funktion von *CK1A1* ersetzen oder übernehmen.

Burzio et al. fanden andere Spleißvarianten der *CK1A* im Zebrafisch, die ebenfalls zu Veränderungen der katalytischen Domäne führten. Diese hatten folgende Affekte auf die Funktionen des Enzyms: (a) Verdopplung des K_m -Wertes für ATP, (b) Verringerung der Sensibilität bei der Bindung eines Hemmmoleküls namens *CK7*-Inhibitor, (c) Erniedrigung der Hitzebeständigkeit des Enzyms um 40°C. Außerdem wurde eine beschleunigte Zerfallszeit des Enzyms beobachtet. Die Halbwertszeit sank von 400 min bei intakter *CK* auf 100 min bei der Spleißvariante [10].

4.3.4 GSK3 β

Die Serin/Threonin Kinase *GSK3 β* bindet und phosphoryliert mehrere Moleküle im Wnt-Pathway. Ursprünglich wurde *GSK3 β* als Enzym im Glykogen- und Insulinstoffwechsel betrachtet. Zurzeit sind mehr als 40 Proteine bekannt, die durch diese Kinase phosphoryliert werden [23]. Phosphorylierung von β -Catenin ist essentiell für seinen Abbau im Proteasom [51]. Bisher hat man keine *GSK3 β* Mutationen in Zelllinien aus kolorektalem Karzinom feststellen können [81]. Trotz der Annahme, dass *GSK3 β* als negativer Wnt-Regulator fungiert, wurde im kolorektalen Karzinom erhöhte Gesamtexpression des Enzyms im Vergleich zur nicht-neoplastischen Mucosa beobachtet. Die Ursache könnte im erhöhten Zuckermetabolismus des Tumorgewebes liegen. Es ist gut bekannt, dass Tumoren sowohl aerob als auch unter Sauerstoffmangel Glucose zur ATP-Gewinnung nutzen können und so ihren Energiebedarf aufrechterhalten, um unbegrenzt zu proliferieren. Eine hohe Aktivität der *GSK3 β* im Kolonkarzinom spiegelt einen hohen Glucoseverbrauch in Tumorzellen bei gleichzeitig gehemmter Glykogensynthese wider [78].

Mit RT-PCR wurden beide Spleißformen im Kolongewebe sowohl im Tumor als auch in normaler Mucosa ohne Expressionsunterschiede gefunden. Auch in Studien von Shakoori konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen *GSK3 β* -Gesamtexpression und Aktivität dieses Enzyms als auch klinischen Charakteristiken,

einschließlich Tumorstage und Metastasenbildung, aufgestellt werden [78]. Beide nachgewiesenen Spleißformen waren bereits in Ensembl festgehalten (ENST00000264235, ENST00000316626). Die Proteinkinase-Domäne (56-353 Aminosäuren,aa) der alternativen Form würde durch den Skip um 13 aa kürzer sein. Dasselbe Spleißereignis wurde von Mukai et al. [57] im humanen Hirngewebe beobachtet. Die Experimente in Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass dieses Spleißereignis auch im Darmgewebe abläuft und die Formen nicht spezifisch für das zentrale Nervensystem sind. In der Literatur ist außerdem zu finden, dass gleiche GSK3 β -Isoformen außer im Cortex, Hirnstamm und Cerebellum auch in der Lunge, im Herz und in der Leber vorkommen.

Die Auswirkung des Skips von Exons 9 auf die Funktion der GSK3 β ist nicht genau bekannt. Sein Fehlen wurde aber in vielen Geweben beobachtet. Es wird vermutet, dass Veränderungen in dieser Region einen Effekt für die Axinbindung nach sich ziehen können [74]. Für den Skip von Exon 9 und 11 wird ein SNP (*single nucleotide polymorphism, rs6438552*), der *in vitro* die Auswahl der Spleiß-Akzeptor-Seite reguliert, verantwortlich gemacht. Dieser Polymorphismus scheint das Risiko, an Morbus Parkinson zu erkranken, zu beeinflussen [49].

In immunohistologischen Untersuchungen an Mausembryonen gelang es, die räumliche Lokalisation beider Isoformen zu unterscheiden. Es stellte sich heraus, dass das alternative Produkt stärker in Perikarien der sich entwickelnden Nervenfasern konzentriert war. Daraus kann auf unterschiedliche Funktionen der beiden Isoformen geschlossen werden. Der Funktionsbereich der alternativen Enzymform würde demnach während der Zellentwicklung und -reifung liegen. Durch den Aminosäureverlust besitzt die alternative Isoform auch eine geringere Kinase-Aktivität [57].

Andererseits existieren Hypothesen [88], die beschreiben, dass die Funktionsmängel der GSK3 β im Tumorgewebe durch das verwandte Enzym GSK3 α substituiert werden können, da beide Moleküle ca. 95% Homologie innerhalb der Kinase-Domäne besitzen.

Nicht zu vergessen ist, dass die GSK3 β sich im Kolonkarzinom durch ihre komplexen Aufgaben in mehreren Pathways anders verhalten könne, als die ihr bisher zugeschriebene Tumorsuppressor-Rolle [78].

4.3.5 LRP5

LRP5 gehört zu der großen Gruppe der Lipoprotein-Rezeptoren an der

Zelloberfläche an. Das Molekül enthält extrazellulär ligandenbindende Motive sowie die EGF-Precursor-Homologie-Domäne. LRP5 bindet mit hoher Affinität 30 oder mehr Liganden und steuert ihren Transport zu den Lysosomen, wo diese abgebaut werden. Zu den bekannten Bindungspartnern von LRP5 gehören Lipoproteine, Proteinase, Proteinase-Inhibitor-Komplexe, Matrixproteine, Bakterientoxine, virale Bestandteile als auch intrazelluläre Proteine [84]. Einige Hypothesen beschreiben, dass LRP5 auch Axin bindet, das so genannte „Halteprotein“ im Wnt-Signalling, und somit seine Lokalisation von intrazellulär zu den Membranen verschiebt. Als Folge führt der intrazellulärer Axin-Mangel zur Stabilisierung von β -Catenin und zur gesteigerten Transkription seiner Targetgene ([52], [86]). In diesem Prozess scheinen auch die oben genannten Proteine der Caseinkinasen einbezogen zu sein [20]. Eine Arbeit beschreibt, dass hohe Konzentrationen von LRP5 signifikant mit Tumormetastasen in finalen Stadien von Osteosarkomen korrelieren [36]. Andererseits ist LRP5 auch essentiell in den normalen Glucose- und Cholesterinmetabolismus einbezogen [27].

Beide Spleißformen wurden sowohl in den Zelllinien als auch in Tumor und in normaler Mucosa von Patienten mit Darmkrebs exprimiert. In allen Proben zeigte das PCR-Produkt der alternativen mRNA ein sehr schwaches Signal in der Gelelektrophorese. Die alternative Form wurde bisher nicht in den gängigen Datenbanken oder in Literatur publiziert gefunden. Japanische Wissenschaftler identifizierten in Rahmen der *LRP5*-Genesequenzanalyse mittels des Restriktionsenzymfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) sieben andere Spleißformen, was auf Heterogenität der LRP5-Formen hindeutet [63]. In Rahmen dieser Promotionssarbeit wurde erstmals die Spleißform mit dem Skip des gesamten Exon 5 in *LRP5*-mRNA identifiziert. Auf dem Proteinlevel betrachtet, müsste im alternativen Produkt ein Teil der EGF-Domäne (auch PF00008) fehlen. Die Wiederholungen der EGF-Homologie sind in Rezeptoren für die Dissoziation der Liganden vom Rezeptor als endozytotische Vesikel wichtig [39]. Die funktionale Bedeutung des Skips kann hier nur vermutet werden und muss weiterhin untersucht werden.

4.3.6 Axin1

Axin ist ein so genanntes „Halteprotein“, das auch außerhalb des Wnt-Signalweges mit diversen Proteinen interagiert und so in eine Mehrzahl von Pathways wie JNK-,

TGF β - und p53-Kaskaden eingebunden ist [50]. Die Rolle des Axins ist für den β -Catenin-Degradierungsprozess unersetzbar. So werden dem Axin Aufgaben als negativer Regulator des Wnt-Signalweges und somit die Funktion als Tumorsuppressor zugeschrieben [43]. Mutationen des *Axins* wurden im humanen hepatozellulären Karzinom bei gleichzeitig intakten Genen für *β -Catenin* und *APC* gefunden.

In dieser Arbeit wurde die *Axin*-Expression mit der RT-PCR sowie auch quantitativ mit Hilfe der Real-Time-PCR analysiert. Beide Spleißformen wurden in allen Proben gefunden. In der Bestimmung der quantitativen Expressionsmenge zeichneten sich trotz einer kleinen Stichprobe von 14 Patientenfällen folgende Trends aus. Beide *Axin*-Isoformen werden sowohl in der gesunden Mucosa als auch im Tumor gebildet. Die alternative mRNA wurde dabei in den meisten Fällen schwächer exprimiert. Im Protein der alternativen Form wäre die DIX-Domäne um 14 Aminosäuren kürzer. Die DIX-Proteindomäne ist als signalübermittelndes Modul stark im Axin-Molekül konzentriert. Zusätzlich zu dieser gut bekannten Funktion ist sie essentiell für die Bindung des Dvl, der Aktinfilamente und der intrazellulären Membranen. Sie ist weiterhin unverzichtbar in der Aktivierung des JNK-Signalweges durch Axin [93]. Ohne die funktionsfähige DIX-Domäne ist die korrekte Faltung der Proteinketten im Axin gestört. Dieses führt zu einem Funktionsverlust des Axins als „Halteprotein“ im Wnt-Weg und somit zum gestörten Abbau mit Stabilisierung von β -Catenin [50]. Außerdem erleichtert eine korrekte Dimerbildung im Axin-Protein durch die DIX-Domäne die ubiquitinierungsabhängige Down-Regulierung von APC. Beide Moleküle, Axin und APC, können sich wahrscheinlich auf der Proteinebene gegenseitig steuern [15]. Vermutlich fördern beide Moleküle den Rücktransport des kernlokalisierten β -Catenins ins Zytosol und seinen Abbau. Auch Axin mit Fehlern in der DIX-Domäne unterliegt den Kern-Zytoplasma-Transporten, es ist aber wahrscheinlich nicht in der Lage, β -Catenin zurück ins Zytoplasma zu überführen [18].

Weiterhin kann aus den Ergebnissen der Real-Time PCR entnommen werden, dass die *Axin*-Expression in finalen Tumorstadien und ebenfalls bei Patienten mit Fernmetastasen sehr gering ist. Die *Axin*-Expression korreliert somit umgekehrt proportional mit dem Grad der Tumorerkrankung im kolorektalen Karzinom. Ebenfalls ein indirekter Zusammenhang zwischen der *Axin*-Expression und der Ausbildung von Lymphknotenmetastasen und lymphatischer Invasion wurde im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus beobachtet [58]. Eine Betrachtung der Veränderungen der

Axinkonzentration parallel zur Tumorpheriferation kann vielleicht in der Zukunft als möglicher prognostischer Faktor überprüft werden. Da Axin außer seiner Tumorsuppressorrolle im Wnt-Pathway auch positiv auf den SAPK/JNK(Apoptose)-Signalweg einwirkt, kann die Suche nach Agonisten und auch Antagonisten von diesem Molekül neue Wege in der onkologischen Therapie öffnen. Das Inserieren des normalen *Axin1* in die Zelllinien aus dem humanen hepatozellulären Karzinom führte zum programmierten Zelltod der Tumorzellen [73].

4.4 Ausblick

In Bezug auf die Bedeutung der Spleißformen in der Tumorgenese wird in der Literatur viel spekuliert, dennoch ist sehr wenig über ihre Funktion oder Regulation bekannt. Durch die Analyse der Ergebnisse konnte ein erster Überblick über das Verhalten von Spleißvarianten im kolorektalen Karzinom gewonnen werden. Der entwickelte Bioinformatik-Algorithmus stellt eine schnelle und zuverlässige Methode der Suche nach putativen Spleißformen dar. Aufbauend auf den hier gewonnenen Ergebnissen wären die nächsten Schritte:

- Untersuchungen der Expression mit größerem Probenumfang und parallel von Proben aus verschiedenen Geweben und Tumoren. Hierzu bieten sich die Microarray-Techniken an. Bestimmung der Lokalisation von Spleißformen könnte z.B. mit in situ-Hybridisierung auf Kryostatschnitten gezeigt werden.

- Untersuchung der Funktion gespleißter RNA-Transkripte z. B. mit RNAi-Techniken (*RNA interference*). RNAi besteht aus Stücken der Einstrang- oder Doppelstrang-RNA, die komplementär zu einer bekannten RNA binden und somit die Genfunktion ausschalten können. Dieses Phänomen wird auch PTGS (*posttranscriptional gene silencing*) genannt. Durch Ausschalten einer der Spleißformen könnten die Veränderungen der zugehörigen Genexpression sowie ihre Auswirkungen auf die übrigen Wnt-Moleküle erforscht werden. RNAi steht heute im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses als eine der Möglichkeiten der Gentherapie.

- Untersuchungen der Proteinstruktur und Proteinfunktionen von gespleißten Transkripten und Immunohistochemie. Denn nur wenn mehr über die Funktion der Spleißproteine bekannt ist, kann man diese in die Diagnostik und Therapie etablieren.

5 Literaturverzeichnis

- [1] ABI-Prism (1997) ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. User Bulletin #2:1-37.
- [2] Altschul S.F., Gish. W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*; 1990:215:403-410.
- [3] Arber N., Eafle C.J., Spicak J., Racz I., Dite P., Haier J., Zavoral M., Lechuga M.J., Gerletti P., Tang J., Rosenstein R.B., Macdonald K., Bhadra P., Fowler R., Wittes J., Zauber A.G., Solomon S.D., Levin B., PreSap Trial Investigators.: Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. *N. Engl. J. Med.*; 2006:355(9):885-950.
- [4] Benoit V., de Moraes E., Dar N.A., Taranchon E., Bours V., Hautefeuille A., Taniere P., Chariot A., Scoazec J.Y., de Moura Gallo C.V., Merville M.P., Hainaut P.: Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 by tumor suppressor p53 requires nuclear factor-kappa B. *Oncogene*; 2006: PMID: 16682957.
- [5] Bergman L.M., Blaydes J.P.: C-terminal binding proteins: emerging roles in cell survival and tumorigenesis. *Apoptosis*; 2006:11(6):879-88.
- [6] Brennan K., Gonzalez-Sancho J.M., Castelo-Soccio L.A., Howe L.R.; MC Brown A.: Truncated mutants of the putative Wnt receptor LRP6/Arrow can stabilize β -catenin independently of Frizzled proteins. *Oncogene*; 2004:23:4873–4884.
- [7] Brinkman B.M.N.: Splice variants as cancer biomarkers. *Clin. Biochem.*; 2004:37:584-594.
- [8] Bondi J., Bukholm G., Nesland J.M., Bukholm I.R.K.: Expression of non-membranous β -catenin and γ -catenin, c-Myc and Cyclin D1 in relation to patient outcome in human colon adenocarcinomas. *APMIS*; 2004:112:49-56.
- [9] Buratti E., Barelle M., Barelle F.E.: Defective Splicing, disease and therapy: searching for master checkpoints in exon definition. *Nucleic Acids Res.*; 2006:34(12):3494-3510.
- [10] Burzio V., Antonelli M., Allende C.C., Allende J.E.: Biochemical and cellular characteristics of the four splice variants of protein kinase CK1 α from zebrafish (*Danio rerio*). *J. Cell. Biochem.*; 2002:86(4):805-14.
- [11] Bustin S.A.: Absolute quantification of m-RNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.*; 2000:25:169-193.

- [12] Bustin, S.A.: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.*; 2002; 29:23-39.
- [13] Caceres JF., Kornbliht AR.: Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.*; 2002;8:186-193.
- [14] Castellone M.D., Teramoto H, Williams B.O., Druey K.M., Gutkind J.S.: Prostaglandin E2 Promotes Colon Cancer Cell Growth Through a Gs-Axin- β -Catenin Signaling Axis. *Science*; 2005;310: 1504-10.
- [15] Choi J., Park S.Y., Costantini F., Jho E-H., Joo C-K.: Adenomatous Polyposis Coli Is Down-regulated by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in a Process Facilitated by Axin. *J. Biol. Chem.*; 2004;279:49188–49198.
- [16] Chung D.C. and Rustgi A.K.: The Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Genetics and Clinical Implications. *Ann. Intern. Med.*: 2003; 138:560-570.
- [17] Cong F., Zhang J., Pao W., Zhou P., Varmus H.: A protein knockdown strategy to study the function of β -catenin in tumorigenesis, *BMC Mol. Biol.*; 2003;4:10:1471-2199.
- [18] Cong F., Varmus H.: Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of β -catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 2004;101(9):2882-2887.
- [19] Daly P.A.: Genetic counselling in breast and colorectal cancer. *Ann. Oncol.*: 2005; 16 (Supplement 2):163–169.
- [20] Davidson G., Wu W., Shen J., Bilic J., Fenger U., Stannek P., Glinka A., Niehrs C.:Casein kinas 1 γ couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*; 2005;438:867-872.
- [21] Dubois T., Howell S., Zemlickova E., Aitken A.: Identification of casein kinase IA interacting protein partners. *FEBS Lett.*; 2002;517:167-171.
- [22] Fang M., Li J., Blauwkamp T., Bhambhani C., Campbell N., Cadigan K.M.: C-terminal binding protein directly activates and represses Wnt transcriptional targets in *Drosophila*. *EMBO J.*; 2006;25(12):2735-45.
- [23] Farago M., Dominguez I., Landesman-Bollang E., Xu X., Rosner A., Cardiff RD., Seldin DC.: Kinase-inactive glycogen Synthase kinase 3 β promotes wnt signalling and mammary tumorigenesis. *Cancer Res.*; 2005;65:5792-5801.
- [24] Faustino NA., Cooper TA.: Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.*; 2003;17:419-437.

- [25] Fearon E. and Vogelstein B.: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 2004 Sep 17;118(6):671-4.
- [26] The Oncology Center Program in Human Genetics The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland 21231, USA
- [27] Fujino T., Asaba H., Kang M-J., Ikeda Y., Sone H., Takada S., Kim D-H., Ioka R.X., Ono M., Tomoyori H., Okubo M., Murase T., Kamataki A., Yamamoto J., Magoori K., Takahashi S., Miyamoto Y., Oishi H., Nose M., Okazaki M., Usui S.I., Imaizumi K., Yanagisawa M., Sakai J., Yamamoto T.: Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 2003;100:229–234.
- [28] Georgieff A., Pinto D., Begthel H., Destree O., Kielman M., Clevers H.: Expression Pattern of Wnt Signaling Components in the Adult Intestine. *J. Gastro*; 2005.
- [29] Goldstrohm A.C., Greenleaf A.L., Garcia-Blanco M.A.: Co-transcriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing. *Gene*; 2001;277:31-47.
- [30] Grootclaes M., Deveaux Q., Hildebrand J., Zhang Q., Goodman R.H., Frisch S.: C-terminal-binding protein corepresses epithelial and proapoptotic gene expression programs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 2003; 100(8):4568–4573.
- [31] Gupta S., Zink D., Korn B., Vingron M., Haas S.A.: Strengths and weaknesses of EST-based prediction of tissue-specific alternative splicing. *BMC Genomics*; 2004;5:72:1471-2164.
- [32] Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E., Wagner, M.: Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*; 2001; 67:3122-3126.
- [33] Heinemann, K.: Molekulargenetische Diagnostik bei HNPCC (Hereditäres Kolorektal-Karzinom ohne generalisierte Polyposis). *Schweiz Arzteztg*; 2000;81:36: 2009-2012.
- [34] Herz J., Bock H.: Lipoprotein Receptors in the Nervous System. *Annu. Rev. Biochem.*; 2002;71:405-34.
- [35] Herold G.: *Innere Medizin*. 2003.

- [36] Hoang BH., Kubo T., Healey JH., Sowers R., Mazza BA., Yang R., Huvos AG., Meyers PA., Gorlick R.: Expression of LDL receptor-related protein 5 (LRP5) as a novel marker for disease progression in high-grade osteosarcoma. *Int. J. Cancer*; 2004; 109(1):106-11.
- [37] Horiguchi R., Tokumoto M., Nagahama Y., Tokumoto T.: Molecular cloning and expression of cDNA coding for four spliced isoforms of casein kinase I α in goldfish oocytes. *Biochim. Biophys. Acta*; 2005; 1721(1):75-80.
- [38] Hulsken J., Birchmeier W., Behrens J.: E-cadherin and APC compete for the interaction with β -catenin and the cytoskeleton. *J. Cell. Biochem.*; 1994;127:2061-2069.
- [39] Hussain MM: Structural, biochemical and signaling properties of the low-density lipoprotein receptor gene family. *Front. Biosci.*; 2001, 6:D417-D428.
- [40] International Human Genome Sequencing Consortium: Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*; 2004; 431: 931-945.
- [41] Kemmner W., Schlag P.M.: Die Moleküle der Metastasierung. *Chir. Praxis*; 2003;16:203-212.
- [42] Kikuchi A.: Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci.*; 2003; 94(3): 225–229.
- [43] Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S, Kishida M, Sakamoto I, Koyama S, Kikuchi A: Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of β -catenin. *J. Biol. Chem.*; 1998; 273:10823-10826.
- [44] Knippers R.: *Molekulare Genetik*. 2001; Georg Thieme Verlag; 8.Auflage.
- [45] Knippschild U.; Wolff S.; Giamas G., Brockschmidt C., Wittau M., Würfl P.U., Eismann T., Stöter M.: The Role of the Casein Kinase 1 (CK1) Family in Different Signaling Pathways Linked to Cancer Development. *Onkologie*; 2005;28:508–514.
- [46] Koh T.J., Bulitta C.J., Fleming J.V., Dockray G.J., Varro A., Wang T.C.: Gastrin is a target of the β -catenin/TCF4 growth-signaling pathway in a model of intestinal polyposis. *J. Clin. Invest.*; 2000;106(4):533-9.
- [47] Kornblihtt AR., de la Malta M., Fededa JP., Munoz MJ., Nogues G.: Multiple links between transcription and splicing. *RNA*; 2004;10:1489-1498.

- [48] Kühl M., Geis K., Sheldahl L. C., Pukrop T., Moon R. T., Wedlich D.: Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca^{2+} signaling. *Mech. Dev.*; 2001:106:61-76.
- [49] Kwok JB., Hallupp M., Loy CT., Chan DK., Woo J., Mellick GD., Buchanan DD., Silburn PA., Halliday GM., Schofield PR.: GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*; 2005:58(6):829-39.
- [50] Luo W., Zou H., Jin L., Lin S., Li Q., Ye Z., Rui H., Lin SC.: Axin contains three separable domains that confer intramolecular, homodimeric, and heterodimeric interactions involved in distinct functions. *J. Biol. Chem.*; 2005:280(6):5054-60.
- [51] Lustig B., Behrens J.: The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*; 2003:129: 199–221.
- [52] Mao J., Wang J., Liu B., Pan W., Farr G.H., III, Flynn C., Yuan H., Takada S., Kimelman D., Li L., Wu D.: Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-5 Binds to Axin and Regulates the Canonical Wnt Signaling Pathway. *Molecular Cell*; 2001:7:801–809.
- [53] Mezhybovska M., Wikström K., Öhd JF., Sjölander A.: The inflammatory mediator leukotrien D4 induces β -catenin signalling and its association with anti-apoptotic bcl-2 in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*; 2006:281(10):6776-84.
- [54] Milani L., Fredriksson M., Syvanen AC.: Detection of alternatively spliced transcripts in leukemia cell lines by minisequencing on microarrays. *Clin. Chem.*; 2006:52(2):202-211.
- [55] Miller J.: The Wnts. *Genome Biol.*; 2001:3(1): reviews 3001.1-3001.15.
- [56] Modrek B., Lee C.: A genomic view of alternative splicing. *Nat. Genet.*; 2002:30:13-19.
- [57] Mukai F., Ishiguro K., Sano Y., Fujita SC.: Alternative Splicing isoform of tau proteinkinase I / glycogen synthase kinase 3 β . *J. Neurochem.*; 2002:81:1073-1083.
- [58] Nakajima M., Fukuchi M., Miyazaki T., Masuda N., Kato H., Kuwano H.: Reduced expression of Axin correlates with tumour progression of oesophageal squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*; 2003:88:1734-1739.
- [59] Nelson W.J., Nusse R.: Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science*; 2004:303:1483-1487.
- [60] Newton, Graham: PCR. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg;1994.

- [61] Newton A., Wong C.S., Pignaletti M.: β -Catenin-A Linchpin in colorectal Carcinogenesis? *Am. J. Pathol.*; 2002:160:389-401.
- [62] Nollet F., Berx G., Molemans F., van Roy F.: Genomic organisation of the Human β -Catenin Gene (CTNNB1). *Genomics*; 1996:32:413-424.
- [63] Okubo M., Horinishi A., Kim D-H., Yamamoto T. T., Murase T.: Seven Novel Sequence Variants in the Human Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 5 (LRP5) Gene. *Hum. Mutat.*; 2002: Mutation in Brief #483 Online.
- [64] Olmeda D., Castel S., Vilaro S., Cano A.: β -Catenin Regulation during the Cell Cycle: Implications in G2/M and Apoptosis. *Mol. Biol. Cell*; 2003:14:2844–2860.
- [65] Ozaki T., Watanabe K-I., Nakagawa T., Miyazaki K., Takahashi M., Nakagawara A.: Function of p73, not p53, is inhibited by the physical interaction with RACK1 and its inhibitory effect is counteracted by pRB. *Oncogene*; 2003:22:3231-3242.
- [66] Peifer M., Polakis M.: Wnt Signaling in Oncogenesis and Embryogenesis-A Look Outside the Nucleus. *Science*; 2000:287:1606-1609.
- [67] Perez C., Vandesompele J., Vanderbroucke I., Holtappels G., Speleman F., Gevaert P., Vancauverberge P., Bachert C.: Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction for measurement of human Interleukin-5 receptor alpha spliced isoforms mRNA. *BMC Biotechnol.*; 2003:3(17).
- [68] Pospisil H., Herrmann A., Bortfeld RH., Reich JG.: EASED: Extended Alternatively Spliced EST Database. *Nucleic Acids Res.*; 2003:32:70-74.
- [69] Pospisil H., Herrmann A., Butherus K., Pirson S., Reich JG., Kemmner W.: Verification of predicted alternatively spliced Wnt genes reveals two new splice variants (CTNNB1 and LRP5) and altered Axin-1 expression during tumour progression. *BMC Genomics*; 2006:7:148: 1471-2164.
- [70] Pyrco P., Soriano N., Kardosch A., Liu YT., Uddin J., Petasis NA., Hofman FM., Chen CS., Chen TC., Schonthal AH.: Downregulation of surviving expression and concomitant induction of apoptosis celecoxib and its non-cyclooxygenase-2-inhibitory analog, dimethyl-celecoxib (DMC), in tumor cells in vitro and in vivo. *Mol. Cancer*; 2006:5:19.
- [71] Roth MJ., Hu N., Johnson LL., Quon-Hang W., Ahnen DJ., Iwamoto M., Dawsey SM., Taylor PR., Huppi K.: Beta-catenin splice variants and downstream targets as markers for neoplastic progression of esophageal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*; 2005; 44(4):423-428.

- [72] Roy M., Xu Q., Lee C.: Evidence that public database records for many cancer-associated genes reflect a splice form found in tumors and lack normal splice forms. *Nucleic Acids Res.*; 2005: 33(16):5026–5033.
- [73] Salahshor S., Woodgett JR.: The links between axin and carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.*; 2005; 58:225-236.
- [74] Schaffer B., Wiedau-pazos M., Geschwind DH.: Gene struktur and alternative splicing of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) in neuronal and non-neuronal tissues. *Gene*; 2003:302:73-81.
- [75] Schild T.: 7700 SDS Workshop, Einführung in die Real-Time TaqMan^a PCR-Technologie. Applied Biosystems GmbH Weiterstadt; Version 2.1.
- [76] Schulmann K., Schmiegel W.: „Kolorektales Karzinom“ in Nicht-hereditäre Tumorerkrankungen - Ganten D./ Ruckpaul K. (Hrsg.); Springer Verlag; 2002: Kapitel 8:231-256.
- [77] Seto E. S., Bellen H. J.: The ins and outs of Wingleless signalling. *Trends Cell Biol.*; 2004:14:45-53.
- [78] Shakoori A., Ougolkov A., Yu Z.W., Zhang B., Modarressi M.H., Billadeau D.D., Mai M., Takahashi Y., Minamoto T.: Deregulated GSK3 β activity in colorectal cancer: Its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 2005:334:1365–1373.
- [79] Sharp PA.: Split genes and RNA splicing. *Cells*; 1994:77:805-815.
- [80] Smith WJ., Valcarcel J.: Alternative pre-mRNA splicing: the logical of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.*; 2000:25:381-388.
- [81] Sparks AB., Morin PJ., Vogelstein B., Kinzler KW.: Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res.*; 1998:58(6):1130-34.
- [82] Sobrado P., Jedlicki A., Bustos VH., Allende CC., Allende JE.: Basic region of residues 228-231 of protein kinase CK1alpha is involved in ist interaction with axin: binding to axin does not affect the kinase activity. *J. Cell. Biochem.*; 2005:94:217-224.
- [83] Srivastava S., Verma M., Henson D.E.: Biomarkers for Early Detection of Colon Cancer. *Clin. Cancer Res.*; 2001:7:1118–1126.

- [84] Strickland D.K.; Ranganathan S.: Diverse role of LDL receptor-related protein in the clearance of proteases and in signaling. *J. Thromb. Haemost.*; 2003;1:1663–70.
- [85] Suriano G., Vrceli N., Senz J., Ferreira P., Masoudi H., Cox K., Nabais S., Lopes C., Machado JC., Seruca R., Carneiro F., Huntsman DG.: β -Catenin(CTNNB1) gene amplification: A new mechanism of protein overexpression in cancer. *Genes Chromosomes Cancer*; 2005;42:238-246.
- [86] Tamai K., Zeng X., Liu C., Zhang X., Harada Y., Chang Z., He X.: A Mechanism for Wnt Coreceptor Activation. *Mol. Cell*; 2004;13:149–156.
- [87] Thiele A., Nagamine Y., Hauschildt S., Clevers H.: AU-rich elements and alternative splicing in the beta-catenin 3'-UTR can influence the human beta-catenin mRNA stability. *Exp. Cell Res.*; 2006;312(12):2367-78.
- [88] Thorstensen L., Lothe RA.: The WNT Signalling Pathway and its role in human solid tumors. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* April 2003. [<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/WNTSignPathID20042.html>]
- [89] Valenta T., Lukas J., Korinek V.: HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells. *Nucleic Acids Res.*; 2003;31:2369-2380.
- [90] Van Es J.H., Clevers H.: Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease. *Trends Mol Med*; 2005;11(11):496-502.
- [91] Verger A., Quinlan K.G., Crofts L.A., Spano S., Corda D., Kable E.P., Braet F., Crossley M.: Mechanisms directing the nuclear localization of the CtBP family proteins. *Mol. Cell. Biol.*; 2006; 26(13):4882-94.
- [92] Wakei K., Hirose K., Matuso K., Ito H., Kuriki K., Suzuki T., Kato T., Hirai T., Kanemitsu Y., Tajima K.: Dietary Risk Factors for Colon and Rectal Cancers: A Comparative Case-Control Study. *J. Epidemiol.*; 2006; 6:125-134.
- [93] Wong CK, Luo W, Deng Y, Zou H, Ye Z, Lin SC: The DIX domain protein coiled-coil-DIX1 inhibits c-Jun N-terminal kinase activation by Axin and dishevelled through distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:39366-39373.
- [94] Wong YW., Sia GM., Too HP.: Quantification of mouse glial cell-line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2 alternatively spliced isoforms by real time detection PCR using SYBR Green I. *Neurosci. Lett.*; 2002;320(3):141-145.

- [95] Xu Q., Lee C.: Discovery of novel splice forms and functional analysis of cancer-specific alternative splicing in human expressed sequences. *Nucleic Acids Res.*; 2003: 31(19): 5635-5643.
- [96] Yu DH., Zhou L., Wang P., Wang QZ., Cheng ZN.: Inhibition of gastric cancer cells growth in vitro bei sulindac. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*; 2006:28(7):498-502.
- [97] KEGG database, 1995. (Accessed April 2005 at <http://www.genome.jp/kegg/>)
- [98] Tumor Classification Correspond to AJCC Cancer Staging Forms 6th Ed., 2003.(Accessed April 2005 http://cc.ucsf.edu/ajcc/Colon_Rectum.pdf)
- [99] EASED, Extended Alternatively spliced EST-Database, 2004. (Accessed September 2003 and December 2006 at <http://eased.bioinf.mdc-berlin.de/>) CGAP-Liste, 1998. (Accessed September 2003 at <http://cgap.nci.nih.gov/Genes/PathGeneQuery?PAGE=1&ORG=Hs&PATH=wntPathway>)
- [100] SwissProt, 2003. (Accessed September 2005 at <http://www.expasy.org/>)
- [101] PubMed, 1998. (Accessed September 2003 at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>)
- [102] GenBank am NCBI, 1988. (Accessed 2006 at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- [103] Ensembl, 2004. (Accessed 2006 at <http://www.ensembl.org/index.html>)

6 Abkürzungen

A

A	Adenin
aa	Aminosäure
alt.	Alternative Spleißform
APC	Adenomatöse Polyposis Coli

B

bcl	Onkogen der t (14;18) (q32;q21)-Translokation bei follikulären Non-Hodgkin-Lymphomen
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BRCA	Breast Carcinoma Gen

C

C	Cytosin
Ca ²⁺	Calcium
CD	Cluster of differentiation
Cdk (4,6)	Cyclin depended kinase (4,6)
cDNA	copyDNA
CDS	Protein codierende Sequenz
CK	Casein Kinase
Const. DNA	Konstitutiv gespleißte DNA
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRD	Cysteinreiche Domäne
C _T	Threshold cycle
CtBP	C-terminal Binding Protein
CTD	C-Terminale Domäne

D

Da	Dalton
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonate behandeltes, RNAase freies Wasser
DIX	Proteindomäne in Molekülen Axin, Dishvelled
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
Dsh	Dishevelled

E

EASED	Extended Alternatively Spliced EST-Database
EGF	Epidermal Growth Factor
ESE	Exonic Splicing Enhancer
ESS	Exonic Splicing Silencer
EST	Expressed Sequence Tag

F

FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
For-	Forward, forwards

G

G	Guanin
G-Phase	engl. growth, Wachstumsphase der Mitose

H	GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3beta
	HNPCC	Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer
	hnRNP	heterogenes nucleares Ribonucleoprotein
	H ₂ O	Chemische Formel für Wasser
	HMG	High Mobility Group
I		
	ISE	Intronic Splicing Enhancer
	ISS	Intronic Splicing Silencer
J		
	JNK	Jun N-terminal Kinase, syn. SAPK stress-activated Phospho-kinase
K		
	Konst. K-Ras	Konstitutive (auch normale) Spleißform Onkogen, Kleine GTPase; (K)steht für Kirsten, Name des Entdeckers, und (Ras) für Rattensarkom, wo das Enzym zum ersten Mal identifiziert wurde
L		
	LEF	Lymphoid Enhancer Factor
	LDL	Low density lipoprotein
	LRP	Low density lipoprotein related protein
M		
	MDR	Multidrug Resistance
	MgCl ₂	Chemische Formel für Magnesiumchlorid
	min	Minute
	mRNA	Messenger RNA
	MSH, MLH	DNA-Reparatur-Gene
	M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse
	Reverse Transkriptase	Transkriptase
	MMR	Mismatch Repair
N		
	NADH	Nicotinamidadeninucleotid
	NF1	Neurofibromatose 1
	NFκB	Transkriptionsfaktor; nuclear factor regulating expression of kappa light-chain immunoglobulin
	Norm.	Normale (auch konstitutive) Spleißform
	Nr.	Nummer
	NSAID	Non-steroidal Anti-Inflammatory Drugs
P		
	P	Phosphor
	p53	Tumorsuppressorprotein p53
	PCR	Polymerase Chain Reaction
	pre-mRNA	precursor mRNA
	pRP	precursor Riboprotein
	PSA	Prostata Specific Antigen
	PTB	Pyrimidine Tract Binding protein
R		
	Rev-	Reverse, rückwärts
	RGS	Regulator of G-protein domain

Abkürzungen

	Rn-Wert	Quotient aus Emissionsintensität des Reporter-Farbstoffs und des Referenzfarbstoffs
	RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
	rpm	rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
	RRM	RNA Recognition Motive
	RS-Domäne	repeated serine / arginine repeats; Domäne mit vielen RRM's in SR-Proteinen
S	RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
	S	Serin
	sec	Sekunde
	S-Phase	Synthese-Phase der Mitose
	siRNA	Small interfering RNA
	SMAD(2,4)	Namensbildung aus Abkürzungen von codierenden Drosophila-Gen Mad (Mother against decapentaplegic) und C. elegans-Gen Sma (Small body size); Funktion als Rezeptorproteine im TGFbeta-Signalweg
	snRNA	Small nuclear RNA
	snRNP	Small nuclear Ribonucleoprotein
	SR	splicing regulatory
T	T	Thymin
	Taq-Polymerase	Thermus aquaticus-Polymerase
	T _m [°C]	Temperatur[Grad Celcius]
	TCF	T-cell factor
	TGF beta	transforming growth factor beta
	TGF beta IIR	transforming growth factor beta receptor II
	(β)TRCP	(β)Transductin-repeat-Containing Protein
U	U	Uracil
	U1-U6	Bezeichnung für verschiedene snRNPs, die als Untereinheiten im Spleißosom fungieren
	U2AF	U2-snRNP auxillary factor
	UTR	untranslated regions
V	VEGF	Vascular endothel growth factor
W	WT1	Wilms Tumor 1 Gen

7 Anhang

CT-Werte von Patientenproben für die *Axin1*-Spleißisoformen:

PATIENT	MATERIAL	C_T <i>Axin1</i> NORMAL		C_T <i>β-Actin</i>		ΔC_T		$\Delta\Delta C_T$		RELATIVE EXPRESSION
		M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	
LS174T	Zellen	25,67	0,8	18,31	0,10	7,36	0,76	0,00	0,76	1,00
1943	Mucosa	28,22	0,23	20,15	0,22	8,07	0,32	0,68	0,32	0,62
1943	Tumor	27,60	0,13	20,93	1,22	6,67	1,23	-0,72	1,23	1,65
1626	Mucosa	24,93	0,39	17,67	0,36	7,27	0,53	-0,13	0,53	1,09
1626	Tumor	26,30	0,81	18,20	1,01	8,09	1,29	0,70	1,29	0,62
3032	Mucosa	29,58	0,05	18,99	0,13	10,59	0,14	3,19	0,14	0,11
3032	Tumor	29,95	1,96	20,90	0,17	9,05	1,97	1,66	1,97	0,32
2456	Mucosa	27,51	0,09	20,25	1,36	7,26	1,36	-0,13	1,36	1,10
2456	Tumor	25,82	0,46	18,88	0,62	6,94	0,77	-0,46	0,77	1,37
2914	Mucosa	26,87	0,10	18,15	0,10	8,72	0,14	1,36	0,14	0,39
2914	Tumor	26,34	0,10	17,67	0,10	8,67	0,13	1,31	0,13	0,40
2887	Mucosa	29,29	0,10	21,16	0,00	8,13	0,09	0,77	0,09	0,59
2887	Tumor	28,93	0,20	20,36	0,20	8,57	0,28	1,21	0,28	0,43
1112	Mucosa	27,22	0,10	19,62	0,20	7,60	0,22	0,24	0,22	0,85
1112	Tumor	30,67	0,20	20,91	0,10	9,76	0,28	2,40	0,28	0,19
214	Mucosa	29,16	0,10	21,67	0,10	7,49	0,16	0,13	0,16	0,91
214	Tumor	30,07	0,50	20,82	0,20	9,25	0,54	1,89	0,54	0,27
2184	Mucosa	27,47	0,20	19,21	0,00	8,26	0,18	0,83	0,18	0,56
2184	Tumor	26,26	0,10	18,95	0,10	7,31	0,11	-0,11	0,11	1,08
2760	Mucosa	29,16	0,30	19,95	0,10	9,21	0,31	1,78	0,31	0,29
2760	Tumor	26,1	0,10	19,83	0,10	6,27	0,11	-1,16	0,11	2,23
2886	Mucosa	25,86	0,10	17,76	0,10	8,10	0,13	0,68	0,13	0,63
2886	Tumor	25,6	0,10	17,78	0,10	7,83	0,16	0,40	0,16	0,76
2571	Mucosa	27,48	0,50	19,17	0,00	8,31	0,47	0,88	0,47	0,54
2571	Tumor	26,57	0,20	17,82	0,10	8,75	0,21	1,33	0,21	0,40
398	Mucosa	28,65	0,10	20,62	0,10	8,03	0,12	-0,29	0,12	1,22
398	Tumor	27,35	0,20	19,2	0,30	8,15	0,37	-0,17	0,37	1,13
2104	Mucosa	26,97	0,20	18,74	0,10	8,23	0,21	-0,09	0,21	1,06
2104	Tumor	24,48	0,10	17,30	0,10	7,18	0,10	-1,14	0,10	2,21

Tabelle 19: Ergebnisse der Real-Time *Axin*-RT-PCR für die konstitutive *Axin1*-Isoform. Werte der relativen Expressionsmenge in blau spiegeln Down-Regulation und in rot Up-Regulation der *Axin1*-Isoform im Vergleich zu der Expression in der LS 174T Kalibrator-Zelllinie wider. Abkürzungen: Normal – Konstitutive *Axin1*-Spleißisoform; M - Mittelwert; SD - Standardabweichung; C_T - engl. threshold cycle.

PATIENT	MATERIAL	C_T <i>Axin1</i> ALT.		C_T β -Actin		ΔC_T		$\Delta\Delta C_T$		RELATIVE EXPRESSION
		M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	
LS174T	Zellen	26,74	0,10	18,31	0,10	8,44	0,16	0,00	0,16	1,00
1943	Mucosa	29,91	0,62	20,15	0,22	9,76	0,66	0,83	0,66	0,56
1943	Tumor	29,19	0,09	20,93	1,22	8,26	1,22	-0,67	1,22	1,59
1626	Mucosa	27,55	0,22	17,67	0,36	9,89	0,42	0,96	0,42	0,52
1626	Tumor	26,95	0,24	18,20	1,01	8,75	1,04	-0,18	1,04	1,14
3032	Mucosa	30,49	0,32	18,99	0,13	11,50	0,35	2,57	0,35	0,17
3032	Tumor	31,39	1,85	20,90	0,17	10,49	1,86	1,56	1,86	0,34
2456	Mucosa	30,08	1,03	20,25	1,36	9,83	1,70	0,90	1,70	0,54
2456	Tumor	27,97	0,75	18,88	0,62	9,09	0,97	0,16	0,97	0,89
2914	Mucosa	28,5	0,20	18,15	0,10	10,36	0,21	1,92	0,21	0,26
2914	Tumor	28,06	0,00	17,67	0,10	10,39	0,09	1,95	0,09	0,26
2887	Mucosa	30,56	0,30	21,16	0,00	9,40	0,33	0,97	0,33	0,51
2887	Tumor	30,35	0,10	20,36	0,20	10,00	0,21	1,56	0,21	0,34
1112	Mucosa	28,67	0,20	19,62	0,20	9,05	0,27	0,62	0,27	0,65
1112	Tumor	32,16	0,20	20,91	0,10	11,24	0,21	2,81	0,21	0,14
214	Mucosa	30,59	0,00	21,67	0,10	8,92	0,13	0,48	0,13	0,72
214	Tumor	30,81	0,20	20,82	0,20	9,99	0,24	1,56	0,24	0,34
2184	Mucosa	29,17	0,20	19,21	0,00	9,96	0,17	1,68	0,17	0,31
2184	Tumor	26,45	0,10	18,95	0,10	7,50	0,08	-0,78	0,08	1,72
2760	Mucosa	30,78	0,40	19,95	0,10	10,83	0,43	2,55	0,43	0,17
2760	Tumor	27,77	0,10	19,83	0,10	7,94	0,11	-0,34	0,11	1,26
2886	Mucosa	27,59	0,20	17,76	0,10	9,83	0,27	1,55	0,27	0,34
2886	Tumor	27,46	0,10	17,78	0,10	9,68	0,14	1,40	0,14	0,38
2571	Mucosa	28,98	0,20	19,17	0,00	9,81	0,17	1,53	0,17	0,35
2571	Tumor	27,95	0,50	17,82	0,10	10,13	0,48	1,85	0,48	0,28
398	Mucosa	30,91	0,20	20,62	0,10	10,29	0,23	1,57	0,23	0,34
398	Tumor	29,47	0,30	19,2	0,30	10,27	0,41	1,56	0,41	0,34
2104	Mucosa	28,4	0,10	18,74	0,10	9,66	0,10	0,94	0,10	0,52
2104	Tumor	26,28	0,10	17,30	0,10	8,98	0,10	0,26	0,10	0,84

Tabelle 20: Ergebnisse der Real-Time *Axin*-RT-PCR für die alterative *Axin1*-Isoform. Werte der relativen Expressionsmenge in blau spiegeln Down-Regulation und in rot Up-Regulation der *Axin1*-Isoform im Vergleich zu der Expression in der LS 174T Kalibrator-Zelllinie wider. Abkürzungen: Alt.– Konstitutive *Axin1*-Spleißisoform; M - Mittelwert; SD - Standardabweichung; C_T - engl. threshold cycle.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Publikation

Pospisil H., Herrmann A., **Butherus K.**, Pirson S., Reich J.G., Kemmner W.:
Verification of predicted alternatively spliced Wnt genes reveals two new splice variants
(CTNN B1 and LRP5) and altered Axin1 expression during tumour progression. BMC
Genomics; 2006:7:148: 1471-2164.

Erklärung an Eides Statt

„Ich, Kristine Butherus, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Identifizierung von Spleißvarianten mit prognostischer Relevanz im Kolonkarzinom

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Kiel, 25.09.2007

Kristine Butherus