

Analyse der Bedeutung von Veränderungen in PKB- β in menschlichen Tumorerkrankungen



Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

eingereicht an der
Medizinischen Fakultät, Klinik für Innere Medizin II,
Direktor: Prof. Dr. Stefan Zeuzem
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2008

von
Anna Nain
geboren am 27.04.1983 in Blagoweschtschenka

Für Uwe

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1.1	Deutsch	1
1.2	English	3
2	Einleitung und Zielsetzung	4
2.1	Epidemiologie der menschlichen Tumorerkrankungen	4
2.1.1	Krebs in Deutschland	4
2.1.2	Krebsarten	6
2.2	Definition des kolorektalen Karzinoms	13
2.3	Ätiologie und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms	13
2.3.1	Exogene Risikofaktoren	13
2.3.2	Endogene Risikofaktoren	14
2.3.3	Resumé der Risiken	15
2.3.4	Tumorstadieneinteilung	16
2.4	Molekularbiologische Grundlagen der Kanzerogenese	19
2.4.1	Tumorentstehung aus molekularbiologischer Sicht	19
2.4.2	Mikrosatelliten-Instabilität	21
2.4.3	Bedeutung der Proteinkinase B	22
2.5	Fragestellungen der Doktorarbeit	27
2.5.1	Sequenzanalyse des AKT2/PKB β in Tumorproben	27
2.5.2	Alternative Spleiß-Variante 12a	28
3	Material und Methoden	30
3.1	Geräte und Einwegmaterialien	30
3.2	Allgemeine Chemikalien	32
3.3	Fertige Reagenzien-Sets	33
3.4	Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen	33
3.4.1	Enzyme	33
3.4.2	DNA-Längenstandards	33
3.4.3	Fluorogene Sonden	34
3.4.4	Oligonukleotide	34

3.5	Puffer und Lösungen	37
3.5.1	Probenauftragungspuffer	37
3.5.2	Invitrogen-Puffer	37
3.5.3	M-MLV RT 5X Reaktions-Puffer	38
3.6	Tumorproben	38
3.6.1	Tumorproben zur Extraktion der genomischer DNA	38
3.6.2	Tumorproben zur Extraktion der mRNA	39
3.7	Optimierung der gDNA-PCR	39
3.8	Standard-PCR	40
3.8.1	Prinzip der Polymerasekettenreaktion	40
3.8.2	Ziele der Polymerasekettenreaktion	41
3.8.3	Ansatz der Standard-PCR	42
3.8.4	Standard-PCR-Programm	43
3.9	Gelelektrophorese	44
3.9.1	Prinzip der Gelelektrophorese	44
3.9.2	Ansetzen des Gels	44
3.9.3	Einstellungen der Elektrophorese-Kammer	45
3.10	Aufreinigung der PCR-Produkte	45
3.11	Sequenzierungs-PCR	46
3.11.1	Prinzip der Kettenabbruchmethode	46
3.11.2	Ansatz der Sequenzierungs-PCR	47
3.11.3	Sequenzierungs-PCR-Programm	47
3.12	Größenausschluss-Chromatographie	48
3.13	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	49
3.13.1	Funktionsweise des DNA-Sequenzers	49
3.13.2	Durchführung der Sequenzierung	50
3.13.3	Auswertung der Sequenzierung	50
3.13.4	Ziele der Sequenzierung	51
3.14	cDNA-Generierung	52
3.14.1	Isolierung und Aufreinigung der mRNA	52
3.14.2	Reverse Transkription	53
3.14.3	cDNA-PCR	55
3.15	Qualitativer Nachweis der alternativen Spleiß-Variante 12a	57
3.16	Quantitative DNA-Bestimmung der alternativen Spleiß-Variante 12a	57
3.16.1	Prinzip der Real-Time-PCR	57
3.16.2	Ansatz der Real-Time-PCR	58
3.16.3	Real-Time-PCR-Programm	58
3.16.4	Auswertung der Real-Time-PCR	59

4	Ergebnisse	62
4.1	Sequenzanalyse des AKT2/PKB β in Tumorproben	62
4.1.1	Ergebnisse der Sequenzanalyse einer gDNA-Tumorbank	62
4.1.2	Ergebnisse der Sequenzanalyse einer cDNA-Tumorbank	81
4.2	Analyse der alternative Spleiß-Variante 12a	99
4.2.1	Qualitative Analyse der alternativen Spleiß-Variante 12a in Tumorproben	100
4.2.2	Quantitative Analyse der alternativen Spleiß-Variante 12a in Tumorproben	105
5	Diskussion	112
5.1	Diskussion der Sequenzanalyse des AKT2/ PKB β in Tumor- proben	112
5.2	Diskussion der Erforschung der alternativen Spleiß-Variante 12a	113
5.3	Resumé	114
	Abkürzungsverzeichnis	115
	Abbildungsverzeichnis	118
	Tabellenverzeichnis	121
	Literaturverzeichnis	122
A	Danksagung	134
B	Selbständigkeitserklärung	135

Kapitel 1

Zusammenfassung

1.1 Deutsch

Das kolorektale Karzinom gehört weltweit zu den häufigsten Todesursachen bei Tumorerkrankungen. An der Tumorgenese sind Mutationen in einer Vielzahl von Genen beteiligt. So auch die Proteinkinase B β /AKT2; sie treibt die untergeordneten Signalkaskaden voran und reguliert eine Fülle von zellulären Funktionen. Aufgrund von Berichten über Mutationsfunde in AKT2/PKB β wurden in der vorliegenden Arbeit genetische Veränderungen der Proteinkinase B β /AKT2 auf DNA- und mRNA-Ebene in humanen Kolonkarzinomen sowie in Nieren- und Magenkarzinomen gesucht. Es wurden jeweils 40 Tumore auf Mutationen in allen 13 Exons der genomischen DNA und weitere 40 auf Mutationen in der aus mRNA gewonnenen cDNA des gesamten AKT2/PKB β -Gens untersucht. Die Sequenzanalyse des AKT2/PKB β zeigte keinerlei Änderungen.

Somit konnte aufgrund der vorliegenden Ergebnisse die von Parsons postulierte Häufigkeit der Mutationen im AKT2/PKB β -Gen nicht bestätigt werden.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde eine im Rahmen einer Klonierungsarbeit entdeckte alternative Spleiß-Variante des AKT2/PKB β -Gens untersucht. Dabei ist ein "kryptisches Exon" aus dem zwischen Exon 12 und Exon 13 liegenden Intron in die mRNA eingespleißt. Das Vorkommen dieser Spleiß-Variante wurde in einer Gelelektrophorese sowie in der darauf folgenden Sequenzierung verifiziert. Durch PCR konnte gezeigt werden, dass das alternativ eingespleißte Exon (12a) in 42,4% der Tumorproben zu finden ist.

Des Weiteren wurde die alternative Spleiß-Variante 12a in der Real-Time-PCR im Verhältnis zur Wildtyp-Variante quantitativ bestimmt. Es wurden Tumore des Kolons, des Rektums und der Niere untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass unabhängig von der Tumorentität die alternative Spleiß-Variante 12a 2 bis 5% der Gesamt-AKT2/PKB β mRNA ausmacht. Die Funktionalität des dabei entstehenden Proteins und seine mögliche Involvierung in physiologische und pathophysiologische Prozesse soll weiter untersucht werden.

1.2 English

Colorectal cancer is the second leading cause of death deriving from neoplasm worldwide. Mutations of many genes can lead to the formation of cancer. One of these genes is protein kinase B β /AKT2 which activates the lower signal cascades and is responsible for the regulation of many cellular functions. By analysing the mutation in PKB β /AKT2, we hoped to get a better understanding of the pathogenesis of neoplasm. The genetic changes of PKB β /AKT2 in DNA and mRNA in the human colorectal, kidney and stomach cancer were investigated by examining mutations in 40 tumours in all 13 exons of genomic DNA and further 40 tumours resulting from cDNA of the whole AKT2/PKB β gene that derived from mRNA.

This analysis of PKB β /AKT2 did not show any sequence variation in any cancer sample.

Therefore the present results did not confirm the incidence of mutations described by Parsons.

In the second part of this project, the alternative splicing of PKB β /AKT2, which was discovered in a clone analysis, was examined in this splicing variant, a part of the intron situated between exon 12 and exon 13 was added to the mRNA. The existence of the alternative splicing variant 12a was confirmed by gel electrophoresis and sequencing. The alternative splicing variant 12a was found in 42.4% of the samples. Furthermore, the abundance of the alternative splicing variant 12a in comparison to the wild type variant was determined by quantitative PCR. Colorectal, kidney and stomach cancer samples were examined and showed the following result: the alternative splicing variant 12a is generated in 2 to 3% of all AKT2/PKB β and is, as for as the sample site allowed to determine not associated with a particular kind of cancer.

Kapitel 2

Einleitung und Zielsetzung

“Ich bin überzeugt, dass aberrierende Keime [...] außerordentlich häufig vorkommen, dass sie aber bei der überwiegenden Mehrzahl der Menschen vollkommen latent bleiben, dank der Schutzvorrichtungen des Organismus. Würden diese nicht bestehen, so könnte man vermuten, dass das Karzinom in einer geradezu ungeheuerlichen Frequenz auftreten würde.”

— Paul Ehrlich, Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung, 1909

2.1 Epidemiologie der menschlichen Tumorerkrankungen

2.1.1 Krebs in Deutschland

Durch Zellteilung vermehren sich die Zellen in unserem Körper. Der menschliche Körper besteht aus ca. 100 Billionen Zellen. Auch beim Erwachsenen wird Körpergewebe ständig erneuert, durch Zellteilung entstehen fortlaufend neue Zellen. Pro Sekunde sterben rund 50 Millionen Körperzellen ab und ebenso viele werden pro Sekunde durch Zellteilung neu gebildet. Genveränderungen entstehen oft während der Zellteilung. Die normale Entwicklung und Differenzierung jeder einzelnen Zelle und ihre Rolle im Zusammenspiel mit den übrigen Komponenten des Organismus wird durch die geeignete Auswahl von Genen aus dem Genpool der Zelle getroffen. Dies bedeutet umgekehrt, dass eine “weniger geeignete“ oder “veränderte“ Auswahl von Genen die Ursache von pathologischen Veränderungen sein kann, indem verschiedene Regulationsmechanismen wie Differenzierung, Homöostase, Zellzyklus-Regulation oder sogar Apoptose von einem Ausfall betroffen sein könnten und so die

Integration dieser Zelle in ihr natürliches Umfeld beeinträchtigt wird [58]. Als hauptverantwortlich für die Krebsentstehung gelten Umwelteinflüsse wie UV-Strahlung, bestimmte Bakterien oder Viren und die Exposition gegenüber chemischen Substanzen [7].

Krebs ist in unserer immer älter werdenden Gesellschaft eine mittlerweile fast alltägliche Diagnose geworden. Jeder kennt Betroffene im Freundes- oder gar Familienkreis. Noch sind die Herz-Kreislaufkrankungen unübertroffen führend in der Statistik der Todesursachen, sie werden jedoch von Jahr zu Jahr immer schneller von den Krebserkrankungen, die den zweiten Platz einnehmen, eingeholt. Infektionskrankheiten, die noch zu Beginn des letzten Jahrhunderts für viele Menschen tödlich verliefen, konnten inzwischen, durch die Verbesserung der Hygiene und die Entwicklung geeigneter Antibiotika und Impfstoffe, in der westlichen Welt weitgehend eingedämmt und als Todesursache zurückgedrängt werden. Trotz großer Anstrengung seitens Politik und Gesellschaft sowie enormer Ausgaben der Pharmakonzerne sind vergleichbare Triumphe in der Krebsforschung bislang nicht erreicht worden. Nach Angaben des statistischen Bundesamtes sterben pro Jahr in Deutschland immer noch mehr als 200.000 Menschen an Krebs [10]. Besonders die malignen Tumore des Gastrointestinaltraktes zeigen seit Jahrzehnten eine Zunahme der Inzidenz und Prävalenz. Im Durchschnitt überleben weniger als die Hälfte der Menschen, bei denen Krebs festgestellt wurde, den Zeitraum von 5 Jahren nach der Diagnose-Stellung [72].

Durch die großen Anstrengungen Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen zu verbessern, wird eines deutlich: ein Durchbruch in der Krebstherapie wird ohne ein grundsätzliches Verständnis der Molekularbiologie der einzelnen Krebsarten nicht möglich sein. Die Entdeckung und Charakterisierung möglichst vieler Gene, die an der Entstehung einer Krebsart beteiligt sind, erleichtert das Verständnis der Entstehung und Entwicklung von Neoplasien [72] [113].

2.1.2 Krebsarten

Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Wie amtliche Statistiken zeigen, ist Darmkrebs bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste Krebsneuerkrankung (Abb. 2.1). Nach dem Brustkrebs der Frau und dem Lungenkrebs des Mannes ist das kolorektale Karzinom außerdem die zweithäufigste Krebstodesursache (Abb. 2.2).

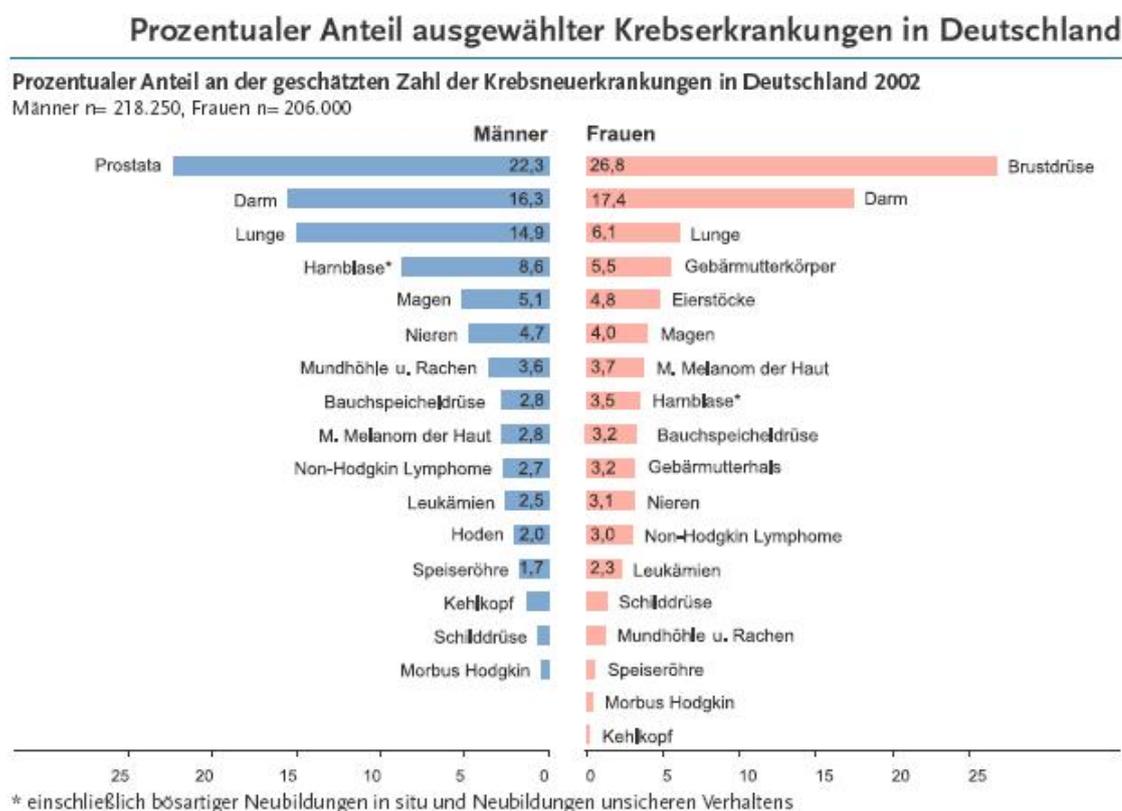


Abbildung 2.1: Diagramm der Krebsverteilung aus dem Jahr 2002 [10]

Für beide Diagramme des Statistischen Bundesamtes, vgl. Abb. 2.1 und 2.2, gilt: Unter Darmkrebs werden hier Krebserkrankungen des Dickdarms, des Mastdarms und des Anus zusammengefasst. In anderen Publikationen werden kolorektale Karzinome häufig auch ohne die eher als Plattenepithelkarzinome auftretenden Analkarzinome betrachtet. Das Analkarzinom hat nur einen geringen Anteil an allen Tumoren des Darms, sodass die hier getroffenen Aussagen auch für die kolorektalen Karzinome allein gültig sind [10].

Prozentualer Anteil an der Zahl der Krebssterbefälle in Deutschland 2002

Männer n= 109.631, Frauen n= 99.945

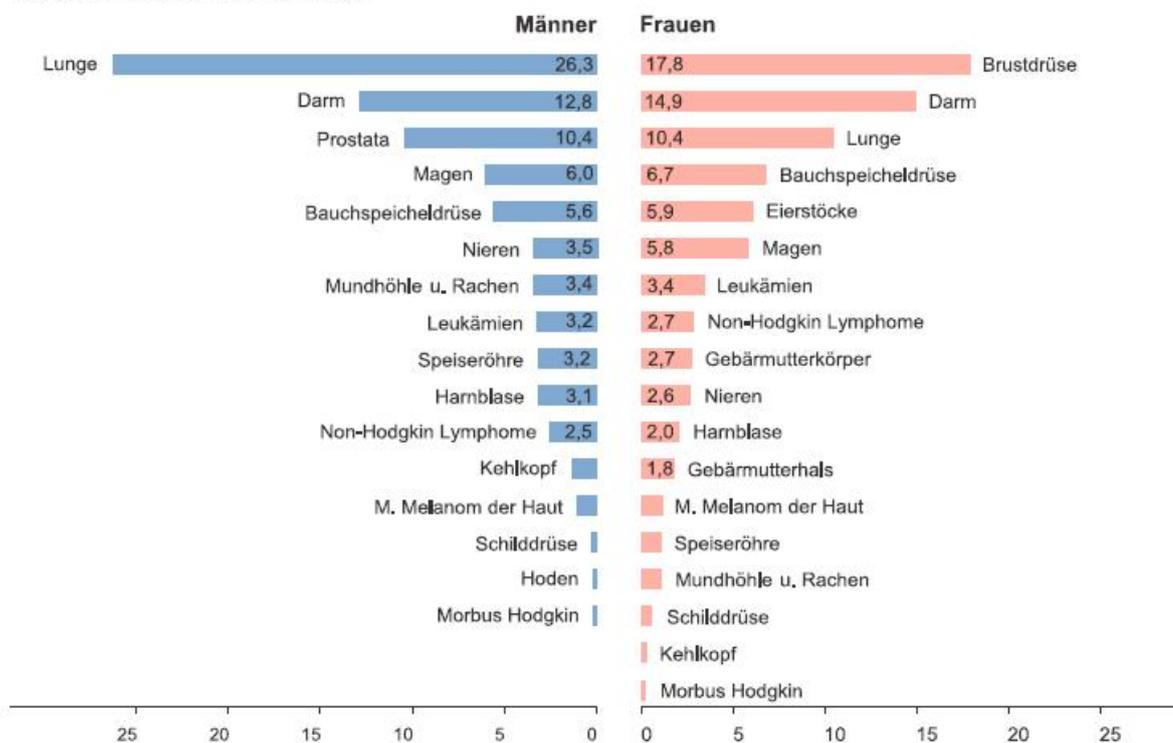


Abbildung 2.2: Diagramm der Krebstodesursachen aus dem Jahr 2002 [10]

Von den fünfziger bis zu den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts war in der westlichen Welt eine stetige Zunahme von Inzidenz und Prävalenz des kolorektalen Karzinoms zu verzeichnen. So hat sich die Inzidenz zwischen 1960 und 1980 verdoppelt [15] [65]. Nach jahrelangem Anstieg scheint sich die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms seit Anfang der neunziger Jahre auf einem hohem Niveau zu stabilisieren [84], während die Darmkrebs-Mortalität in den letzten 50 Jahren nicht wesentlich gesunken ist [15].

Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen an Darmkrebs in Deutschland wird für Männer und Frauen jeweils auf etwas über 35.000 geschätzt. Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung bei Männern liegt, mit einem steilen Anstieg nach dem 45., beim 69. Lebensjahr. Frauen erkranken im Mittel mit 75 Jahren, also vergleichsweise spät [10]. Mit zunehmendem Alter steigt die Zahl der Betroffenen exponentiell an. Nur etwa 5% der kolorektalen Karzinome treten vor dem 40. Lebensjahr auf und sind zumeist erblich bedingt [11].

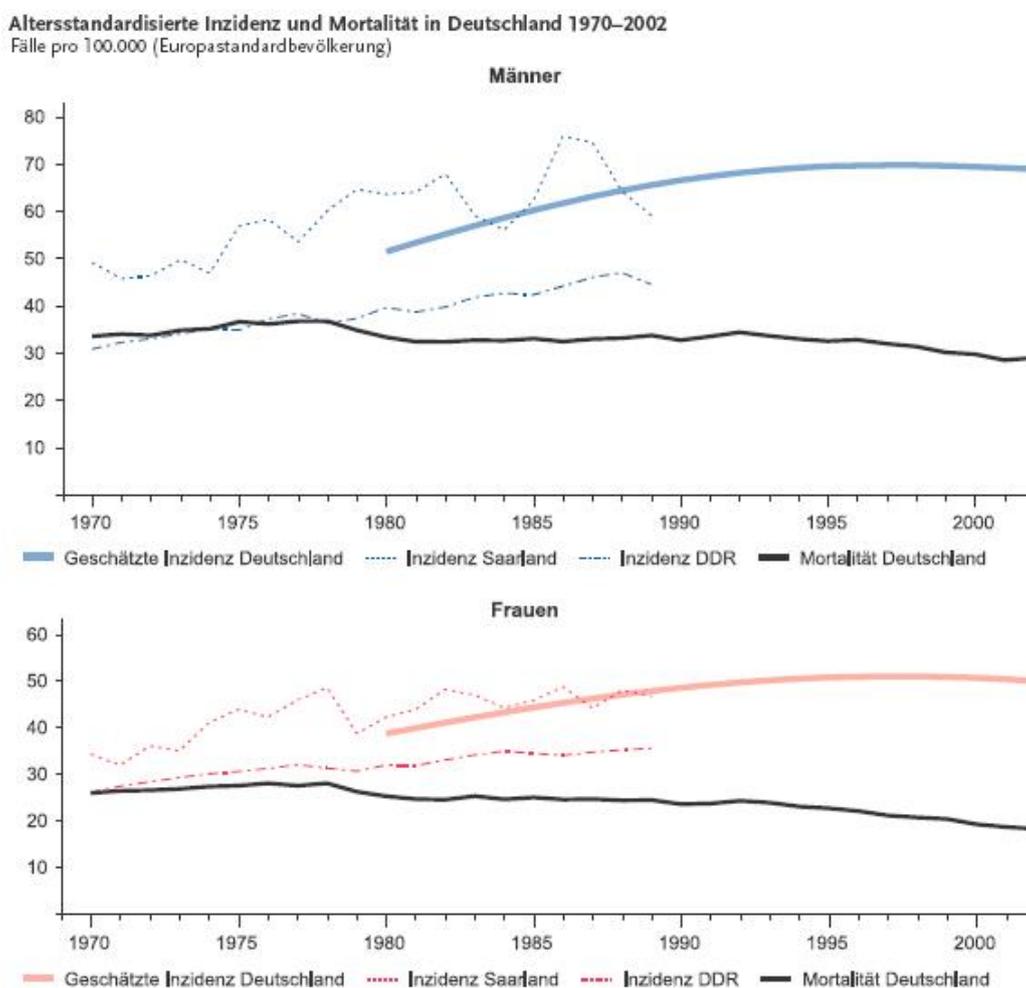


Abbildung 2.3: Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität für Darmkrebs in Deutschland 1970 bis 2002 [10]

Frauen haben ein gering höheres Risiko für das Kolonkarzinom als Männer (f/m 2,0:1,5), während sich diese Ratio bei Männern umgekehrt zugunsten des Rektumkarzinoms verhält [97]. Im Vergleich mit den Erkrankungsraten anderer EU-Länder steht die Darmkrebs-Inzidenz in Deutschland für Frauen an erster Stelle, die Erkrankungsraten der Männer stehen an vierter Stelle [10]. Für beide Geschlechter in den westlichen Industrienationen beträgt heute die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, durchschnittlich etwa 5-6% [89].

Auch weltweit gesehen gehört das kolorektale Karzinom neben dem Bronchi-alkarzinom und dem Mammakarzinom zu den häufigsten Malignomen [18].

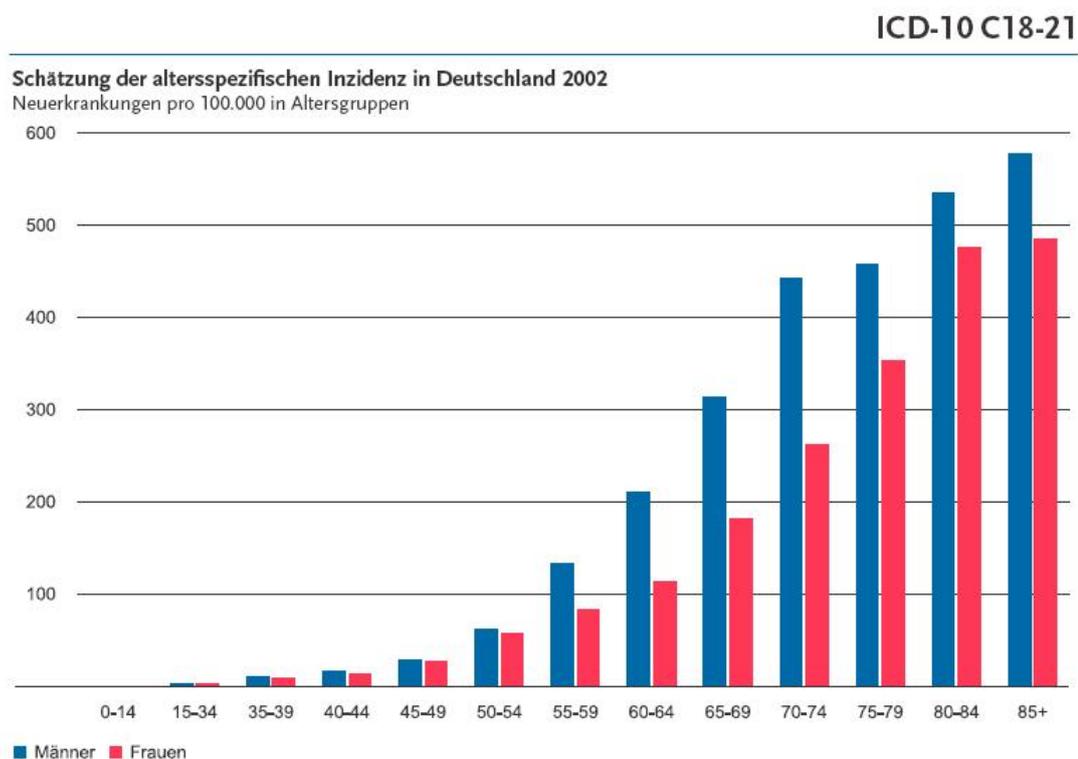


Abbildung 2.4: Schätzung der altersspezifischen Inzidenz in Deutschland 2002 für Darmkrebs [10]

International variieren die Neuerkrankungsraten erheblich. Hochentwickelte Industrienationen wie Nordamerika, Australien, Neuseeland und Westeuropa zeigen erheblich höhere Inzidenzraten als Afrika, Asien und Lateinamerika [77] [3] [13]. Durchschnittlich nimmt das kolorektale Karzinom weltweit etwa 9%, in der westlichen Welt 13% aller Karzinome ein [1]. Für einen nicht familiär vorbelasteten Menschen beträgt das Risiko, sein Leben infolge eines solchen Tumors zu verlieren, etwa 2,5-3% [97].

Betrachtet man die Krebstodesursachen, so nimmt Darmkrebs sowohl für Frauen als auch für Männer die zweithäufigste Stelle ein. Insgesamt sterben, laut dem statistischen Bundesamt, in der Bundesrepublik Deutschland jährlich etwa 30.000 Menschen an einem kolorektalen Karzinom [84] [10]. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt in Deutschland nach Schätzungen des statistischen Bundesamtes für Männer und Frauen inzwischen 56% [10]. Umgekehrt heißt das, dass auch heute noch mehr als 40% aller daran Erkrankten letztlich an ihrem Tumor sterben, was auch durch Abb. 2.2 verdeutlicht

wird. Es besteht eine negative lineare Korrelation zwischen der Prognose des Erkrankungsstadiums und dem Zeitpunkt der Diagnose [67].

Epidemiologie des Magenkarzinoms

Die geschätzte Zahl der jährlichen Neuerkrankungen beträgt, nach Angaben des statistischen Bundesamtes, in Deutschland insgesamt circa 19.400, davon sind etwas mehr als 11.200 Männer. Magenkrebs ist die fünfthäufigste Krebserkrankung bei Männern, bei Frauen die sechsthäufigste [10], was durch Abb. 2.1 verdeutlicht wird. Trotz rückläufiger Neuerkrankungsraten gehört Magenkrebs immer noch zu den häufigsten tumorbedingten Todesursachen. Wie aus dem Diagramm der Todesursachen, vgl. Abb. 2.2, hervorgeht, ist Magenkrebs bei Frauen die sechst- und bei Männern die vierthäufigste Krebs-Todesursache. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei etwa 70, für Frauen bei etwas mehr als 75 Jahren [10]. Im EU-Vergleich liegen die Inzidenzraten für Magenkrebs bei beiden Geschlechtern unter den ersten zehn. Nach der gängigen Lehrmeinung zählen zu den Risiken der Magenkrebsentstehung der Mangel an frischem Obst und Gemüse, stark gesalzene, gepökelte oder geräucherte Speisen, Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum, chronische Magengeschwüre, *Helicobacter pylori* sowie perniziöse Anämie, Morbus Ménétrier und weitere seltene Vorerkrankungen [10].

Infolge der *Helicobacter pylori* Eradikation ist in den letzten Jahren die Zahl der Magengeschwüre und der oft daraus resultierenden Magenkrebserkrankungen deutlich zurückgegangen, was auch aus der Grafik der altersstandardisierten Inzidenz und Mortalität des Magenkrebses in Deutschland, vgl. Abb. 2.5, ersichtlich ist.

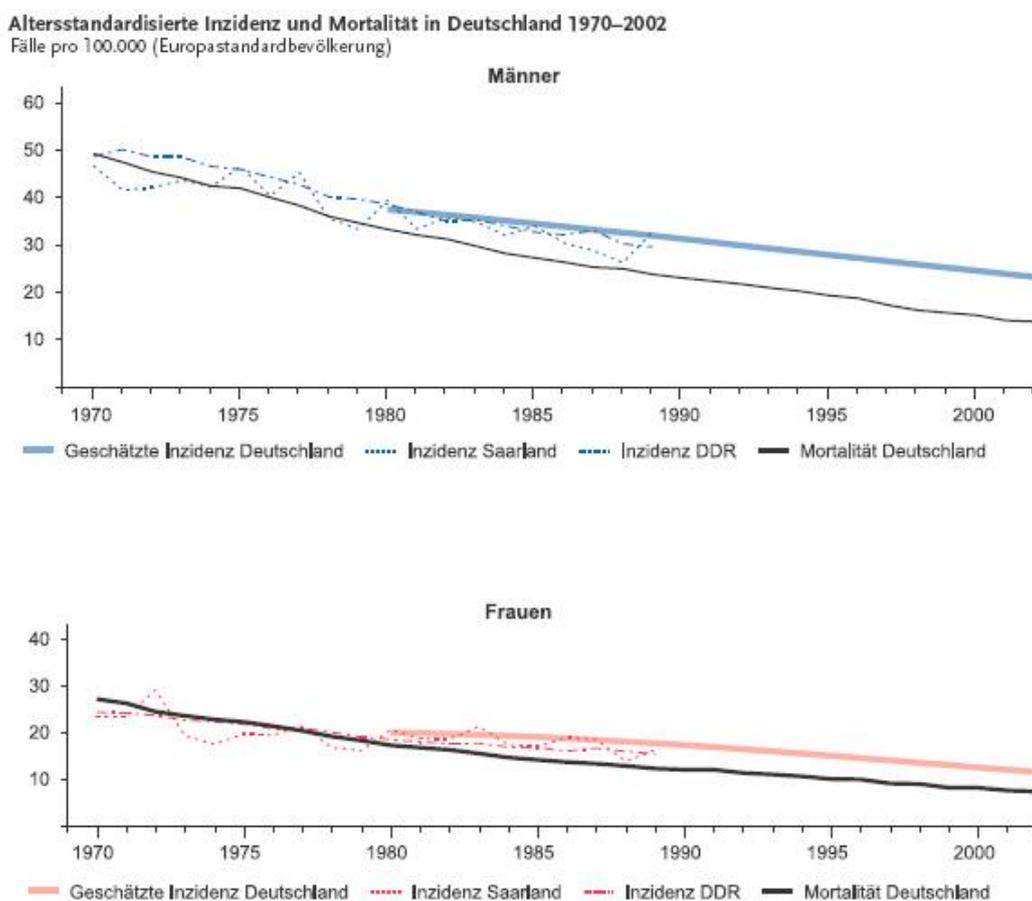


Abbildung 2.5: Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität für Magenkrebs in Deutschland 1970 bis 2002 [10]

Epidemiologie des Nierenkarzinoms

Nach Angaben des statistischen Bundesamtes erkrankten jährlich etwa 6.400 Frauen und etwa 10.300 Männer an Krebs der Nieren, des Nierenbeckens und des Harnleiters. Damit liegt die Inzidenz des Nierenkrebs' auf Platz 6 bei den Männern und auf Platz 11 bei den Frauen [10], (Abb. 2.1). Ähnliches lässt sich auch über die Verteilung der Todesursachen (Abb. 2.2) sagen.

Das mittlere Erkrankungsalter liegt dabei für Männer bei ca. 65, für Frauen bei etwa 70 Jahren. Die für Deutschland geschätzten Erkrankungsraten für Männer und Frauen liegen im EU-Vergleich auf Platz drei. Bei bösartigen Neubildungen der Niere im Erwachsenenalter handelt es sich zu 85% um Nierenzellkarzinome (Hypernephrome). Die Nephroblastome (Wilms-Tumoren),

Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität in Deutschland 1970–2002
Fälle pro 100.000 (Europastandardbevölkerung)

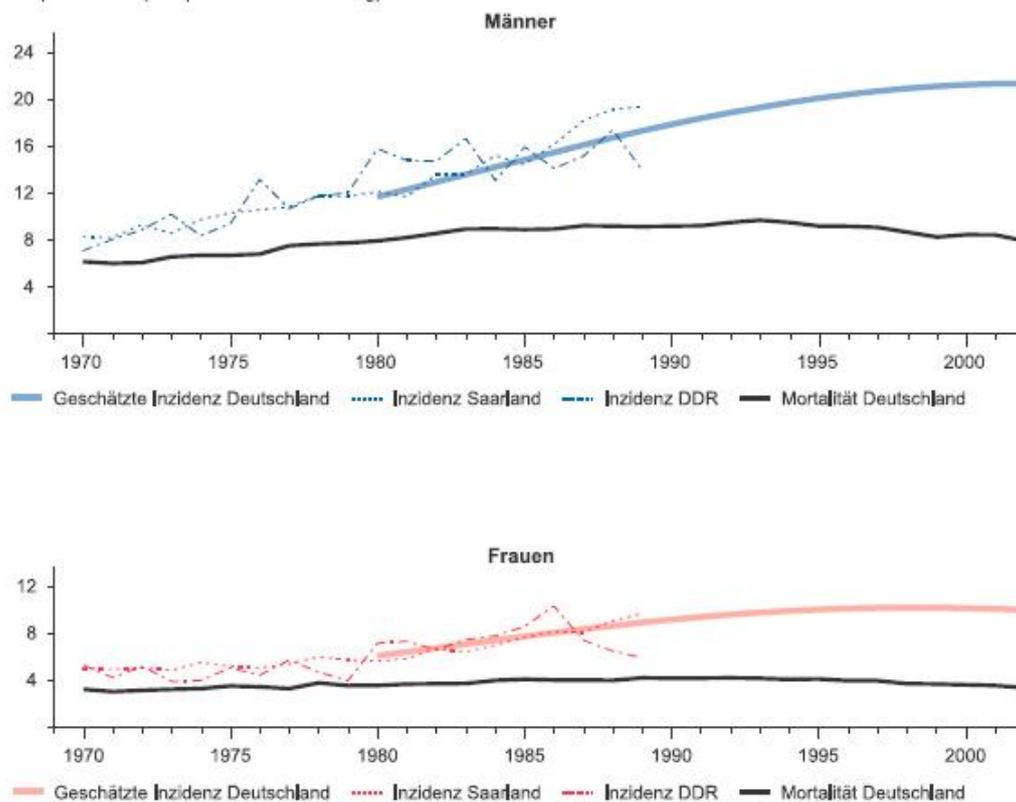


Abbildung 2.6: Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität für Nierenkrebs in Deutschland 1970 bis 2002 [10]

Aus der Grafik der altersstandardisierten Inzidenz und Mortalität des Nierenkrebs' in Deutschland lässt sich klar ablesen, dass die Inzidenz in den letzten 30 Jahren besonders bei Männern zunahm und auch weiterhin zunimmt.

Sarkome oder Lymphome der Niere im Erwachsenenalter sind selten. Zwar sind familiäre Dispositionen, wie von Hippel-Lindau Syndrom, bekannt, jedoch treten die meisten Fälle von Nierenkrebs sporadisch auf. Zu den Risiken für die Nierenkrebsentstehung zählen Adipositas, Rauchen sowie Passivrauchen, die unkontrollierte Einnahme vor allem von phenacetinhaltigen Schmerzmitteln, Exposition gegenüber nierenschädigenden Substanzen (z. B. Halogenkohlenwasserstoffe, Cadmium u.a.) und chronische Niereninsuffizienz [10].

2.2 Definition des kolorektalen Karzinoms

Es gibt anatomisch keine scharfe Grenze am Übergang vom Rectum zum Colon Sigmoidum. Die recto-colonale Grenze kann nicht an der Höhe der peritonealen Umschlagfalte definiert werden, da diese individuell variiert. Also gelten definitionsgemäß die Tumore als Colonkarzinome, deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop mehr als 16 cm von der linea dentata entfernt ist. Entsprechend sind die Rectumkarzinome weniger als 16 cm von der lines dentata entfernt [29]. Aus dieser Definition wird deutlich, dass die Trennung zwischen Colon- und Rectumkazinomen willkürlicher Natur ist. Daher wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit Gewebeproben von Patienten sowohl mit Colon- als auch mit Rectumkarzinomen untersucht.

2.3 Ätiologie und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms

2.3.1 Exogene Risikofaktoren

Nach Angaben des statistischen Bundesamtes sind Verwandte ersten Grades von Patienten mit Darmkrebs selber überdurchschnittlich häufig betroffen, ob auf Grund von Genveränderungen oder einem gemeinsamen Lebensstil, ist bisher nicht abschließend geklärt [10]. Eine Vielzahl von Autoren [85] [31] [45] zeigt einen wesentlichen Einfluss von Umweltfaktoren für die Genese des kolorektalen Karzinoms auf. Außerdem lassen sich für nur etwa 25% aller Patienten mit kolorektalem Karzinom definierte Risikofaktoren eruieren. So spielen neben dem Alter langjähriger Nikotinabusus, körperliche Bewegung [101], das Körpergewicht sowie Ernährungsfaktoren eine Rolle.

Ernährung

Neben hereditären Faktoren und einer individuellen Empfänglichkeit wird den Ernährungsgewohnheiten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der kolorektalen Karzinome zugeschrieben [44]. Die in den westlichen Industriestaaten gefundenen höheren Erkrankungszahlen sind vermutlich durch ernährungsbedingte Risikofaktoren zu erklären. Ein hoher Fettanteil in der Nahrung sowie regelmäßiger Alkoholkonsum werden immer wieder als ein Risikofaktor der Kolonkarzinomentstehung diskutiert [17]. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren des Fischöls reduzieren hierbei scheinbar das Risiko der Entstehung eines Kolonkarzinoms in Ratten [87] und auch beim Menschen

[53]. Eine kalorienreiche sowie ballaststoffarme Kost mit hohen Anteilen an tierischen Proteinen, insbesondere aus rotem (eisenhaltigem) Fleisch, scheint die Karzinomentstehung zu begünstigen [33] [43] [107] [119]. Der Verzehr einer faserreichen Kost aus ballaststoffreichen Gemüse- und Obstsorten scheint einen protektiven Effekt zu haben [26].

Vitamine

Die regelmäßige Einnahme von Folsäure, Vitaminen (A, C, E) und Mineralstoffen (Selen) mit antioxidativer Wirkung scheint einen schützenden Effekt gegenüber Darmkrebs aufzuweisen [34] [99]. Dieser ist jedoch ebenso wie die protektive Wirkung von Calcium und Vitamin D umstritten und wird gegenwärtig noch kontrovers diskutiert [9] [35].

Migrationsstudien

Migrationsstudien konnten zeigen, dass das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, nicht ausschließlich genetisch bedingt ist, sondern durch exogene Faktoren wesentlich bestimmt wird. Das Neuerkrankungsrisiko kolorektaler Karzinome bei Immigranten nach 20 Jahren Aufenthalt in den USA erreicht das Niveau der dort geborenen weißen Bevölkerung [30] [60] [83]. Diese Beobachtung stützt die Annahme, dass fettreiche und ballaststoffarme Ernährung sowie der bewegungsarme Lebensstil Ursachen für die ungleiche geographische Verteilung der Inzidenzraten mit dem Schwerpunkt in der westlichen Welt sind [33].

Adipositas

Übergewicht und eine geringe körperliche Aktivität erhöhen das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken [90]. Besonders förderlich für die Entwicklung von kolorektalen Karzinomen ist weniger der erhöhte BMI, sondern vor allem die Adipositas vom androgenen Typ mit einem erhöhten Taillen-Hüftumfang-Quotienten [90] [100] sowie sitzende Tätigkeiten [44].

2.3.2 Endogene Risikofaktoren

Verschiedene Autoren gehen davon aus, dass etwa 10% der kolorektalen Karzinome eine genetische Prädisposition zugrunde liegt, auf deren Boden karzinogene Einflüsse besonders wirksam werden können [106] [113]. Vor allem beim frühzeitigen Auftreten kolorektaler Karzinome, das heißt vor dem 40. Lebensjahr, spielen genetische Prädispositionen eine entscheidende Rolle, was sich zumeist auch in einer erhöhten familiären Belastung widerspiegelt [10].

Adenome

Adenome sind gemäß der Adenom-Karzinom-Sequenz als präkanzeröse Läsionen anzusehen [28]; deshalb zählen einzelne oder multipel auftretende Adenome ohne entsprechende genetische Disposition zu den Risikofaktoren. Das maligne Potential des Adenoms ist abhängig von der Größe, dem Dysplasiegrad und dem Wachstumstyp (tubulär, villös, tubulovillös). So weisen villöse Adenome, die größer als 2 cm sind, die größte Entartungstendenz auf.

FAP und HNPCC

Zu den häufigsten erblichen Prädisposition zählt das familiäre adenomatöse Polypose Syndrom (FAP) und das erbliche nichtpolypöse kolorektale Karzinomsyndrom (HNPCC) oder Lynch-Syndrom. Beiden hereditären kolorektalen Karzinomsyndromen liegt ein autosomal dominanter Erbgang zugrunde. In den betroffenen Familien treten mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit bereits im jungen Lebensalter Darmkrebsfälle auf. Zwar gibt es Autoren, die das HNPCC für ca. 2-7% aller kolorektalen Karzinome verantwortlich machen [70], jedoch sind die beiden häufigsten Syndrome unter dem Patientenkollektiv trotzdem sehr seltenen.

Weitere Syndrome

Beispiele für noch weitaus seltenere genetische Prädispositionen sind das Gardner-, Turcot- und Peutz-Jeghers-Syndrom sowie die familiäre juvenile Polyposis.

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Studien belegen, dass in geringerem Maße die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, wie beispielsweise Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, zu den endogenen Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms zählen [40] [10].

2.3.3 Resumé der Risiken

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der größte Teil der Krebsfälle auf Exposition gegenüber exogenen Risikofaktoren zurückgeführt werden kann, zu denen insbesondere die Ernährungsgewohnheiten sowie Tabak- und Alkoholkonsum gehören, aber auch berufliche Expositionen und die generelle Belastung der Bevölkerung durch Luftschadstoffe. Für die Mehrzahl der sporadischen Fälle wird von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen, die in

der Regel von einer Kombination aus genetischen Ursachen und verschiedenen exogenen Faktoren abhängig zu sein scheint. Die erblichen Prädispositionen, wie FAP sind hingegen eher selten.

2.3.4 Tumorstadieneinteilung

TNM und andere Klassifikationen

Die TNM-Klassifikation ist ein weltweit anerkanntes und verwendetes System zur Beschreibung und Einteilung des Stadiums von Krebserkrankungen. Das Einteilungsprinzip basiert auf dem von Pierre Denoix, einem französischen Chirurg, entwickelten TNM-System [22]. Die systematische Anwendung der Kurzschreibweise ermöglicht einen weltweit einheitlichen Vergleich der Befunde von Krebspatienten und vereinfacht die Kommunikation zwischen nationalen und internationalen Behandlungszentren. Die Einteilung erfolgt nach bestimmten Normen, für die hauptsächlich drei Gesichtspunkte maßgebend sind [103]:

T: Tiefeninfiltration des Tumors: beschreibt die Größe und die Ausdehnung des Tumors im Darm.

Tx: Keine Tumorbeurteilung möglich.

T0: Kein Hinweis auf einen Tumor.

Tis: So genanntes Carcinoma in situ: Sehr frühe Form von Krebs; Krebszellen sind hier nur in den oberen Schichten der Darmschleimhaut zu finden und sind (noch) nicht invasiv.

T1: Tumor wächst innerhalb der Darmwand bis in das unter der Schleimhaut (Mukosa) liegende Gewebe.

T2: Tumor wächst zusätzlich zur Schleimhaut bis in die Muskulatur (Muskularis) der Darmwand hinein.

T3: Der Tumor infiltriert alle Schichten der Darmwand.

T4: Tumor ist vom Darm auf benachbarte Organe oder das Bauchfell übergegangen.

N: Beteiligung der Lymphknoten (lateinisch “nodus“ = Knoten): beschreibt angrenzende Lymphknoten, die von Absiedlungen des Tumors befallen sind.

Nx: Lymphknoten können nicht beurteilt werden.

N0: Die benachbarten (regionären) Lymphknoten sind frei von Tumorzellen.

N1: Ein bis drei der benachbarten Lymphknoten sind von Krebszellen befallen.

N2: Vier oder mehr Lymphknoten der näheren Umgebung des Tumors sind von Krebszellen befallen.

M: Vorhandensein von Metastasen: beschreibt das Fehlen oder das Vorhandensein der Tochtergeschwulste in anderen Organen.

Mx: Metastasen können nicht beurteilt werden.

M0: Keine Organmetastasen vorhanden. Hier sind die Fernmetastasen gemeint, also Metastasen in anderen, entfernten Organen.

M1: Fernmetastasen in anderen Organen (z. B. Leber) oder entfernten Lymphknoten vorhanden.

Wie stark die Diagnose methodisch abgesichert ist, wird hinter jedem einzelnen Merkmal mit dem Buchstaben "C" (engl. certainty: Sicherheit) in dem Bereich 1 bis 5 (5 bedeutet "mit größter denkbarer Sicherheit") angegeben, z. B. TC2, NC0, MC0.

Einige weitere Kürzel vervollständigen die TNM-Klassifikation [103]:

c: Vor der Operation beruht die TNM-Klassifikation auf den Ergebnissen der durchgeführten Untersuchungen (engl.: clinical), z. B. cT2, N1, M0.

p: Wenn das Tumorgewebe nach der Operation mikroskopisch untersucht wurde, wird dieser pathohistologische Befund mit einem "p" angegeben, z. B. pT2, pN1, pM0.

m: Wurden mehrere, von einander unabhängige Tumore (keine Metastasen) gleichzeitig gefunden, findet das mit einem "m" (multiple) Berücksichtigung, z. B. T1(m), N0, M0.

r: Handelt es sich um einen Tumorrückfall, ein so genanntes Rezidiv, wird dies mit dem "r" ausgedrückt, z. B. rT3, N1, M0.

Speziell für den Darmkrebs besteht über die Einteilung nach dem TNM-System hinaus eine Unterteilung in 5 Stadien, die sich jedoch am TNM-System orientiert. Diese Stadieneinteilung stammt von der "Union Internationale Contre le Cancer" (UICC, Internationale Union gegen Krebs, 1997). Die UICC-Klassifikation ist heute die gebräuchlichste, modernste und klarste Einteilung der kolorektalen Karzinome. Die mittlerweile veraltete Dukes-Klassifikation wurde ursprünglich 1932 entwickelt und ist seither häufig verändert worden, wird jedoch manchmal heute noch benutzt. Die Dukes-Klassen

A bis D entsprechen den UICC-Stadien I bis IV. Die Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die gängigen Tumor-Klassifikationen [103].

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Tumor-Gewebeproben von Patienten mit kolorektalen Karzinomen hatten alle mindestens das Stadium T3 in der TNM-Klassifikation erreicht.

	UICC	Dukes	T	N	M
Stadium	0		Tis	N0	M0
Stadium	I	A	T1, T2	N0	M0
Stadium	II	B	T3, T4	N0	M0
Stadium	III	C	jedes T	N1, N2	M0
Stadium	IV	(D)	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 2.1: Tumorstadieneinteilung nach verschiedenen Klassifikationen

Grading

Bei der histologischen Untersuchung des Tumorgewebes wird dessen Differenzierungsgrad festgestellt. Undifferenzierte Tumorzellen zeigen eine hohe, gut differenzierte eine geringe Malignität. Diese Tumorcharakterisierung bezeichnet man als "Grading". Das Grading gibt Hinweise auf die Aggressivität des Tumors. Es werden vier Stufen, G1 bis G4, der so genannten Malignitätsgrade unterschieden [103].

G1: Niedriger Malignitätsgrad: Die Tumorzellen sind gut differenziert.

G2: Mittlerer Malignitätsgrad: Die Krebszellen sind mäßig differenziert.

G3: Hoher Malignitätsgrad: Die Krebszellen sind schlecht differenziert.

G4: Sehr hoher Malignitätsgrad: Die Krebszellen sind völlig undifferenziert und ähneln den Schleimhautdrüsenzellen überhaupt nicht.

Residualtumor-Klassifikation

Die Resttumor/Residualtumor-Klassifikation beschreibt und beurteilt das Operationsergebnis. Es wird das Vorhandensein von Resttumoren im Darm dokumentiert. Insbesondere werden dabei histologisch die Operationsränder betrachtet, um festzustellen, dass der Tumor "im Gesunden" herausgeschnitten worden ist. "R" steht dabei für einen verbliebenen Resttumor (Residualtumor) [103].

R0: Vollständige Entfernung im Gesunden (R0-Resektion), kein Resttumor vorhanden

R1: Resttumor vorhanden, der nur unter dem Mikroskop erkennbar ist.

R2: Resttumor vorhanden, der auch mit bloßem Auge erkennbar ist.

2.4 Molekularbiologische Grundlagen der Kanzerogenese

2.4.1 Tumorentstehung aus molekularbiologischer Sicht

Ein homöostatisches Gleichgewicht von Wachstum (Proliferation), Differenzierung (zellulärer Spezialisierung) und Zelltod (Apoptose und Nekrose) ist notwendig für die Aufrechterhaltung der Integrität von zellulären Verbänden, Organen und, damit verbunden, der Existenz aller mehrzelligen Organismen. Dieser Homöostase liegen genau definierte genetische Programme zugrunde, die den Zellzyklus und das Wachstumsverhalten der Zellen steuern [109]. Vergleicht man verschiedene Zellen oder Zellpopulationen miteinander, ist ein unterschiedliches Muster von an- bzw. abgeschalteten Genen als Antwort auf die unterschiedlichen Anforderungen im Organismus zu erwarten. Eine fehlregulierte Genaktivität kann aufgrund von Veränderungen der Signaltransduktion ein unkontrolliertes Zellwachstum zur Folge haben [109]. Die betroffene Zelle gerät letztendlich außer Kontrolle, sie ignoriert den Wachstumstakt ihres Zellverbandes, teilt sich häufiger und alle von ihr abstammenden Zellen vermehren sich unkontrollierbar. Es entsteht ein Krebstumor.

Durch biomedizinische Forschung wurde in den letzten 30 Jahren bestätigt, dass die letztendliche Ursache der Tumorentstehung auf DNA-Ebene zu suchen sind [117]. DNA-Schäden (wie DNA-Addukte, Strangbrüche u. a.) können Vorläufer für Mutationen sein, da es im Zuge der Replikation hier zu Basensubstitutionen, Deletionen oder Insertionen kommen kann. Eine Wachstumsstimulation wird möglich, wenn Gene, die zelluläre Vorgänge wie Wachstum und Differenzierung steuern, von Mutationen betroffen sind. Grundsätzlich lassen sich diese Gene in zwei Gruppen einteilen: Proto-Onkogene steuern das Wachstum positiv und können durch Mutationen zu Onkogenen werden, die unkontrolliertes Wachstum fördern. Tumorsuppressorgene inhibieren das Wachstum. Durch Mutation können sie diese Eigenschaft verlieren. Darüber hinaus erzeugt der Ausfall von sogenannten Antimutatorgenen eine genetische Instabilität, die ihrerseits ursächlich für die Mutationen bei beiden

Gruppen sein kann.

Darmkrebs zählt zu den am besten erforschten Krebsarten beim Menschen. Man weiß heute, dass ca. 90% der Darmkrebserkrankungen sich aus zunächst gutartigen Darmpolypen entwickeln. Im Falle der Entstehung des kolorektalen Karzinoms nimmt man eine klonale Tumorentstehung an [75]. So ist die derzeitige Lehrmeinung, dass die Krebsentstehung ein mehrstufiger Prozess ist, bei dem sich im Laufe der Zeit Schäden im Erbgut anhäufen [62] (multi hit model). An diesem komplexen Geschehen sind eine Vielzahl endogener und exogener Faktoren beteiligt. Es dauert meist Jahrzehnte, bis sich eine kritische Anzahl der Genveränderungen in einer Zelle angehäuft hat. In dieser Zeit führt die klonale Zellexpansion zu einem Wachstumsvorteil mit der phänotypischen/histopathologischen Formierung eines zunächst gutartigen Adenoms aus leicht veränderten Schleimhautzellen der Darmwand. Mehr als 95% aller Dysplasien im Kolon und Rektum treten in Adenomen auf, die daher auch als "focus of dysplasia" bezeichnet werden und für die Karzinogenese von entscheidender Bedeutung sind [27]. Ist eine kritische Zahl an Mutationen erreicht, kann das bisher noch kontrollierte Wachstum in ein malignes, zerstörerisches Wachstum mit Ausbildung eines kolorektalen Karzinoms übergehen. Diese Entwicklung von gesunder Darmschleimhaut zum Darmpolypen und schließlich zum bösartigen Darmkrebs wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet (siehe Abb. 2.7). Als ihr Erstbeschreiber gilt der amerikanische Arzt Bert Vogelstein [113]. Da der Ablauf der Adenom-Karzinom-Sequenz Zeit braucht, sind die meisten Darmkrebs-Patienten mit einem sogenannten sporadischen Karzinom zum Zeitpunkt der Diagnose bereits älter als 50 Jahre. In seltenen Fällen können genetische Defekte angeboren sein. Dann kann die Karzinom-Entstehung deutlich weniger Zeit in Anspruch nehmen [47]. Heute schätzt man, dass sich bei einem genetisch-familiär unbelasteten Patienten aus einem kleinen Darmpolyp innerhalb von fünf bis zehn Jahren ein Darmkrebs entwickeln kann.

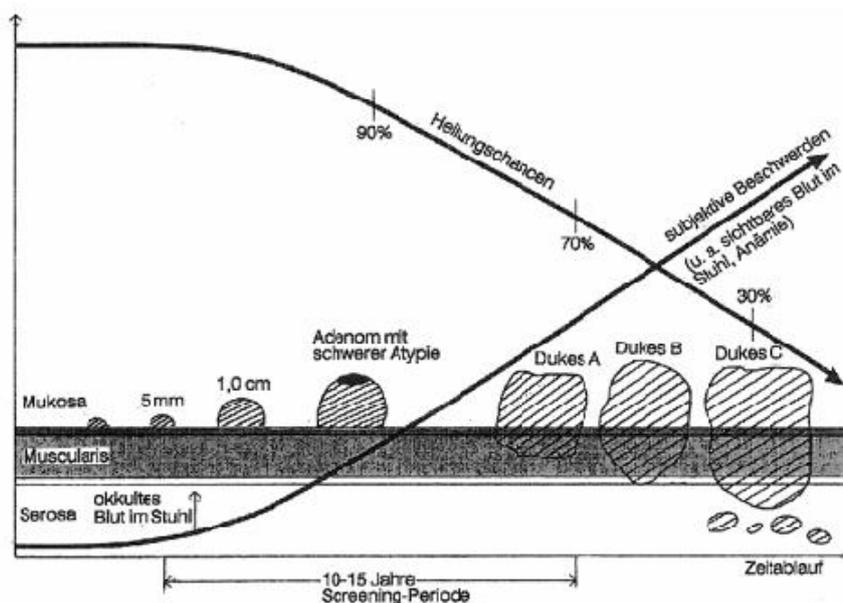


Abbildung 2.7: Zeitliche Entwicklung von einem Adenom zum Karzinom

Onkogene bewirken bereits ein Tumorwachstum, wenn nur eines der beiden Allele mutiert ist, es handelt sich daher um einen dominanten Wirkungsmechanismus. Zum Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen kommt es erst durch die Mutation bzw. den Verlust beider Allele, deshalb wird hier von einem rezessiven Wirkungsmechanismus gesprochen. Die für die Genese des Kolonkarzinoms wichtigsten Tumorsuppressorgene sind das p53-Gen, das DCC-Gen (deleted in kolorektal cancer), das MCC-Gen (mutated in kolorektal cancer) und das APC-Gen [114]. Ein typisches Protoonkogen ist RAS.

2.4.2 Mikrosatelliten-Instabilität

Bei Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) kommt es zu Längenveränderungen innerhalb kurzer, repetitiver DNA-Sequenzen. Normalerweise entdecken und korrigieren Reparaturproteine den Einbau von falschen Basen in neu hergestellten DNA-Strängen bei der DNA-Replikation. Die “slipped strand mispairings“, die häufig in Mikrosatelliten auftreten, werden normalerweise von der DNA-Mismatch-Reparatur behoben. Fehlt diese, kommt es zu Punktmutationen und Längenänderungen in repetitiven Sequenzen. Man kann durch Vergleich von DNA-Sequenzen (Mikrosatellitenmarkern) aus einem Tumor und anderer DNA des gleichen Organismus Mikrosatelliten-Instabilität nachweisen. Dabei bestehen Differenzen zwischen Normal- und Tumorgewebe.

Die hierfür verwendeten Mikrosatellitenmarker sind BAT25, BAT26, D5S346, D7S520 und D2S123 [38]. Der MSI-Phänotyp lässt sich durch eine immunhistochemische Expressionsanalyse der mismatch-repair-Proteine hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1 und hPMS2 sowie direkt durch eine Mikrosatellitenanalyse mittels PCR nachweisen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Tumorproben ausgewählt, bei denen die MSI-Diagnostik zuvor durchgeführt worden ist, um einen Vergleich beider Tumortypen (MSI positiv bzw. MSI negativ) zu ermöglichen.

2.4.3 Bedeutung der Proteinkinase B

Funktion der Proteinkinasen

Die Entwicklung und das Leben multizellulärer Lebewesen wird durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Proliferations- und Differenzierungsvorgänge ermöglicht. Im Zellverband antworten einzelne Zellen spezifisch auf extrazelluläre Signale, die die Genexpression zu regulieren. Zwischen dem extrazellulären Signal, dem Liganden und der Genexpression liegt eine Signaltransduktionskaskade. Beispiele für Liganden sind Hormone, Wachstumsfaktoren oder Zytokine. Diese binden an ligandenspezifische membrangebundene Rezeptoren, die Effektorsysteme, wie Adenylatcyclasen oder Phospholipasen und aktivieren sie [76] [105]. Diese Effektoren regulieren selbst oder über weitere Zielproteine die Genexpression auf der Transkriptions- wie auf der Translationsebene.

Proteinphosphorylierung ist ein wichtiges Ereignis bei Signaltransduktionsprozessen. An Schlüsselstellen in Enzymkaskaden befinden sich proteinphosphorylierende Enzyme, sogenannte Kinasen, die die Aktivität und Funktionalität der Zielproteine, die sie phosphorylieren, steuern können. Diese Steuerung wird u.a. durch die Entfernung der übertragenen Phosphatgruppen wieder abgeschwächt, so dass auch Phosphatasen für die Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen. Kinasen können rezeptorvermittelt, über Second-Messengers als auch über andere Kinasen angesprochen werden.

Die Proteinkinasen umfassen eine große, heterogene Familie (siehe Abb. 2.8), die eine wichtige Rolle in der Kontrolle zellulärer Prozesse spielt. Ihre Fehlfunktion kann die Tumorentwicklung begünstigen [12].

PKB/AKT-Struktur und Verwandtschaft

Die Proteinkinase B (PKB/AKT) ist eine Serin-/Threoninkinase mit einem Molekulargewicht von 57 kDa. Von der PKB/AKT sind drei verschiedene Isoformen bekannt (siehe Abb. 2.8) [20].

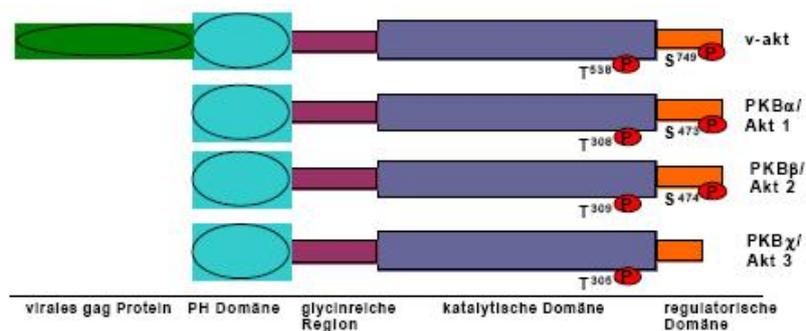


Abbildung 2.8: Schematische Repräsentation von PKB/AKT [20].

PKB zeigt Ähnlichkeiten zu den Kinasen PKA und PKC. Sie ist das zelluläre Homolog eines retroviralen Gens, das aus Tumorgewebe isoliert wurde und die Bezeichnung AKT8 oder v-AKT erhielt. Die Abbildung zeigt dieses virale Onkogen v-AKT, darunter sind die natürlicherweise vorkommenden Isoformen der PKB/AKT angeordnet.

Das Gen für AKT2/PKB β liegt auf der Chromosomenregion 19q13.1-q13.2. Die höchsten Spiegel an PKB/AKT α und β finden sich im Gehirn, Thymus, Herz und Lunge. Die PKB/AKT-Isoform γ ist insgesamt selektiver exprimiert [20].

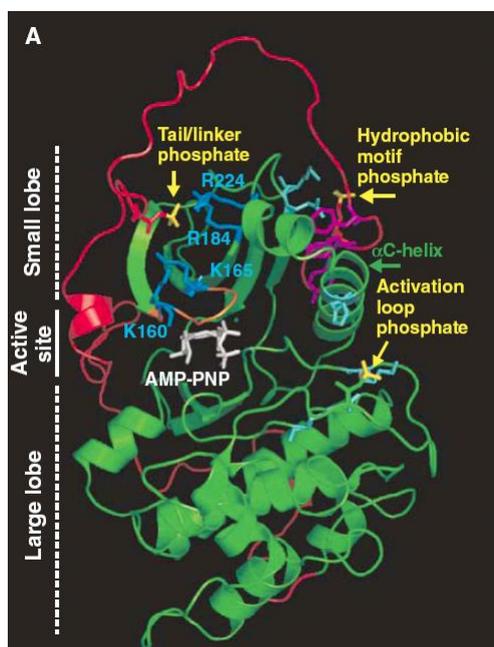


Abbildung 2.9: Dreidimensionale Struktur von AKT2/PKB β [37]

Die Kinase-Domäne ist grün, die regulatorische Domäne rot, die Phosphatgruppen sind gelb dargestellt. Lysin- und Arginin-Seitenketten, die am Phospho-T451 binden, sind blau, andere Phosphatbindungsstellen sind violett dargestellt. HM, glycinreiche Schlinge und ATP-Analog sind jeweils hellblau, orange und weiß eingefärbt.

Phosphatidylinositol-3-OH-Kinasekaskade

Wachstumsfaktoren binden an Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI(3)K). PI(3)K ist eine membranständige Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK), die aufgrund ihrer Eigenschaft, das Lipid PIP₂ zu phosphorylieren, zu den Lipidkinasen gehört [52]. Die Wachstumsfaktoren aktivieren die regulatorische Untereinheit p85 der PI(3)K, die an die katalytische Untereinheit PIK3CA bindet (Abb. 2.10), woraufhin Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) produziert wird (Abb. 2.12).

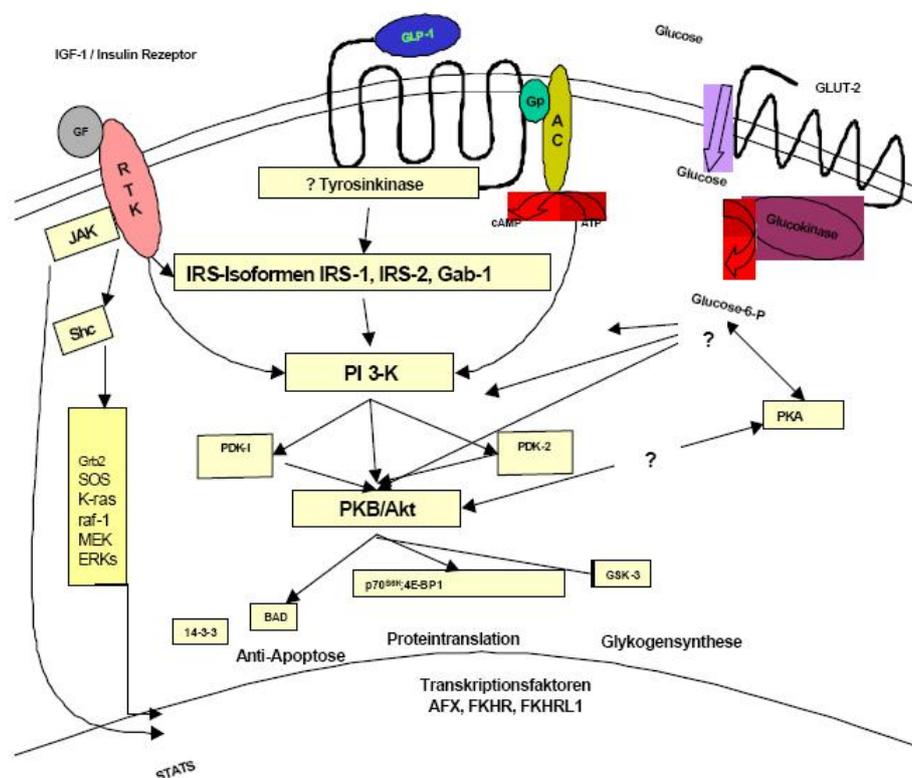


Abbildung 2.10: Intrazelluläre Signaltransduktion des PI(3)K-Wegs am Beispiel der Insel-1 Zellen [50]

Dargestellt sind die Signalwege des Insulinrezeptors, des IGF-1-Rezeptors und des GLP-1-Rezeptors in β -Zellen, die zur Aktivierung der PKB/AKT führen. Pfeile zeigen eine Aktivierung an, Balken zeigen hingegen die Hemmung eines Signalweges an und Fragezeichen stehen für unbewiesene Signalwege. Abkürzungen: AC: Adenylat-Cyclase; CaMKK: Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase kinase; ERK: extracellular signal regulated kinase; Gab-1: Grb-2 associated binder-1; GF: Growth factor; Gp: G-Protein; Grb-2: Growth factor receptor bound-2; GSK-3: glycogen-synthase kinase-3; GLP-1: glucagon-like peptide-1; GLUT2: glucose transporter 2; IGF-1, insulin-like growth factor-1; IRS: insulin receptor substrate; JAK: janus kinase; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MEK: MAP/ERK kinase; mTOR: mammalian target of rapamycin; p70S6K: p70 S6-kinase; PDK, phosphoinositide dependent kinase; PI3K phosphatidylinositol 3-kinase; PKA: cAMP-dependent protein kinase; PKB/AKT: protein kinase B/c-AKT; PKC: protein kinase C; RTK: receptor tyrosine kinase; SOS: son of sevenless

Die PI(3)K stimuliert die PKB/AKT entweder direkt, durch die Bindung

phosphorylierter Phosphatidylinositole an die PH-Domäne der PKB/AKT, oder, effizienter, über die zwischengeschaltete Aktivierung der sogenannten PKB/AKT-Kinasen PDK-1 und PDK-2 [20] [57]. Eine Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste der PKB/AKT führt zu einer Aufhebung der intermolekularen Hemmung und zur Aktivität der Kinase (siehe Abb.2.11).

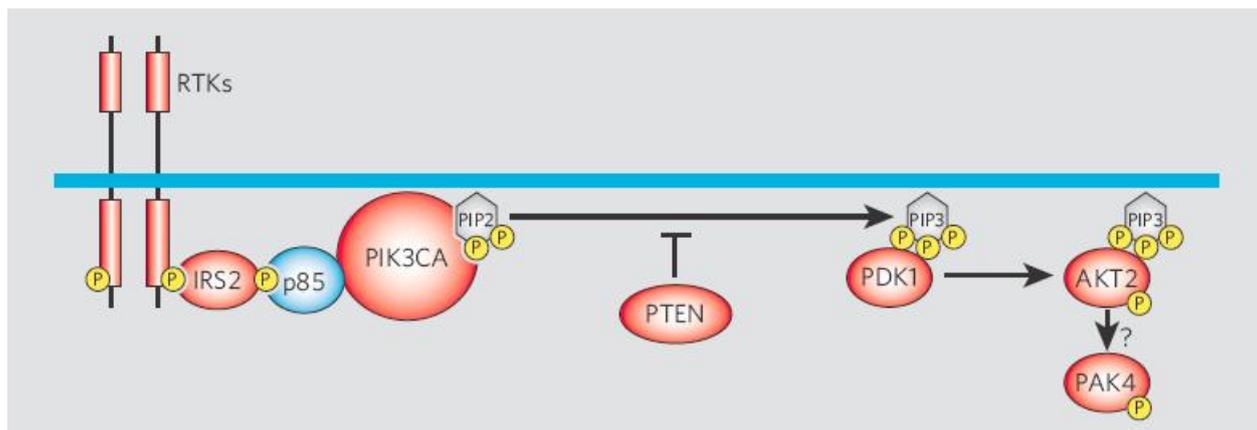


Abbildung 2.11: Die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI(3)K) Signalkaskade [78]

Am Anfang der Kaskade rekrutiert die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK) das IRS-Adaptorprotein, was die Ansammlung des passenden p85/PIK3CA-Komplexes induziert. Das PIK3CA-Enzym seinerseits phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃) (siehe Abb. 2.12). Das Enzym PTEN kehrt diesen Prozess normalerweise unter passenden Umständen um. PDK1 wird dann durch PIP₃ zur Zelloberfläche rekrutiert und phosphoryliert und aktiviert AKT2. Die Aktivierung von PAK4, downstream in der Kaskade, ist PI(3)K-abhängig und erfolgt vermutlich durch AKT2. Die rot markierten Mitglieder der Kaskade waren in kolorektalen Karzinomen genetisch verändert [78]. Die Phosphatgruppen sind gelb gekennzeichnet. Abkürzungen: IRS2: insulin receptor substrat 2, PIK3CA: katalytische Untereinheit p110 α der Phosphoinositide-3-kinase, PTEN: phosphatase-and-tensin homologue, PDK1: phosphoinositide-dependent protein kinase-1, AKT2: v-aktmurine thymoma viral oncogene homologue-2 Kinase, PAK4: p21-activated kinase 4

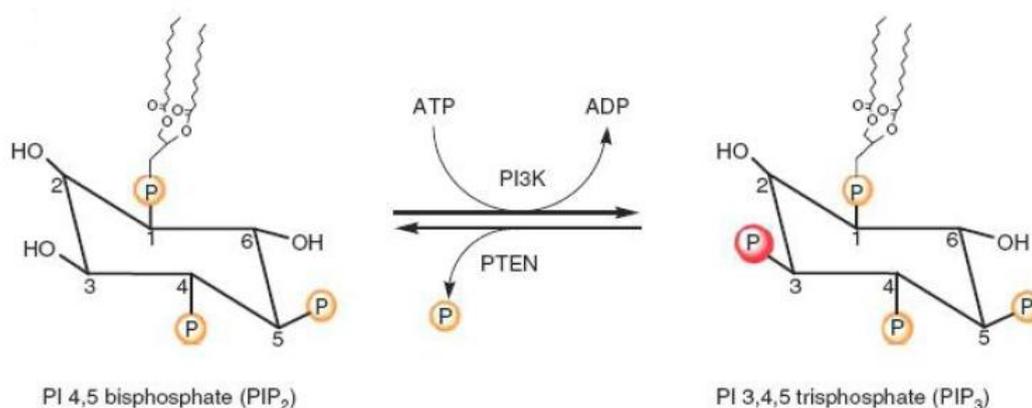


Abbildung 2.12: Umwandlung von PIP₂ in PIP₃ [48]

Die Aktivierung von PI(3)K führt zur Entstehung eines second messengers: aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) wird Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). Das Enzym PTEN katalysiert die Gegenreaktion.

2.5 Fragestellungen der Doktorarbeit

2.5.1 Sequenzanalyse des AKT2/PKB β in Tumorproben

Obwohl genetische Alterationen in Tyrosinkinasen und speziell in der PI(3)K sicher an der Tumorgenese beteiligt sind [16] [49] [115] [98] [61] [66] [79] [94] [95], sind nur wenige Interaktionen von Serin-/Threoninkinase (STKs) in menschlichen Krebszellen bekannt [12] [6] [21] [32]. Im Herbst 2005 wurde eine Studie veröffentlicht, in der 340 Serin-/Threoninekinasen von menschlichen kolorektalen Karzinomen auf Mutationen untersucht wurden. Auch in Genen der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinasekaskade wurden Mutationen gefunden. Insgesamt wurden 23 Veränderungen identifiziert, die 8 verschiedene Proteine betrafen [78]. Drei der veränderten Gene, PDK1, AKT2 und PAK4, kodieren Proteine, die in die PI(3)K Signalkaskade involviert sind [111] [118], zwei von ihnen (AKT2 und PAK4) waren in menschlichen Tumoren überexprimiert [12]. Bei einer weiteren Untersuchung zeigten sich Co-Amplifikationen von AKT2 und PAK4 auf dem Chromosom 19q13.2 [116]. Es wurden andere Nicht-STK-Mitglieder der PI(3)K-Signalkaskade untersucht und Mutationen in weiteren Genen gefunden [111]. Die Abbildung 2.11 verdeutlicht, dass fast alle Mitglieder der PI(3)K Signalkaskade in einem der Tumore mutiert waren, diese sind rot dargestellt [78].

Als diese Alterationen verglichen wurden, fiel bei ihrer Verteilung auf, dass alle, außer zwei von 58 Alterationen, in unterschiedlichen Tumoren vorlagen [94] [78]. Das wurde als ein Hinweis darauf gedeutet, dass die veränderten Gene wahrscheinlich gleiche Effekte in der Tumorgenese haben und sich in der selben Kaskade auswirkten. Die Erforschung einer solchen mutationsbedingten Aktivierung vom PI(3)K-Signaltransduktionsweg könnte neue Zielproteine für therapeutische Intervention bereitstellen. Es hatten fast 40% der kolorektalen Tumore Alterationen in Genen der PI(3)K-Kaskade. Von den Autoren wurde postuliert, dass insbesondere die Gene für PDK1 und AKT2 erfolgsversprechende Angriffspunkte für eine wirksame Therapie seien [78].

Die oben beschriebenen Studien zeigen, dass in bis zu 40% der kolorektalen Tumore Mutationen in Genen der PI(3)K-Kaskade vorkommen. Die Proteinkinase PKB β /AKT2 nimmt in ihrer aktivierten Form als Bestandteil des PI(3)K-Signaltransduktionswegs eine zentrale Rolle als antiapoptischer, proliferationsfördernder Signalvermittler ein. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, nach Veränderungen von PKB β /AKT2 in kolorektalen und anderen Karzinomen zu suchen, um so die Bedeutung dieser Mutationen in verschiedenen Tumorentitäten zu erfassen. Dies erfolgt mittels Sequenzanalyse auf Ebene der genomischen DNA und der mRNA. Die Mutationsanalysen der PKB β /AKT2 werden an histologisch gesicherten Gewebeproben von kolorektalen Karzinomen sowie in Proben einer Tumorbank des Instituts für Humangenetik durchgeführt.

2.5.2 Alternative Spleiß-Variante 12a

Das primäre Transkriptionsprodukt (die prä-mRNA) unterliegt im Zellkern verschiedenen Modifikationen, die als RNA-Prozessierung bezeichnet werden [54]. Hierzu ist insbesondere der Spleiß-Vorgang zu rechnen, bei dem die nichtkodierenden Abschnitte (Introns) aus der prä-mRNA herausgeschnitten und die kodierenden Abschnitte (Exons) miteinander verknüpft werden. Durch alternatives Spleißen können aus einer prä-mRNA verschiedene reife mRNA-Moleküle entstehen, die für unterschiedliche Proteine kodieren [39]. Fehler im Spleißen von Genen können, genauso wie Mutationen, für die Entstehung von Krankheiten verantwortlich sein [2] [4].

Im Rahmen von Klonierungsarbeiten wurde in einem Tumorgewebe eine alternative Spleiß-Variante des Gens PKB β /AKT2 entdeckt. In dieser war ein Teil des Introns, das zwischen Exon 12 und Exon 13 liegt, in die mRNA eingespleißt. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher,

die potentielle onkogene Bedeutung dieser alternativen Spleiß-Variante (12a) in Tumoren zu untersuchen. Hierzu sollte die Häufigkeit des Vorkommens dieser Spleiß-Variante in verschiedenen Tumorproben analysiert werden.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Geräte und Einwegmaterialien

Einmalmaterial oder Gerät	Hersteller
Agarose-Gelapparaturen Gibco	BRL, Karlsruhe
Analysenwaagen R 160P-D1	Sartorius, Göttingen
Autoklav	HA-300M3CF, Wolf, Geislingen
Chemikalienwaage	Sartorius, Göttingen
Collection Tubes 2 ml	Sigma, Deisenhofen
Eismaschine	Ziegra GmbH, Isernhagen
Elektrophorese-Transformator, ST 606	Gibco BRL, Karlsruhe
Elektrophorese-Transformator, Power Supply E 835	Consort, Turnhout
Elektrophorese-Kammer, Horizon 11.4	Gibco, Eggenstein
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf, Hamburg
Foto-Apparatur, MP4 Modell 44-16	Polaroid, Cambridge
Gel-Dokumentations-Gerät, Bio RAD universal HOOD II	Bio RAD Laboratories, Sergate, Italy
Gel-Dokumentationssoftware, Quantity one 1D analysis software	Bio RAD Laboratories, USA
Kapillar-Elektrophorese- Sequenziergerät, Abi Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City/Weiterstadt
Kühlzentrifuge Micro 22 R	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Rotanta TRC	Hettich, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Sorvall RC 28 S	DuPont, Dreieich

Tabelle 3.1: Geräte und Einwegmaterialien (Teil 1)

Einmalmaterial oder Gerät	Hersteller
Mikro Amp©optical 96 Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Singapore
Mikrowellenherd, SS 611	Bosch, München
Multi Screen©Column Loader	Millipore Corporation, Molsheim, France
Multi Screen©Assay System Centrifuge Alignment Frame	Millipore Corporation, Molsheim, France
Optical Adhesive Cover	Applied Biosystems, Foster City
PCR-Reaktionsgefäße, Multiply Pro	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen steril (10 µl, 20 µl, 200nµl, 1 ml)	Starlab, Ahrensburg
Pipettenspitzen steril 50µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen unsteril (0,2 ml, 1ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettiergerät Liquid Workstation epMotion©5070	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage Basic MCBB100	Sartorius, Göttingen
Quarzküvetten	Heraeus, Hanau
Real-Time-PCR-Gerät ABI-Prism 7000, sequence detection system	Applied Biosystems, Foster City
Schüttler, Vortex REAX 2000	Heidolph, Kehlheim
SDS Software	Applied Biosystems, Foster City
Sequenzierungssoftware, DNA Sequencing Analysis 3.7	Applied Biosystems, Foster City
Spektralphotometer, UV-DU 800	Beckmann-Coulter, Fullerton
Sterilarbeitsbank, Heraeus HS12	Kendro, Hanau
Sterilfilter Pipetten-Spitzen	Molecular Bio-Products, Ca., USA
Thermocycler 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermocycler 9600	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermocycler 9700	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermomixer Compact 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer Compact 5350	Eppendorf, Hamburg
Rotilab®-Mini Zentrifuge SD 220 VAC	Roth, Karlsruhe
Tischzentrifuge, 5415c / 5402	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge, Spectrafuge Mini C1301	Labnet, Woodbridge
Ultra-Turrax T25	Janke und Kunkel IKA Labortechnik
Zentrifuge, Rotanda 46R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge, 5417C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, 5702	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen	Nalge Company, New York, USA

Tabelle 3.2: Geräte und Einwegmaterialien (Teil 2)

3.2 Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose Broad Range	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Desinfektionsmittel Freka Nol	Fresenius, Bad Homburg
dNTP (10 mM)	Applied Biosystems
Dodecylsulfat, Natriumsalz (SDS)	ICN Biomedicals, Eschwege
Ethanol (absolut)	Riedel de Haen, Hannover
Ethanol (absolut)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid 25 mM	Perkin Elmer/ABI, Weiterstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Nukleotid-Mix dNTPs (250 μ M je dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Roche, Mannheim
PCR Reaction Buffer	Roche, Mannheim
Reinstwasser	Braun, Melsungen
RNase freies Wasser (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
Sephadex G-50 dry bead diamer 20-50 μ l	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Sequenzierer-Polymer Performance optimized Polymer 3100 POP-6©	Applied Biosystems, Foster City
Sodium-dodecyl-sulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Tris-Base	US Biochemical, Cleveland
Wasser steril	Braun, Melsungen

Tabelle 3.3: Allgemeine Chemikalien

3.3 Fertige Reagenzien-Sets

Reagenzien-Set	Hersteller
BigDye Terminator Cycle Kit 1.1	Applied Biosystems, Weiterstadt
DyeEx 2.0. Spin Kit	Qiagen, Hilden
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Applied Science, Mannheim
RNAagents©Total RNA Isolation System	Promega, USA
TaqMan©Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt

Tabelle 3.4: Fertige Reagenzien-Sets

3.4 Reagenzien für molekularbiologische Untersuchungen

3.4.1 Enzyme

Ampli Taq Gold-Polymerase® Perkin Elmer, Weiterstadt

M-MLV Reverse Transkriptase Promega, USA

3.4.2 DNA-Längenstandards

DNA-Längenmarker	Hersteller
Lambda DNA/Eco130I (StyI) Marker Fragmentlängen in Basenpaaren (bp): 421, 925, 1489, 1882, 2690, 3472, 4254, 6223, 7743, 19329	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Längenstandard XIV (100-1500bp) Fragmentlängen in bp: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2642	Roche-Applied-Science, Mannheim

Tabelle 3.5: DNA-Längenstandards

3.4.3 Fluorogene Sonden

fluorogene Sonde	Hersteller
TaqMan©Gene Expressions Assay 12-13	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan©Gene Expressions Assay 12a	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan©Gene Expressions Assay GAPDH	Applied Biosystems, Foster City, USA

Tabelle 3.6: fluorogene Sonden

3.4.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden mittels Primer 3 Programm (www.cgi) ausgewählt und von der Firma Operon, Köln, synthetisiert.

Primer für die genomische DNA

Name des Primers	Sequenz 5' zu 3'	Menge (in pmol)	Länge (in bp)	Molekulargewicht (in U)
AKT2-1F	CCTCCTGCATGTCCTGCT	69801,42	18	5377,54
AKT2-1R	GTAAGACCCTCCGCCTCTG	57737	19	5724,75
AKT2-2F	GTGAGTCACCGTCACACTGG	68024,4	20	6118,02
AKT2-2R	AATGACCAAGTCCCACAAGC	77696,48	20	6063,99
AKT2-3R	GGTCCCAGGGAAAATCTCTC	77584,57	20	6102,02
AKT2-3F	CACCATCTAGCATGGGGCTA	67502,8	20	6157,12
AKT2-4F	TCAGCTGTTCTGACTCTGAGG	72968,51	20	6124,05
AKT2-4R	ATGGAAACCAAGGAGAGCAG	65321,7	20	6233,11
AKT2-5F	TTGGCAACAGTGTCTTTTGG	71061,44	20	6154,11
AKT2-5R	CTCAGGGTCAGGCTCCAG	62591,68	18	5500,6
AKT2-6F	CTGCATTTATGGCTGGGAAT	64576,24	20	6163,11
AKT2-6R	ACCCAAGACTGTGCTTTGT	64711,69	20	6068,02

Tabelle 3.7: Primer für die genomische DNA (Teil 1)

Name des Primers	Sequenz 5' zu 3'	Menge (in pmol)	Länge (in bp)	Molekulargewicht (in U)
AKT2-7F	AGGGTGTGTGTGTGCAGAAT	59774,1	20	6268,17
AKT2-7R	TCTCACCCACAGCTCCTCTC	67591,15	20	5908,87
AKT2-8F	AGGTGTCACCACATCACTGC	70484,05	20	6061,99
AKT2-8R	CCAACCTCCCCAGTGTGAGT	68923,82	20	6052,99
AKT2-9/10F	GGAGGGTTGATGTCCAGGAG	62247,97	20	6278,14
AKT2-9/10R	GACACACTGCGACCCTACAA	71941,56	20	6039,96
AKT2-11/12F	ATACAGGGCCTGCCTGCT	71608,83	18	5475,6
AKT2-11/12R	GCCCTCCTTGAGAAGTGAGTT	57271,63	21	6437,26
AKT2-13F	CGTTTCCCCAGGGAGTCT	61023,13	18	5466,6
AKT2-13R	AAAACCACCCAGCGGTGA	68184,97	18	5486,6

Tabelle 3.8: Primer für die genomische DNA (Teil 2)

Primer für die Reverse Transkription

Name des Primers	Sequenz 5' zu 3'	Menge (in pmol)	Länge (in bp)	Molekulargewicht (in U)
Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTT	20800	16	4787

Tabelle 3.9: Primer für die Reverse Transkription

Primer für die cDNA

Name des Primers	Sequenz 5' zu 3'	Menge (in pmol)	Länge (in bp)	Molekulargewicht (in U)
AKT2-3AF	CCTGAGCTGTCCCGAGCTA	87830,27	19	5764,78
AKT2-3AR	CCGCACCAGGATGACTTT	85044,97	18	5459,6
AKT2-3BF	AAGGCACGGGCTAAAGTGA	72272,94	19	5910,9
AKT2-3BR	GTCATTGTCCTCCAGCACCT	81276,93	20	6003,96
AKT2-3CF	GCAAAGAGGGCATCAGTGAC	63992,11	20	6200,08
AKT2-3CR	CCTCTGCGTGGGCAGACT	90838,87	18	5491,6
AKT2-3B2F	GGCGGTCAGCAAGGCACGGGC	47185,11	21	6522,23
AKT2-3B2R	CAGGCGGCCGCACATCATCTCG	65841,33	22	6681,35

Tabelle 3.10: Primer für die cDNA

Primer für die alternative Spleiß-Variante 12a

Name des Primers	Sequenz 5' zu 3'	Menge (in pmol)	Länge (in bp)	Molekulargewicht (in U)
AKT2splice-12F	ACCCTTCAAACCTCAGGTCA	57909,04	20	6005,96
AKT2splice-13R	CTGGCCGAGTAGGAGAACTG	65224,77	20	6207,08
AKT2splice-12aR	AGGCTGTCATCACCATCTCC	56805,65	20	6012,96

Tabelle 3.11: Primer für die alternative Spleiß-Variante 12a

3.5 Puffer und Lösungen

3.5.1 Probenauftragungspuffer

Substanz	Volumen
Wasser	3,75 ml
Glycerin	5 ml
TAE 40X	250 μ l
SDS 0,5%	1 ml
Bromphenolblau, Xylencyanol	1ml

Tabelle 3.12: Probenauftragungspuffer

3.5.2 Invitrogen-Puffer

300mM Tris Base (3,63g) und 75mM Ammoniumsulfat wurden mit sterilem Wasser auf 70ml aufgefüllt. Mit HCl wurde der pH-Wert der Lösung auf 8,5 eingestellt und auf 90ml aufgefüllt. Dieses Volumen wurde auf 4 Falcon-Tubes verteilt. Mit Hilfe einer 500mM Lösung von Magnesiumchlorid wurden die Puffer hergestellt (siehe Tabelle 3.13). Im Anschluss daran wurden die Puffer sterilfiltriert.

Puffer	$MgCl_2$ Konzentration	$MgCl_2$ 500 mM	PCR-Wasser
A	7,5mM	375 μ l	2130 μ l
B	10mM	500 μ l	2000 μ l
C	12,5mM	625 μ l	1880 μ l
D	17,5mM	875 μ l	1630 μ l

Tabelle 3.13: Invitrogen-Puffer A/B/C/D

3.5.3 M-MLV RT 5X Reaktions-Puffer

Substanz	Menge (Angaben des Herstellers)
Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C)	250mM
KCl	375mM
$MgCl_2$	15mM
DTT	50mM

Tabelle 3.14: M-MLV RT 5X Reaktions-Puffer

3.6 Tumorproben

3.6.1 Tumorproben zur Extraktion der genomischer DNA

Die Proben der genomischen DNA wurden aus der gDNA-Sammlung des gastroenterologischen Forschungslabors der Universitätsklinik des Saarlandes ausgewählt. Es handelte sich um Proben von Patienten, die zwischen 2002 und 2005 in der gastroenterologischen Abteilung der Universitätsklinik des Saarlandes in Behandlung waren. Die DNA wurde aus den bei der Koloskopie entnommenen Gewebeproben mittels des DNA Tissue Kits von Quiagen isoliert. Es wurde bei der Auswahl der Proben darauf geachtet, dass die Patienten ein sowohl klinisch als auch histologisch gesichertes kolorektales Karzinom hatten und bei den Proben die MSI bestimmt wurde. Die Patienten wurden vor den Eingriffen anhand eines Aufklärungsbogens um ihr Einverständnis zur Aufbereitung der Proben gebeten. Die Patienten stimmten einer anonymisierten Auswertung ihrer erhobenen Krankheitsdaten zu.

3.6.2 Tumorproben zur Extraktion der mRNA

Die mRNA wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit aus den Gewebeproben einer Tumorbank des Instituts für Humangenetik, die dem Projekt freundlicherweise von Herrn Professor Welters überlassen wurden, gewonnen. Es handelt sich um Gewebeproben von 40 Patienten, die zwischen 1988 und 1990 an der Universitätsklinik des Saarlandes in Behandlung waren und von Tumoren des Magen-Darm-Traktes sowie der Nieren betroffen waren. Die Tumorproben wurden sowohl endoskopisch als auch operativ gewonnen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Untersuchungen wurden durch das persönliche Einverständnis der Patienten genehmigt.

3.7 Optimierung der gDNA-PCR

Im Vorversuch wurde für jeden Primer der optimale Puffer ermittelt. Abhängig von der Magnesiumchlorid-Konzentration in der Pufferlösung nahmen die Stärke des spezifischen Signals, jedoch auch die Anzahl der unspezifischen Produkte zu. Eine zu niedrige Magnesiumchlorid-Konzentration schränkte die Aktivität der Taq-Polymerase ein. Die Ergebnisse des Vorversuchs werden in der Tabelle 3.15 wiedergegeben.

	A	B	C	D
Exon 1		x	x	
Exon 2			x	
Exon 3			x	
Exon 4	x			
Exon 5			x	
Exon 6				x
Exon 7			x	
Exon 8		x		
Exon 9/10		x		
Exon 11/12				x
Exon 13		x		

Tabelle 3.15: Vorversuch

Das jeweils optimale Verhältnis zwischen Puffer und Primer wurde mit einem x markiert.

3.8 Standard-PCR

3.8.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1986 von Mullis und Saiki entwickelt [71] [92]. Die PCR ist eine schnelle und einfache Methode, um spezifische DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, *in vitro* selektiv aus einem Nukleinsäuregemisch zu vervielfältigen. Die DNA-Synthese wurde durch die hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* ermöglicht und erfolgte im Falle der sogenannten Standard-PCR bei 72°C. Die nach Hybridisierung durch die Oligonukleotid-Primer gebildeten kurzen, doppelsträngigen Bereiche dienen der Polymerase als Initiationsstellen für die Replikation [41]. Heute verwendet man die von *Thermophilus aquaticus*-Polymerase abgeleiteten, kommerziell erhältlichen Polymerasen. Die in dieser Arbeit verwendete kommerzielle Ampli Taq Gold-Polymerase wurde durch eine Vorinkubation von 10-12 min bei 95°C aktiviert [55] [46].

In sich wiederholenden Zyklen der Denaturierung der DNA, der Hybridisierung spezifischer Oligonukleotid-Primer und der Synthese der DNA, wurde der zwischen den Primern liegende Bereich amplifiziert (vgl. Abb. 3.1). Dies führte zur exponentiellen Akkumulation der spezifischen DNA-Fragmente [91].

Die Taq-Polymerase hat eine geringe Fehlerquote. Sie baut in 10 000 Nukleotiden nur ein falsches Nukleotid ein, was eine hohe Spezifität bei großer Ausbeute der Reaktion garantiert.

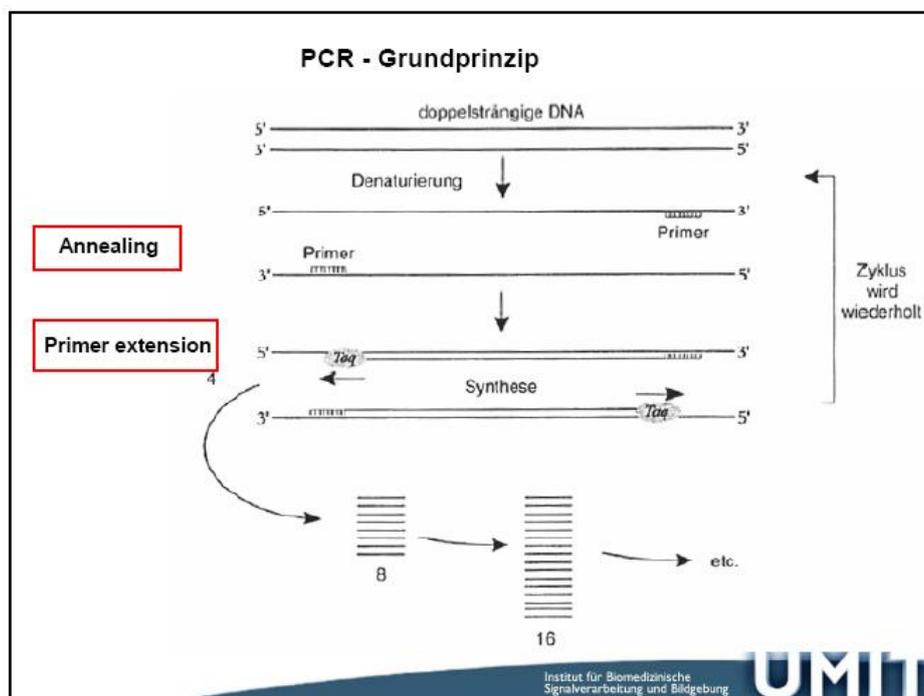


Abbildung 3.1: Prinzip der Polymerasekettenreaktion [74]

Ausgehend von einem kurzen Abschnitt einer bekannten Sequenz (Primer) wird durch das Enzym DNA-Polymerase einer der beiden komplementären DNA-Stränge verlängert.

3.8.2 Ziele der Polymerasekettenreaktion

Verschiedene Einflussgrößen verändern die Qualität des PCR-Produktes. Eine niedrige Magnesiumkonzentration, geringe Mengen an dNTP, hohe Annealing-Temperaturen und kurze Extensionsphasen förderten die Spezifität der PCR. Da die Standard-PCR-Proben weiter für die Gelelektrophorese und Sequenzierung verwendet wurden, war es wichtig, so viele Nebenprodukte wie möglich zu eliminieren. Die unspezifischen PCR-Nebenprodukte führten in der Gelelektrophorese zu weiteren Banden und bei der Sequenzierung zu einer schlechten Auflösung in den Chromatogrammen. Aus diesem Grund wurde beim Auftreten eindeutiger Nebenbanden in der Agarosa-Gelelektrophorese der PCR-Lauf optimiert und erst nach einem adäquaten Ergebnis der Elektrophorese mit der Sequenzierungs-PCR weitergearbeitet.

Bei Proben, die generell schwache Banden in der Elektrophorese boten, wurde die Anzahl der Thermocycler-Zyklen erhöht. Hierbei stieg jedoch auch die Anzahl der amplifizierten Nebenprodukte. Unter Beachtung dieser Kenntnisse wurden alle Exons des AKT2/PKB β -Gens sowie die Abschnitte der cDNA gut amplifizierbar.

3.8.3 Ansatz der Standard-PCR

Zur Kontrolle der Sauberkeit wurde bei jedem neuen PCR-Ansatz zu den DNA-Proben eine Leerprobe, also ohne DNA, mit angesetzt. So konnte sichergestellt werden, dass die verwendeten Reagenzien DNA-verunreinigungsfrei waren. Es hatte sich je nach Probe bewährt, neben den 50 μ l Ansätzen auch 30 μ l Ansätze für die Standard-PCR anzufertigen. Die Proben wurden in Staffeln von je 8 Proben mit einer Leerprobe angesetzt.

Anzahl der Ansätze	9	Einzeln	Mastermix für 9 Proben
Wasser		19,5	175,5
Puffer	A/B/C/D	10	90
Nucleotide Mix	10 μ M (2,5 μ M each)	5	45
Primer Forward 10 μ M		5	45
Primer Revers 10 μ M		5	45
Ampli-Taq-Gold-Polymerase		0,5	4,5
DNA	1:50 oder 1:100	5	aliquotieren auf 45
Gesamtvolumen		50	

Tabelle 3.16: Standard-PCR-Pipettierschema 50 μ l Ansatz (Angaben in μ l)

Anzahl der Ansätze	9	Einzeln	Mastermix
Wasser		4,7	42,3
Puffer	A/B/C/D	6	54
Nucleotide Mix	10 μ M (2,5 μ M each)	3	27
Primer Forward 10 μ M		3	27
Primer Revers 10 μ M		3	27
Taq Polymerase		0,3	2,7
DNA	1:50 oder 1:100	5	aliquotieren auf 20
Gesamtvolumen		30	

Tabelle 3.17: Standard-PCR-Pipettierschema 30 μ l Ansatz (Angaben in μ l)

3.8.4 Standard-PCR-Programm

Nach dem Ansetzen wurden die Ansätze kurz aufzentrifugiert und im Thermocycler für 35 Zyklen belassen. Die Bedingungen der als Standard-PCR bezeichneten Polymerasekettenreaktion gehen aus der Tabelle 3.18 hervor. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem PE 9600, 9700 oder 2400 Cycler durchgeführt. Beim Programmieren des Thermocyclers wurde das jeweilige Probevolumen berücksichtigt.

	Dauer(in min)	Temperatur
Denaturierung zu Beginn	10	95°C
Denaturierung	0,30	95°C
Annealing	0,30	55°C
Extension	1	72°C
Final Extension	10	72°C
Kühle Lagerung	infty	4°C

Tabelle 3.18: Standard-PCR-Programm

3.9 Gelelektrophorese

3.9.1 Prinzip der Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist eine Methode, die die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit verschieden stark geladener Teilchen (hier: Nukleinsäuren) im elektrischen Feld zu deren Trennung verwendet. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von den Eigenschaften des Trägers, der angelegten Spannung, der Ladung des Moleküls und der vorhandenen Reibungskraft. Bei der Gelelektrophorese wird als Träger u. a. ein Agarosegel verwendet, durch dessen Porenstruktur zusätzlich eine Trennung der Nukleinsäuren aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Konformation erfolgt. Die Nukleinsäuren sind dabei als Polysäuren negativ geladen (Polyanionen) und wandern daher zur Anode. Die Gelelektrophoresen dienen sowohl zur Trennung und Analyse der Nukleinsäuren als auch zur präparativen Isolierung bestimmter Fragmente.

Nach Ablauf der Standard-PCR wurde mit einem Volumen von $10\mu\text{l}$ bei Standard-PCR mit $50\mu\text{l}$ Ansatz und $7\mu\text{l}$ bei Standard-PCR mit $30\mu\text{l}$ Ansatz die Gelelektrophorese durchgeführt, dabei wurde überprüft, ob die zu sequenzierenden Proben ein Signal gaben und verunreinigungsfrei waren, was mit Hilfe der Leerprobe ermittelt wurde.

3.9.2 Ansetzen des Gels

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe der 2%-igen Agarosegele, die sich vor allem zur Auftrennung kleinerer PCR-Produkte (ca. 200 bis 600 Bp) eignen. Es wurden 2g Agarose-Pulver abgewogen, mit TAE-Puffer auf 100ml aufgefüllt und im Mikrowellenofen zum Kochen gebracht. Unter dem Abzug wurden dem Gemisch $1,5\mu\text{l}$ Ethidiumbromid ($230\mu\text{g}/\text{ml}$) beigegeben. Ethidiumbromid ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff (planar, aromatisches Kation), der sich zwischen die Basen der Nukleinsäuren schiebt, wodurch seine Fluoreszenz im ultravioletten Bereich bei 254, 302 oder 366nm intensiviert wird [110].

Das noch flüssige Gel wurde in eine Gießkammer mit ein bis zwei Probekämmen, die je 14 bzw. 20 Zähne für die Geltaschen hatten, gegeben und unter dem Abzug für mindestens 20 Minuten zum Abkühlen stehen gelassen. Des erstarrte Gel wurde in eine mit TAE-Puffer befüllte Horizontal-Gelapparatur gelegt. Je $10\mu\text{l}$ bzw. $7\mu\text{l}$ der zu untersuchenden Probe und $3\mu\text{l}$ des Proben-

auftragungspuffers (vgl. Tab. 3.12) wurden miteinander durch Auf- und Abziehen in der Pipette vermischt. Die so hergestellten Probengemische wurden in die einzelnen Gel-Taschen geben. In einer weiteren Tasche lief immer der XIV-Marker zur DNA-Fragment-Längenbestimmung mit.

3.9.3 Einstellungen der Elektrophorese-Kammer

Die Elektrophorese-Kammer wurde immer bei 112-120V und 450-500W für 20-30 Minuten eingeschaltet. Das entspricht einer Feldstärke von ca. 1-5 V/cm². Das Ergebnis wurde unter dem UV-Licht betrachtet und zur Dokumentation mit einer Polaroidkamera durch orange-rot-Filter fotografiert oder mit dem Gel-Dokumentations-Gerät eingescannt.

Die nun folgenden Schritte, die in der Sequenzierung mündeten, wurden nur durchgeführt, wenn die Leerprobe bei der Gelelektrophorese die Verunreinigungsfreiheit der zu untersuchenden Proben bestätigte und diese ein deutliches Signal gegeben hatten.

3.10 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der spezifischen DNA-Fragmente aus den PCR-Produkten erfolgte mit dem high pure PCR product purification kit von Roche Applied Science. Das Ziel war die Entfernung der evtl. noch vorhandenen Taq-Polymerase, Oligonukleotid-Primer, Salze und freier Nukleotide. Die Grundlage dieser Aufreinigung bildet das spezielle Glas-Fiber-Vlies, welches nur DNA-Fragmente mit einer Mindestlänge von 100 bp bindet, auf diese Weise werden die Oligonukleotid-Primer und freie Nukleotide aus dem PCR-Produkt selektiv entfernt [112].

Die Volumenmenge der Probe wurde dabei mit dem fünffachen Volumen des Bindungspuffers versetzt und auf Säule gegeben. In Gegenwart des chaotrophen Salzes des Guanidin-Thiocyanats band die in der PCR vervielfältigte DNA selektiv an die spezielle Glas-Fiber, welche als Säule in den High-Pure-Filter-Tubes vorlag. Nach einer Minute Zentrifugation bei 13000U/min wurden 500 μ l Wasch-Puffer auf die Säule hinzugegeben und bei 11100U/min nochmal zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und eine weitere Zentrifugation mit 200 μ l Wasch-Puffer folgte. Auch dieser Durchfluss wurde verworfen. Durch die schnelle Abfolge von Wasch- und Schleuder-Schritten wurde die gebundene DNA gereinigt und die Primer, Nukleotide und Salze entfernt. Nun wurde auf die Säule, die über ein sauberes Eppendorf-

Gefäß platziert wurde, 50 μ l Eluations-Puffer gegeben und diese nochmals bei 11100U/min zentrifugiert. Die Eluation erfolgte unter Zuhilfenahme des Prinzips der niedrigen Salzlöslichkeit. Diese einfache Methode eliminiert die Notwendigkeit der organischen Löslichkeits-Extraktion und DNA-Prepitation, zudem erlaubt sie eine schnelle Aufreinigung von vielen Proben gleichzeitig [8] [23]. Es wurden jeweils 8 Proben gleichzeitig aufgereinigt.

3.11 Sequenzierungs-PCR

3.11.1 Prinzip der Kettenabbruchmethode

Die von Nobelpreisträger Frederick Sanger 1977 entwickelte enzymatische dideoxyvermittelte Kettenabbruchmethode dient dazu, die Reihenfolge der Nukleotide der DNA zu bestimmen. Sanger nutzte die Eigenschaft der DNA-Polymerasen, nur in 5'-3'-Richtung zu synthetisieren, aus. Das Prinzip von Sanger beruht darauf, dass bei diesem Kopierprozess nicht nur gewöhnliche Nukleotide bereitgestellt werden, sondern auch chemisch veränderte, bei denen der Kopiervorgang abbricht. Dabei arbeitete Sanger mit radioaktiv markierten Chemikalien [96] [64].

Für diese Arbeit wurde die Taq-Cycling-Sequencing-Methode verwendet, die eine Modifikation der Methode nach Sanger ist. Zu Beginn jedes Zyklus' der Sequenzierungs-PCR wurde die Doppelstrang-DNA durch Hitzebehandlung denaturiert, sodass Einzelstränge entstanden. Diese DNA-Proben wurden mit einem Primer und den vier verschiedenen Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sowie den vier 2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphaten (ddNTP) versetzt. Diese ddNTPs trugen gleichzeitig eine Fluoreszenzmarkierung, und zwar eine von vier Farben, je nach der Art ihrer Base. Diese Modifikation erlaubte es, alle vier ddNTPs in ein Reaktionsgefäß zu geben; eine Aufspaltung in getrennte Ansätze und der Umgang mit Radioisotopen entfiel.

Die ddNTP konnten ebenfalls durch Taq-Polymerase in einen wachsenden Nukleotidstrang eingebaut werden. Da sie durch die zweite OH-Gruppe an Position 3 der Ribose (kein 3'-Hydroxylende) einen Abbruch der Elongation bewirkten, wurden sie Terminatoren genannt. Wurden sie in den neusynthetisierten Strang eingebaut, war eine DNA-Verlängerung durch eine Taq-Polymerase nicht mehr möglich, da die OH-Gruppe am 3'-C-Atom für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nucleotids fehlte. Anders als bei der Standard-PCR wurde bei der Sequenzierungs-PCR nur ein Primer

(Forward ODER Revers) eingesetzt, der am 5'-Ende des zu synthetisierenden DNA-Bereichs lag. Deshalb entstanden bei dieser PCR DNA-Stränge mit einem definierten 5'-Ende und einem in der Länge variierenden, basenspezifischen 3'-Ende, welches fluoreszenzmarkiert war [25]. Nach 35 Zyklen wurde eine 35fache lineare Vermehrung des DNA-Abschnitts erzielt.

3.11.2 Ansatz der Sequenzierungs-PCR

Das Ansetzen der Sequenzierungs-PCR erfolgte auf Eis. Wie aus der Tabelle 3.19 hervorgeht, betrug das Probevolumen stets $10\mu\text{l}$. Es wurde weiterhin mit dem Mastermix für eine Staffel aus je 8 Proben gearbeitet.

8 Proben	Einzeln	Mastermix für 8 Proben
BigDye	2	16
F-Primer	0,5	4
Wasser	5,5	44
DNA (PCR-Produkt)	2	aliquotieren auf 8
Gesamt	10	

Tabelle 3.19: Sequenzierungs-PCR-Pipettierschema (Angaben in μl)

3.11.3 Sequenzierungs-PCR-Programm

Nach dem Ansetzen der Proben wurden diese kurz aufzentrifugiert und für 35 Zyklen im Thermocycler belassen. Die Bedingungen der als Sequenzierungs-PCR bezeichneten Polymerasekettenreaktion gehen aus der Tabelle 3.20 hervor.

	Dauer (in min)	Temperatur
Denaturierung zu Beginn	1	96°C
Denaturierung	0,10	96°C
Annealing	0,05	50°C
Extension	1	60°C
Final Extension	3	60°C
Kühle Lagerung	infty	4°C

Tabelle 3.20: Sequenzierungs-PCR-Programm

3.12 Größenausschluss-Chromatographie

Die Größenausschluss-Chromatographie (SEC) oder Gelpermeationschromatographie (GPC), die in der Biochemie häufig auch als Gelfiltration bezeichnet wird, ist eine etablierte Methode zur Auftrennung, Reinigung und Analyse von Nukleotiden, Proteinen und anderen biologischen Makromolekülen. Wird mit einem wässrigen Laufmittel gearbeitet, so verwendet man häufig die Begriffe Gelfiltration oder Gelfiltrations-Chromatographie (GFC) [24][69].

Für diese Doktorarbeit erfolgte die Größenausschluss-Chromatographie mit Hilfe des Sephadex G-50 dry bead diameter 20-50 μ l. Dabei wurde eine konstante Menge des Sephadex-Pulvers mit 300 μ l destilliertem Wasser vermischt und für drei Stunden stehen gelassen. In dieser Zeit entstand ein dreidimensionales Netz des mikroporösen Gels, welches durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 910g (2500 Umdrehungen/min) eine geeignete Trennsäule bildete. Die Trennsäulen waren mit kleinen Kügelchen eines porösen hochvernetzten Materials (Polymer) gefüllt. Der Durchmesser des mikroporösen Gels lag im Bereich von ca. 5-15 μ m. Eluierte nun eine Probe mit Molekülen verschiedener Größe, so fanden die kleinen Moleküle mehr Poren, in die sie hineinschlüpfen konnten und verweilten länger auf der Trennsäule als große Moleküle, die nur in wenige große Poren schlüpfen konnten. Damit eluierten die großen Moleküle zuerst, gefolgt von immer kleineren. Auf diese Weise wurden durch fünfminütiges Zentrifugieren, ebenfalls bei 910g 2500 Umdrehungen/min, die Bestandteile des Big Dye (dNTP, Polymerase, Puffer) von dem Produkt der Sequenzierungs-PCR, welches länger war, getrennt. Es traten (nahezu) keine Wechselwirkungen mit der stationären Phase auf, da die Trennung aufgrund der Größe (genauer: des hydrodynamischen Volumens) der Moleküle in Lösung statt fand. Unter die Säule wurde die Rack-Platte platziert, die auch als Proben-transport- und Untersuchungsplattform für den Sequenzierer verwendet wurde; in diese eluierte entsprechend seines hydrodynamischen Volumens das Sequenzierungs-PCR-Produkt.

Wegen des kleinen Probenvolumens bestand bei längeren Sequenzierer-Wartezeiten die Gefahr des Verdampfens des Wassers aus der Probe. Durch Zugabe von 10 μ l Formamid, das nicht verdampfen kann, blieben die Proben flüssig und damit für die Sequenzierung geeignet. Während der Wartezeit wurden die Proben bei 4°C gelagert.

3.13 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

3.13.1 Funktionsweise des DNA-Sequenzers

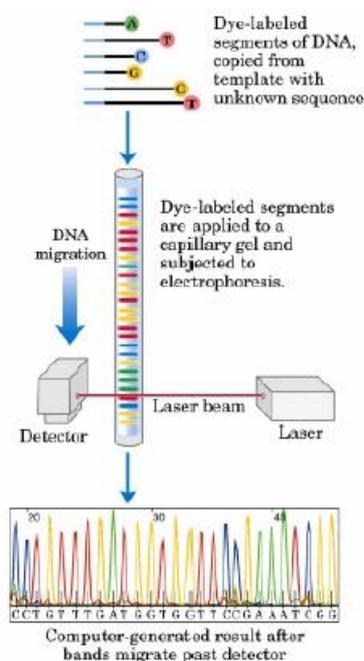


Abbildung 3.2: Prinzip der DNA-Sequenzierung [74]

Dideoxy- oder Kettenabbruchmethode unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Dideoxynucleotiden. Die DNA-Fragmente wurden über ihre fluoreszenzmarkierten Terminatoren von einem Laser erfasst. Die Signale wurden auf einen angeschlossenen Computer übertragen und in die entsprechende Basensequenz übersetzt.

Im Anschluss an die Größenausschluss-Chromatographie wurden die Proben, die die markierten Kettenabbruchprodukte enthielten, mittels Kapillar-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt. Der Fluoreszenznachweis erfolgte in einem DNA-Sequenzier (Abi Prism 3100 Genetic Analyzer). Ein Laserstrahl tastete das Gel ab und erfasste die vier verschiedenen Terminatoren, die jeweils Licht bei einer anderen Wellenlänge emittierten. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragments zeigten dadurch Fluoreszenz unterschiedlicher Farbe und konnten so von einem Detektor erkannt werden. Die Emission wurde in einer Photozelle gemessen und in digitale Signale umgewandelt. Somit wurden die Daten einer Computeranalyse zugänglich, die es ermöglichte, die Signale als Chromatogramme mit Hilfe der

Sequenzierungssoftware, DNA Sequencing Analysis 3.7 von Applied Biosystems, darzustellen. Die Abbildung 3.2 stellt diesen Vorgang vereinfacht dar.

3.13.2 Durchführung der Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit dem Kapillar-Elektrophorese-Sequenzierautomat 3100 Applied Biosystems. Die folgenden Angaben beinhalten spezifische Einstellungen dieses Sequenzierautomaten.

Dye Set: E

Mobility File: DT3100POP6(BD)v2.mob

Comment: No comment

Project name: 3100_Project1

Run Module1:

- StdSeq50_POP6DefaultModule (standardmäßig)
- StdSeq50_POP6_InjTime300s (für schwache Proben)

Analysis mode: BC-3100POP6SR_SeqOfftOff.saz

Durch den Druck auf die Ok-Taste wurde die Information über die Platte in das Warteregister (Pending Plate Records) aufgenommen. Die Rack-Platte wurde auf die Probenplattform platziert. Die Angaben im Warte-Register wurden mit der Probeplattenplattform verlinkt und die Sequenzierung gestartet.

Nach Ablauf der Sequenzierung wurden die Ergebnisse mit Hilfe des Analyseprogramms ABI PRISM ausgewertet.

3.13.3 Auswertung der Sequenzierung

Die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor erschienen, gab indirekt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder. Die dementsprechende komplementäre Sequenz ist die Sequenz der verwendeten einsträngigen DNA-Matrize, welche jedoch durch die Sequenzierungssoftware bereits als solche richtig, also komplementär, wiedergegeben wurde. In jeder einzelnen Sequenzierreaktion wurden aufgrund technischer Beschränkungen nur kurze DNA-Abschnitte von weniger als 700bp abgelesen. In einem Sequenzierungs-Projekt, welches in dieser Doktorarbeit dargestellt wird, mussten folglich längere DNA-Abschnitte zunächst in kleinere Einheiten zerlegt, sequenziert und anschließend wieder zu einer vollständigen Gesamtsequenz

zusammengefügt werden. Diese Strategie wurde insbesondere bei der Sequenzierung der cDNA, die eine zusammenhängende Exonabfolge darstellt, verfolgt und durch eine Drei-Fragment-Sequenzierung realisiert. Ebenso wurde die maximal zu sequenzierende bp-Länge bei der Analyse der genomischen DNA durch die Wahl der 11 Primer-Paare, auf die in den Tabellen 3.7 und 3.8 näher eingegangen wird, berücksichtigt.

Sowohl der Forward- als auch der Revers-Strang einer Probe wurde zunächst auf Auffälligkeiten untersucht. Hierbei stellte jede Spitze (Peak) ein Nukleotid aus der Sequenz dar. Signale, die der Computer nicht eindeutig einem Nukleotid zuordnen konnte, wurden von ihm mit "N" bezeichnet. Diese Veränderung war nur ein Hinweis auf eine eventuell vorliegende heterozygote Mutation, erwies sich jedoch auch häufig als eine Interferenz. Heterozygote Mutationen erkannte man durch das Auftreten eines zusätzlichen Peaks an einer bestimmten Position, wenn auch in variierender Intensität, wobei der originäre Peak eines Nukleotids an dieser Position erhalten blieb. Erst wenn sich im Forward- und im Reversstrang einer Probe eine signifikante Musteränderung eines Peaks fand, ging man von einer heterozygoten Mutation aus. Homozygote Mutationen fand man durch den Vergleich der Probe mit der Wildtyp-Sequenz. Es zeigte sich hierbei in beiden Strängen ein Austausch eines Nukleotids durch ein anderes.

3.13.4 Ziele der Sequenzierung

Die gesamte DNA-Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der enzymatischen Kettenabbruchmethode. Da jedoch bei bestimmten Nukleotidabfolgen (meist bei GC-Sequenz) von der Taq-Polymerase nicht-markierte dNTPs bevorzugt werden und es somit zu einer Unterrepräsentation der entsprechenden ddNTPs kommt, wirkt sich dies auf die Chromatogramme aus. Wenn ein Sequenzierungs-PCR-Produkt mit ddCTP enden sollte und dieses unterrepräsentiert ist, so fällt auch die Base C im Chromatogramm als dementsprechend flacher Peak aus. Dies erschwert die Auswertung. Ein weiteres Problem ist die begrenzte DNA-Fragment-Länge, die in einem Sequenzierelauf untersucht werden kann. Durch die Längsdiffusion der spät im Detektor ankommenden langen PCR-Fragmente werden die Signal-Peaks zunehmend flacher und schlechter aufgetrennt. So fallen oft die Sequenz-Endbereiche dem stetigen Signalabfall zum Opfer. Gerade bei der Verifizierung neuer Mutationen wurde deshalb der Vorwärts- und Rückwärtsstrang betrachtet, da sich bei Mutationen, die im Vorwärtsstrang im Endbereich liegen und nicht eindeutig verifiziert werden können, oft eine eindeutige Veränderung des Peaks im Chromatogramm des Rückwärtsstranges darstellen oder ausschließen lässt.

3.14 cDNA-Generierung

3.14.1 Isolierung und Aufreinigung der mRNA

Die Isolierung und Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem RNAagents® Total RNA Isolation System von Promega. Mit Hilfe des RNA-Isolations-Systems konnten mehrere RNA-Aufreinigungen gleichzeitig durchgeführt werden bei einer Gewebemenge von, wenn notwendig, kleiner als 5mg.

Die erfolgreiche Isolierung intakter RNA besteht aus 4 Schritten.

- 1) effektive Spaltung der Zellen
- 2) Denaturierung der Nukleoproteinkomplexe
- 3) Inaktivierung endogener Ribonuklease (RNase)
- 4) Entfernung der DNA und Proteine

Die 500mg Tumorprobe aus dem -80°C-Kühlschrank wurden mit einem Ultra-Turrax T25 mit einem autoklavierten Aufsatz in 6 ml Denaturierungs-Lösung auf Eis homogenisiert. Das RNA-Isolations-System enthielt zwei starke RNase Inhibitoren, Guanidin-Thiocyanat und β -Mercaptoethanol [19]. Guanidin-Thiocyanat mit N-Lauryl-Sarcosin, auch aus der Denaturierungslösung, lösten die Nukleoproteinkomplexe. Um die RNA bestmöglich zu schützen wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt [36]. Es wurden je 600 μ l Natrium-Acetat und 6ml Phenol:Chloroform:Isoamyl-Alcohol hinzu pipettiert. Die Phenol:Chloroform: Isoamyl-Alcohol-Lösung diente dazu, die chromosomale DNA aus den Proben zu entfernen. Nach 15 Minuten auf Eis wurde bei 4°C und 8 rpm (10 000g) für 20-25 Minuten zentrifugiert. Verunreinigungen wurden durch Säure-Extraktion des Phenol:Chloroform:Isoamyl-Alcohols entfernt [80]. DNA und Proteine sammelten sich dabei in der organischen Phase an, während die RNA selektiv in der anorganischen Phase und somit von der DNA, den Proteinen und den Lipiden getrennt, zu finden war. Es wurden vorsichtig so viele ml wie möglich, mindestens jedoch 4ml der anorganischen Phase abpipettiert. Die RNA wurde durch Präzipitation mit Isopropanol aus der anorganischen Phase wiedergewonnen. Nach einem Kühlschritt von mindestens 5 Minuten bei -20°C wurde bei den gleichen Zentrifugeneinstellungen 10 Minuten lang zentrifugiert, sodass sich ein RNA-Pellet am Gefäßboden bildete. Der Überstand wurde verworfen und zum RNA-Pellet wiederholt 2,5ml Denaturierungslösung hinzugeben, geschüttelt und 2,5ml Isopropanol beigemischt. Das RNA-Pellet wurde dadurch resuspendiert. Es folgten Kühl- und Zentrifugationsschritte. Die RNA wurde in der Kühlzentrifuge nochmals pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die RNA mit eiskaltem 75%-igen Ethanol präzipitiert und erneut zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in 400 μ l nucleasefreiem Wasser gelöst.

Nun wurde mit Hilfe des Spektralphotometers die RNA-Konzentration ermittelt. Die Messung erfolgte zwischen 220 und 320nm in Quarzküvetten. Entscheidend für die Auswertung war die Extinktion bei 260 nm wegen des Absorptionsmaximums der Nucleotide bei 260nm. Es wurde darauf geachtet, dass die Absorption zwischen 0,1 und 1 lag, weil sonst die Fehlerquote zu hoch wäre.

3.14.2 Reverse Transkription

Die für diese Arbeit verwendete Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT) ist eine RNA-anhängige DNA-Polymerase, die für cDNA-Synthese von mRNA-Abschnitten, die länger als 5kb sind, geeignet ist, weil ihre RNase-H-Aktivität schwächer ist als bei der sonst gewöhnlich genutzten Avian Myeloblastosis Virus Reversen Transkriptase (AMV-RT) [88].

Als Oligonukleotid-Primer fungierte bei der Reversen Transkription Oligo dT (siehe Tabelle 3.9) . Dieser Primer lagerte sich an den für mRNA typischen Poly-A-Schwanz und bildete somit eine Start-Stelle für die Reverse Transkriptase. Es wurden jeweils $2\mu\text{g}$ RNA verwendet:

$$\text{Volumen mit } 2\mu\text{g}[\text{in } \mu\text{l}] = \frac{2\mu\text{g}}{\text{RNA-Konzentration}[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}]} * 1000$$

Der Rest der RNA wurde nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Je nach der mit Hilfe des Spektralphotometers ermittelten RNA-Konzentration, wurde das Volumen der Reagenzien im Pipettierschema 3.21 angepasst. Das Ansetzen der Reversen Transkription erfolgte auf Eis.

Reagenz	Volumen in μl
RNA ($2\mu\text{g}$)	$2000/X=...$
DNase-free water	$12,5\text{-RNA-Volumen}=...$
Oligo dT	1,5
Gesamtvolumen	14

Tabelle 3.21: Pipettierschema der Reversen Transkription (Teil 1)

Danach wurde der Ansatz sofort für 5 Minuten bei 70°C in einem Termomixer erhitzt um die Sekundärstruktur der mRNA zu lösen. Die Proben wurden sofort eine Minute auf Eis schockgekühlt, wodurch ein Wiederaufbau der Sekundärstruktur der mRNA verhindert wurde [93]. Dem Ansatz wurden zusätzlich Reagenzien aus der Tabelle 3.22 hinzugefügt.

Reagenz	Volumen in μl
M-MLV 5X Reaktion Buffer	5
dNTP mix 2,5 mM each	5
M-MLV Reverse Transkriptase	1
Gesamtvolumen	25

Tabelle 3.22: Pipettierschema der Reversen Transkription (Teil 2)

Der RT-Reaktions-Ansatz wurde für 60 Minuten bei 42° inkubiert. In dieser Zeit wurde die RNA in cDNA transkribiert.

3.14.3 cDNA-PCR

Ansatz der cDNA-PCR

Aus der Gesamtheit der inzwischen in cDNA umgeschriebenen mRNA wurden die für AKT2 spezifischen Abschnitte in einer cDNA-PCR vervielfältigt. Analog zur Untersuchung der genomischen DNA wurde auch hier zur Kontrolle bei jedem neuen cDNA-PCR-Ansatz stets zu den cDNA-Proben eine Leerprobe ohne DNA mit angesetzt. So konnte sichergestellt werden, dass die verwendeten Reagenzien DNA-verunreinigungsfrei waren. Die Proben wurden in Staffeln von je 8 Proben mit einer Leerprobe angesetzt.

Im Vorversuch wurde für jeden Abschnitt der passende Puffer ermittelt. Dabei wurde festgestellt, dass bei allen 3 Abschnitten sowohl Puffer B als auch Puffer C optimal waren.

Anzahl der Ansätze	9	Einzeln	Mastermix für 9 Proben
Wasser		24	216
Puffer	A/B/C/D	10	90
Nucleotide Mix	10 μ M (2,5 μ M each)	5	45
Primer Forward 10 μ M		5	45
Primer Revers 10 μ M		5	45
Ampli-Taq-Gold-Polymerase		0,5	4,5
DNA		0,5	aliquotieren auf 49,5
Gesamtvolumen		50	

Tabelle 3.23: cDNA-PCR-Pipettierschema 50 μ l Ansatz (Angaben in μ l)

Das Ansetzen der cDNA-PCR erfolgte auf Eis.

Anzahl der Ansätze	9	Einzel	Mastermix für 9 Proben
Wasser		14,2	127,8
Puffer	A/B/C/D	6	54
Nucleotide Mix	10 μ M (2,5 μ Meach)	3	27
Primer Forward 10 μ M		3	27
Primer Revers 10 μ M		3	27
Ampli-Taq-Gold-Polymerase		0,3	2,7
DNA		0,5	aliquotieren auf 29,5
Gesamtvolumen		50	

Tabelle 3.24: cDNA-PCR-Pipettierschema 30 μ l Ansatz (Angaben in μ l)

cDNA-PCR-Programm

Nach dem Ansetzen der Proben wurden diese kurz aufzentrifugiert und für 40 Zyklen im Thermocycler belassen. Die Bedingungen der als cDNA-PCR bezeichneten Polymerasekettenreaktion gehen aus der Tabelle 3.25 hervor. Beim Programmieren des Thermocyclers wurde das jeweilige Probevolumen berücksichtigt.

	Dauer (in min)	Temperatur
Denaturierung zu Beginn	5	95°C
Denaturierung	0,5	95°C
Annealing	0,5	55°C
Extension	1,5	72°C
Final Extension	10	72°C
Kühle Lagerung	∞	4°C

Tabelle 3.25: cDNA-PCR-Programm

Die darauf folgenden Schritte der Gelelektrophorese, der Aufreinigung, der Amplifikation und der Sequenzierung wurden analog zu Analyse der Proben aus genomischer DNA durchgeführt.

3.15 Qualitativer Nachweis der alternativen Spleiß-Variante 12a

Der qualitative Nachweis der alternativen Spleiß-Variante 12a aus cDNA-Proben erfolgte durch die spezifische cDNA-PCR und anschließende Gelelektrophorese. Zur Verifizierung wurden die entstandenen PCR-Fragmente nach Standardprotokoll sequenziert.

3.16 Quantitative DNA-Bestimmung der alternativen Spleiß-Variante 12a

3.16.1 Prinzip der Real-Time-PCR

Die Real-Time-PCR (oder Real-Time-quantitative-PCR, kurz RTQ-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Real-Time-PCR ermöglicht also sowohl die Amplifikation als auch die quantitative Bestimmung des PCR-Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß. Dies gelang erstmals 1993 durch die Weiterentwicklung des 1991 von Holland beschriebenen 5'-Nuclease PCR-Assays unter Ausnutzung der 5'-Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase und Einbeziehung von fluorogenen Sonden zur Detektion der Amplifikate [41] [56].

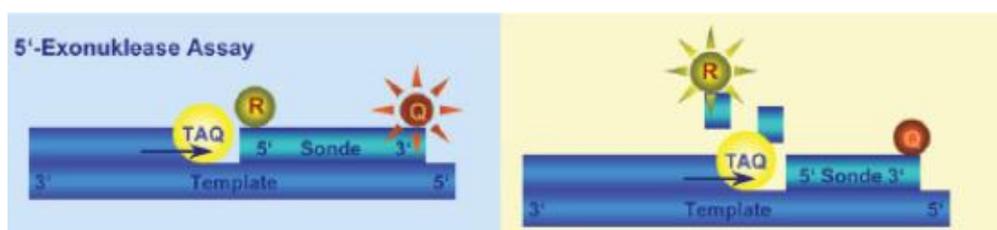


Abbildung 3.3: Grundprinzip der TaqMan©Real-Time-PCR [74]

Abkürzungen: TAQ: Taq-Polymerase, R: Reporter-Farbstoff, Q: Quencher-Farbstoff

Für diese Doktorarbeit wurde das TaqMan©PCR-System verwendet. Die fluorogenen Sonden dieses Systems sind am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert. Vor der Hydrolyse unterdrückt der Quencher-Farbstoff die Fluoreszenz

des Reporter-Farbstoffs durch die Aufnahme seiner Absorptionsenergie (siehe linke Seite der Abb. 3.3). Diesen Vorgang bezeichnet man als Fluoreszenz- (oder Förster-) Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Während der Anlagerungsphase des PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde zusammen mit den Primern an der zu untersuchenden DNA. In der Extensionsphase wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase hydrolysiert, was die Unterbrechung des FRET zu Folge hat. Der nun freie Reporter-Farbstoff fluoresziert (siehe rechte Seite der Abb. 3.3). Da mit jedem PCR-Zyklus immer mehr Reporter-Farbstoff-Moleküle frei werden, steigt auch die gemessene Fluoreszenzintensität mit jedem PCR-Zyklus an. Diese ist direkt proportional zur Produktmenge. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines jeden PCR-Zyklus' (daher der Name "Real Time") durchgeführt, was eine kontinuierliche Aufzeichnung der Produktbildung über die Zeit ermöglicht. Für diese Doktorarbeit wurde die Real-Time-PCR mit dem Gerät ABI-Prism 7000 Sequence Detection System und der SDS-Software durchgeführt. Vorteile dieser Methode sind die sofortige Verfügbarkeit der Daten und das geringe Kontaminationsrisiko [108].

3.16.2 Ansatz der Real-Time-PCR

Das Pipettieren übernahm der Pipettier-Roboter Liquid Workstation epMotion[®]5070, weil eine sehr große Anzahl an Proben in kürzester Zeit in die Mikro Amp[®]optical 96 Well Reaction Plate gegeben werden sollte. Die cDNA wurde zuvor 1:1 mit Wasser verdünnt. Die Tabelle 3.26 zeigt die Zusammenfassung der Reaktionsansätze.

Substanz	Volumen (Angaben in μl)
Wasser	8
Taq Man PCR Mastermix	10
Custom Taq Man Assay (Fluorogene Sonden)	1
cDNA	1
Gesamtvolumen:	20

Tabelle 3.26: Real-Time-PCR-Pipettierschema

3.16.3 Real-Time-PCR-Programm

Nach dem Pipettieren wurden die 96-wells mit einer speziellen Folie (Optical Adhesive Cover) verschlossen und kurz zentrifugiert. Die Bedingungen der

als Standard-PCR bezeichneten Polymerasekettenreaktion gehen aus Tabelle 3.27 hervor. Die Reaktionen wurden in einem ABI-Prism 7000 durchgeführt. Die Messung erfolgte für 50 PCR-Zyklen.

	Dauer (in min)	Temperatur
UNG Aktivierung zu Beginn	2	50°C
Denaturierung zu Beginn	10	95°C
Denaturierung	0,15	95°C
Annealing/Extension	1	60°C
Kühle Lagerung	infty	4°C

Tabelle 3.27: Real-Time-PCR-Programm

3.16.4 Auswertung der Real-Time-PCR

Nach der Durchführung der Real-Time-PCR wurden die dabei gewonnenen Daten ausgewertet. Wenn die Fluoreszenzintensität (Ordinate) in einem Diagramm gegen die Zyklenzahl (Abszisse) aufgetragen wird, so bildet sich eine sigmoidale Kurve (vgl. Abb. 3.4). Während der Anfangsphase der PCR ist die DNA-Menge am geringsten und die Menge an entstehenden Fluoreszenzsignal noch schwach. Ein exponentieller und daher quantifizierbarer Anstieg findet in der zweiten Phase (exponentielle Phase) statt. Je mehr Ziel-cDNA in der Probe enthalten waren, umso geringer war die Zyklenzahl, bei der die exponentielle Phase vorüber war. In der letzten Phase der Amplifikation stieg die Produktmenge derart an, dass sie eine weitere Amplifikation hemmte. Außerdem war die Wahrscheinlichkeit, dass die Produktfragmente miteinander hybridisieren, die Polymerasen und Nucleotide durch die Hitze zerstört und die Substrate langsam verbraucht werden, in dieser Phase am größten. Die Fluoreszenzintensität ändert sich in dieser Phase nicht (Plateau-Phase).

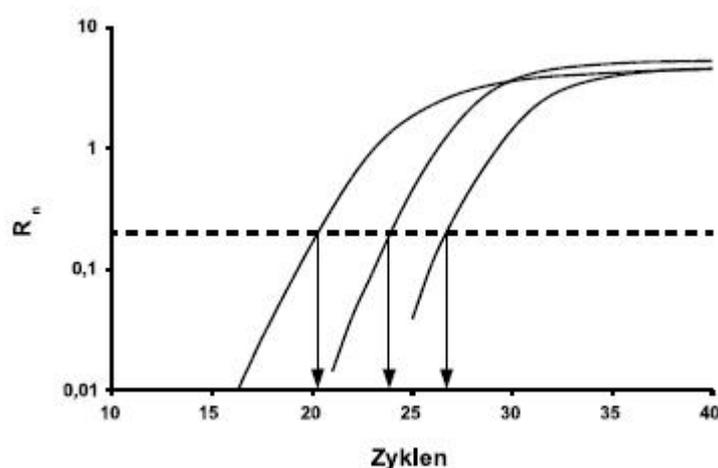


Abbildung 3.4: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse einer Real-Time-PCR

Produktamplifizierung bei der Real-Time-RT-PCR. Dargestellt sind fiktive Kurvenverläufe mit von links nach rechts abnehmender Expressionstärke [14]. Rn (normalized reporter) gibt die Fluoreszenz an, die gegen die Zyklenzahl aufgetragen wird.

Die gemessene Fluoreszenzintensität entspricht dem Rn-Wert (normalized reporter), welcher das Verhältnis von Reportersignal zu mittlerer Grundintensität der passiven Referenz angab und direkt proportional zur Produktmenge war. Die zu diesem Rn-Wert gehörigen Zyklenzahlen (CT-Werte) waren als Abszissenwerte der jeweiligen Schnittpunkte der Kurven zu lesen. Der CP-Wert oder der CT-Wert beschreiben also den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz anstieg. Mathematisch lässt sich der CT mit Hilfe der folgenden Formel ermitteln:

$$CT = dRn/dZyklus$$

Beide Werte markierten somit den Anfang der exponentiellen Phase und entsprachen der Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig waren, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am CP befand sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Idealerweise verdoppelte sich mit jedem Zyklus die DNA-Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal.

In der Real-Time-PCR gibt es dazu generell zwei Quantifizierungsstrategien [82].

relative Quantifizierung: Dabei wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes “Housekeeping“-Gen (HKG) bezogen. Dieser relative Mengenvergleich wird Normalisierung der Expressionsergebnisse genannt [86]. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der RT innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das HKG betreffen [82].

absolute Quantifizierung: Diese wird anhand einer gegebenen Kalibrierkurve durchgeführt, die auf einer Verdünnungsreihe von RT-PCR-Produkten basiert [81].

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden beide Quantifizierungsstrategien gleichzeitig angewandt. Bei jedem Analyselauf wurden sowohl das Housekeeping-Gen GAPDH als auch eine Verdünnungsreihe mit zuvor ermittelten bekannten Konzentrationen eingesetzt. Bei dieser Quantifizierung erfolgte die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) über die sog. $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode. Dabei wurde im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der CP-Wert des GAPDH vom CP-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta\text{CP} = \text{CP Zielgen} - \text{CP GAPDH}$). Nach dieser Normierung wurde vom ΔCP -Wert der experimentell behandelten Proben der ΔCP -Wert einer bekannten Kontrollprobe abgezogen. Dieses Berechnungsmodell wurde “delta-delta CT“ genannt. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergab sich aus der arithmetischen Formel $2^{\text{exp}[-\Delta\Delta\text{CP}]}$ [59]. Bei diesem Berechnungsschema wurde eine Verdoppelung der DNA-Menge in jedem Zyklus vorausgesetzt [82].

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Sequenzanalyse des AKT2/PKB β in Tumorproben

4.1.1 Ergebnisse der Sequenzanalyse einer gDNA-Tumorbank

Patientendaten der genomischen DNA

Die Tabellen 4.1 und 4.2 geben einen Überblick über das für die Untersuchung ausgewählte Patientenkollektiv. Auf die Ein- und Ausschlusskriterien bei der Auswahl der gDNA-Proben aus der gDNA-Sammlung des Gastro-Enterologischen Forschungslabors der Uniklinik des Saarlandes wurde bereits im Kapitel 3 (Abschnitt: 3.6—“Tumorproben”) eingegangen. Das Patientenkollektiv setzte sich aus 40 Patienten, von denen 17 weiblich und 23 männlich waren, zusammen. Die Tabellen 4.4 und 4.3 fassen die Patientendaten aus den Tabellen 4.2 und 4.1 nach Geschlecht, Alter bei Diagnose, Diagnose sowie dem Ergebnis der MSI-Untersuchung zusammen.

Patient	Geschlecht	Diagnose	Alter bei Diagnose-Stellung	MSI
H004	m	Rectum-CA	67	neg.
H006	w	Colon-CA im prox. Colon desc.	83	neg.
H009	m	Colon trans. und ascend. CA	78	pos.(3/5)
H010	w	Colon ascend. CA	77	neg.
H011	w	Colon ascend. CA	42	pos.(3/5)
H012	m	distales Sigma-CA	67	neg.
H021	m	Tubulo-villöse Adenome des Colons	72	neg.
H023	m	distales Sigma-CA	76	neg.
H035	m	Coecum-CA	77	neg.
H045	m	Colon desc. CA	70	pos.(4/5)
H047	m	Colon ascend. CA	81	pos.(2/5)
H050	m	Coecum-CA	56	neg.
H061	m	Rectum-CA	76	neg.
H062	w	Colon ascend. CA	69	neg.
H071	w	Colon ascend. CA	88	neg.
H085	m	Colon desc. CA	78	neg.
H086	w	Tumor im Colon ascend.	41	neg.
H087	w	Rectum-CA	74	neg.
H095	m	Rectum-CA	40	neg.
H107	w	Colon transv. CA	81	neg.
H108	m	Sigma-CA	66	neg.
H116	m	Sigma-CA	72	neg.
H123	m	Colon desc. CA	67	neg.
H124	m	Rectum-CA	54	neg.
H128	m	Sigma und Colon ascend. CA	67	neg.
H137	m	Colon ascend. CA	68	neg.
H141	w	Sigma-CA	79	neg.
H154	w	Colon desc. CA	74	neg.
H158	w	Colon ascend. CA	52	neg.
H186	w	Rectum-CA	33	neg.
H195	w	Sigma-CA	64	neg.
H197	w	Colon desc. CA	81	neg.
H237	m	Tumor im Colon ascend.	76	neg.

Tabelle 4.1: Patientendaten der genomischen DNA-Bank (Teil 1)

Patient	Geschlecht	Diagnose	Alter bei Diagnose-Stellung	MSI
H239	m	Sigma-CA	49	neg.
H250	m	Coecum-CA	66	neg.
H304	w	Rectum-CA	55	neg.
H408	w	Tumor im Colon ascend.	67	neg.
H414	w	Rectum-CA	69	neg.
H427	m	Colon ascend. CA	71	neg.
H469	m	Rectum-CA	49	neg.

Tabelle 4.2: Patientendaten der genomischen DNA-Bank (Teil 2)

Geschlecht	die/der Jüngste	die/der Älteste	Altersdurchschnitt	Alters-Median
weiblich	33	88	66,4	69
männlich	40	81	61,7	71

Tabelle 4.3: Patientenalter bei der Diagnose (in Jahren)

Geschlecht	Rectum-CA	Colon-CA	Adenom	MSI positiv	MSI negativ
weiblich	4	12	1	1	16
männlich	5	16	1	3	20
gesamt	9	28	2	4	36

Tabelle 4.4: Diagnosen des Patientenkollektivs aus der Datenbank der genomischen DNA

Ceacum-CA, Colon ascendens-CA, Colon transversum-CA, Colon descendens-CA und Sigma-CA wurden hier unter dem Oberbegriff Colon-CA zusammengefasst.

Überblick über die Sequenz der AKT2/PKB β in der genomischen DNA

Das AKT2/PKB β -Gen besteht aus 13 Exons mit Längen zwischen 48 und 215bp (siehe Tabellen 4.5 und 4.6). Ebenso unterschiedlich ist auch die Länge der dazwischen liegenden Introns. Der für diese Arbeit verwendete Sequenzierer Abi Prism 3100 Genetic Analyzer konnte Fragmente von einer Länge von ca. 500 bp verwendbar wiedergeben (Abschnitt: 3.13.3—“Auswertung der Sequenzierung”). Es wurden alle 13 Exons in 40 Tumorproben auf Veränderungen in der DNA-Sequenz untersucht. Die Tabelle 4.6 gibt die Länge der PCR-Fragmente im Vergleich zu den Exonlängen an. Soweit es kurze Intronlängen zuließen, wurden mehrere Exon mit einem PCR-Fragment analysiert.

Nucleotid	Sequenz					
1	gaattccagc	ggcggcgccg	ttgccgctgc	cgggaaacac	aaggaaaggg	aaccagcgca
61	gcgtggcgat	ggcggggggt	agagcccccg	cggagaggct	ggcgggctgc	cggtgacaga
121	ctgtgccctg	tccacgggtg	ctctgcatg	tcctgctgcc	ctgagctgtc	ccgagctagg
181	tgacagcgta	ccaagctgcc	accATC	ggggctccct	gacaaagaa	ggcggctcc
241	gcaagngctg	tgaatacatc	aagacctgga	ggccacggtg	cttcctgctg	aagagcgacg
301	gctccttcat	tgggtacaag	gagaggcccg	aggcccctga	tcagactcta	cccccttaa
361	acaactcttc	cgtagcagaa	tgccagctga	tgaaagccga	gagggccgca	cccaacacct
421	ttgtcatacg	ctgcctgcag	tggaaccacag	tcacgcgagag	gaccttccac	gtggattctc
481	cagacgagag	ggaggagtgg	atgcccggcca	tccagatggt	cgccaacagc	ctcaagcagc
541	gggccccagg	cgaggacccc	atggactaca	agtgtggctc	ccccagtgac	tcctccaaga
601	ctgaggagat	ggaagtggcg	gtcagcaagg	cacgggctaa	agtgaccatg	gataactcc
661	acnatoaa	accctttgcc	aaaggaacct	ttggcaaat	catcctggct	ggagaaagc
721	ccactggccg	ctactacgcc	atgaagatcc	tgcaaaagga	agtcctcatt	gcaaggatg
781	aagtgcctca	cacagtcaacc	gagagccggg	tcctccagaa	caccaggcac	ccgttctca
841	ctggcctca	ctggcctca	ctggcctca	ctggcctca	ctggcctca	ctggcctca
901	ctggcctca	ctggcctca	ctggcctca	ctggcctca	ctggcctca	ctggcctca
961	ggttttatgg	tgcagagatt	gtctcggctc	ttgagtactt	ggcactcggg	gacgtggtat
1021	accgcgaat	caa	gctggaa	aaactcattg	gggcaaatg	aaatcactg
1081	actttggcct	ctgcaaaagc	ggcctcagtg	acgggcccac	catgaaaac	ctctgtggg
1141	cccggagctg	cccgggccc	aaagtgcctg	aggacaatga	ctatggccgg	gcccgtggact
1201	ggtgggggct	gggtgtggct	atgtacgaga	tgatgtcggg	ccgctgccc	ttctacaacc
1261	aggaccacga	ggcctctctc	gagctcatcc	tcatggaaga	gatccgcttc	ccgcgcacgc
1321	tcagccccga	ggcacaagtcc	ctgcttctg	ggctgcttaa	gaaggacccc	aaagcagggc
1381	ttggtggggc	gcccagcgat	gccaaggagg	tcatggagca	caggttcttc	ctcagcatca
1441	actggcagga	cgtggtccag	aaagaagctcc	tgccaccctt	caaacctcag	gtcacgtccg
1501	aggtcgacac	aaggctacttc	gatgatgaat	ttaccgccc	gtccatcaca	atcacacccc
1561	ctgaccgctc	tgacagcctg	ggcttactgg	agctggacc	ggggaaccac	ttccccagt
1621	ctcctactc	ggccagcctc	ggcag	tgag	cagtctgccc	cgcacgctcg
1681	ctgccatcac	cgctgggtgg	ttttttacc	ctgcc		

Tabelle 4.5: Übersicht über die Exon-Verteilung mit Hilfe der cDNA-Sequenz

Die Start- und Stopcodons (ATC und TGA) sind in Großbuchstaben geschrieben. Die Exons wurden abwechselnd mit farbigem und mit weißem Hintergrund hervorgehoben. Die Farbmarkierung bedeutet: **Exon 1**, **Exon 3**, **Exon 5**, **Exon 7**, **Exon 9**, **Exon 11**, **Exon 13**.

Abschnitt	Länge des in der PCR analysierten Bereichs (in bp)	Länge nur Exon (in bp)
Exon 1	202	48
Exon 2	356	129
Exon 3	312	112
Exon 4	299	154
Exon 5	301	132
Exon 6	281	66
Exon 7	255	69
Exon 8	296	123
Exon 9/10	715	129/215
Exon 11/12	475	88/103
Exon 13	213	80

Tabelle 4.6: Exonlängen

Die Fragmentlängen beinhalten auch die Primer, die zwischen 18 und 22 bp lang sind.

Analyse von Exon 1

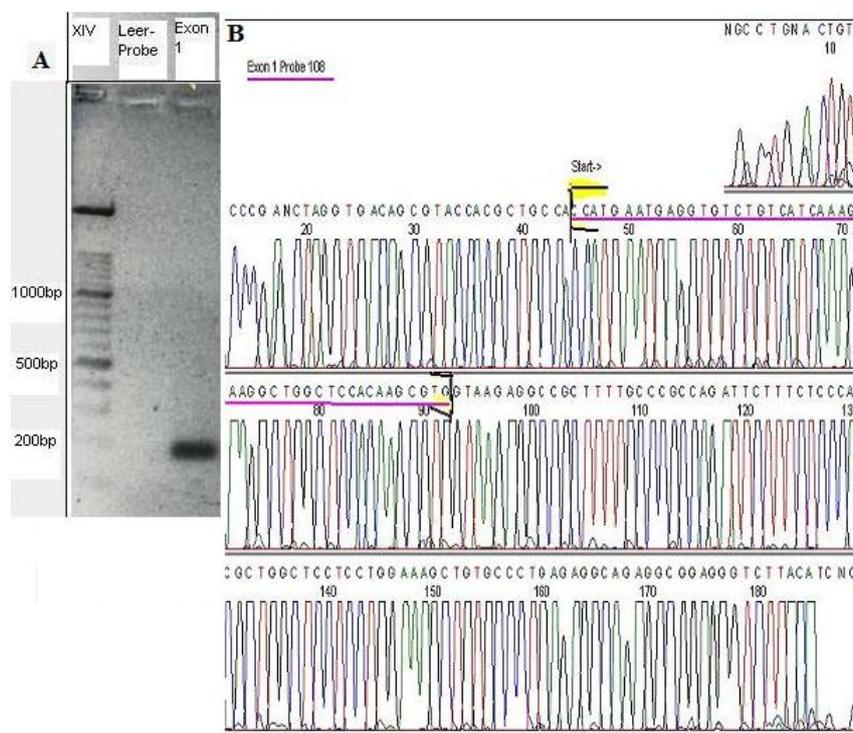


Abbildung 4.1: Exemplarisches Ergebnis für Exon 1 von AKT2/PKB β

Teil A: Exon 1 von AKT2/PKB β wurde aus der gDNA von Patient 108 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare
Teil B: Das in Teil A dargestellte PCR-Produkt wurde nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Die PCR von Exon 1 ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment aus etwa 200bp (siehe Abb. 4.1 Teil A), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.6). Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.1 Teil B). Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speißenden wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt. Das traf auf alle untersuchten Proben zu.

Analyse von Exon 2

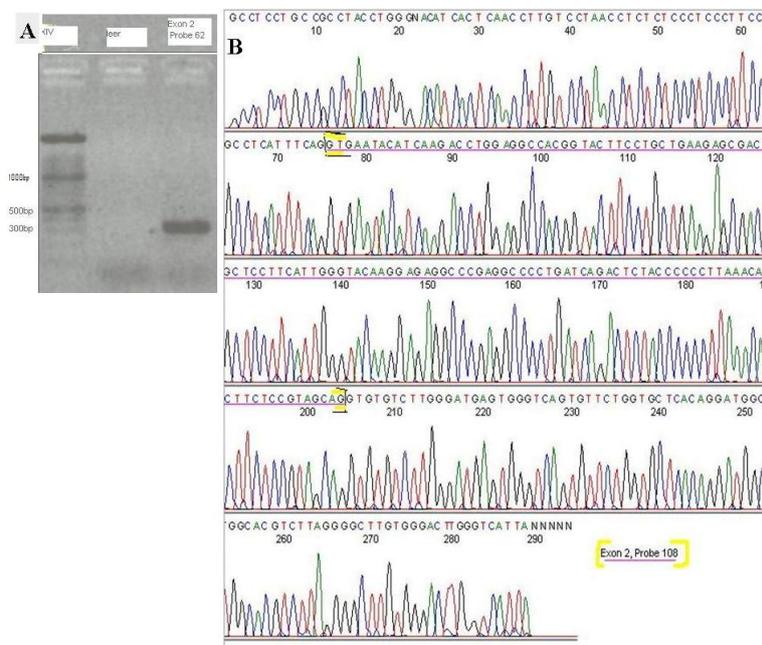


Abbildung 4.2: Exemplarisches Ergebnis für Exon 2 von AKT2/PKB β

Teil A: Exon 2 von AKT2/PKB β wurde aus der gDNA von Patient 62 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare
Teil B: Das in Teil A dargestellte PCR-Produkt wurde nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Die PCR von Exon 2 ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment aus etwa 350bp (siehe Abb. 4.2 Teil A), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.6). Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.2 Teil B). Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speißenden wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt. Das traf auf alle untersuchten Proben zu.

Analyse von Exon 3

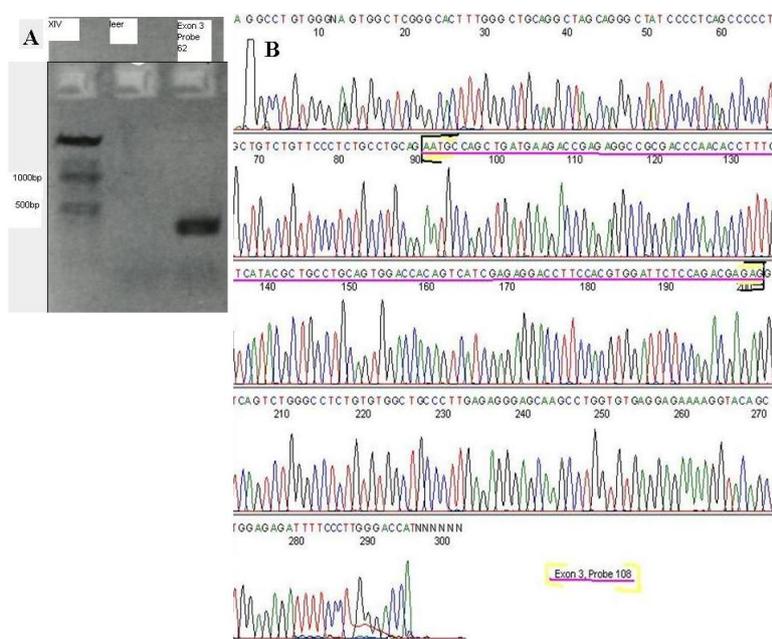


Abbildung 4.3: Exemplarisches Ergebnis für Exon 3 von AKT2/PKB β

Teil A: Exon 3 von AKT2/PKB β wurde aus der gDNA von Patient 62 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare **Teil B:** Das in Teil A dargestellte PCR-Produkt wurde nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Die PCR von Exon 3 ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment aus etwa 300bp (siehe Abb. 4.3 Teil A), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.6). Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.3 Teil B). Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speißenden wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt. Das traf auf alle untersuchten Proben zu.

Analyse von Exon 4

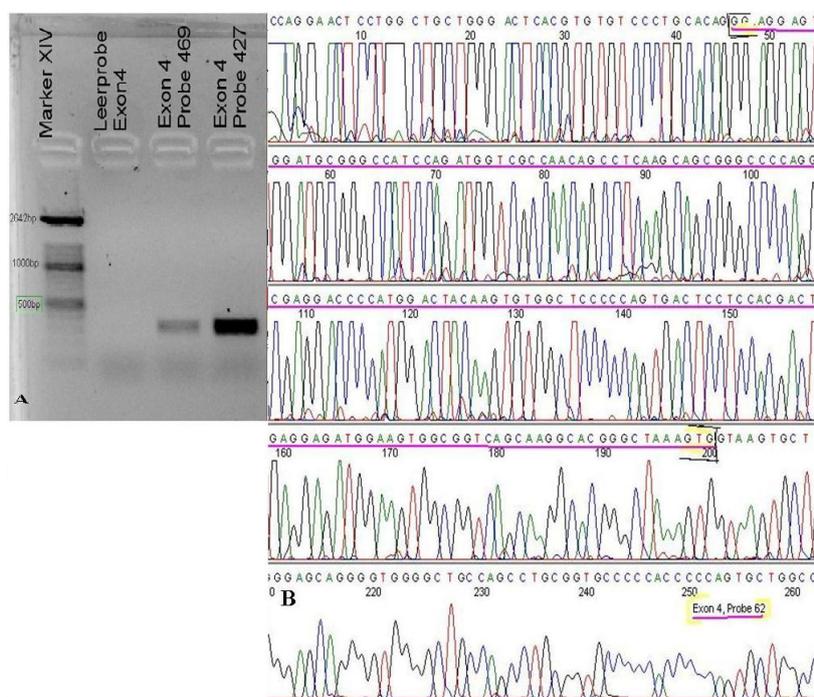


Abbildung 4.4: Exemplarisches Ergebnis für Exon 4 von AKT2/PKB β

Teil A: Exon 4 von AKT2/PKB β wurde aus der gDNA von Patient 469 und 427 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare **Teil B:** Das in Teil A dargestellte PCR-Produkt wurde nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Die PCR von Exon 4 ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment aus etwa 300bp (siehe Abb. 4.4 Teil A), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.6). Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.4 Teil B). Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speißenden wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt. Das traf auf alle untersuchten Proben zu.

Analyse von Exon 5

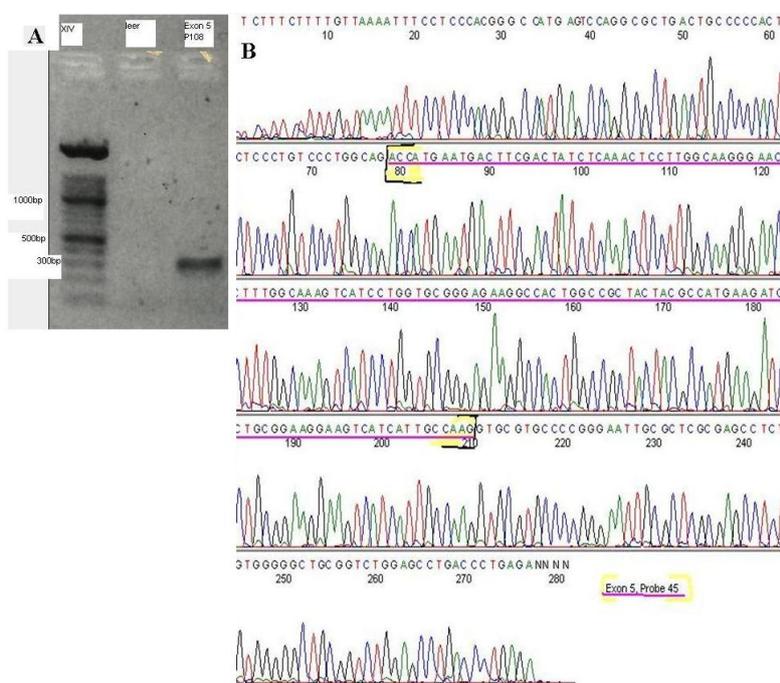


Abbildung 4.5: Exemplarisches Ergebnis für Exon 5 von AKT2/PKB β

Teil A: Exon 5 von AKT2/PKB β wurde aus der gDNA von Patient 108 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare
Teil B: Das in Teil A dargestellte PCR-Produkt wurde nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Die PCR von Exon 5 ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment aus etwa 300bp (siehe Abb. 4.5 Teil A), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.6). Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.5 Teil B). Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speißenden wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt. Das traf auf alle untersuchten Proben zu.

Analyse von Exon 6

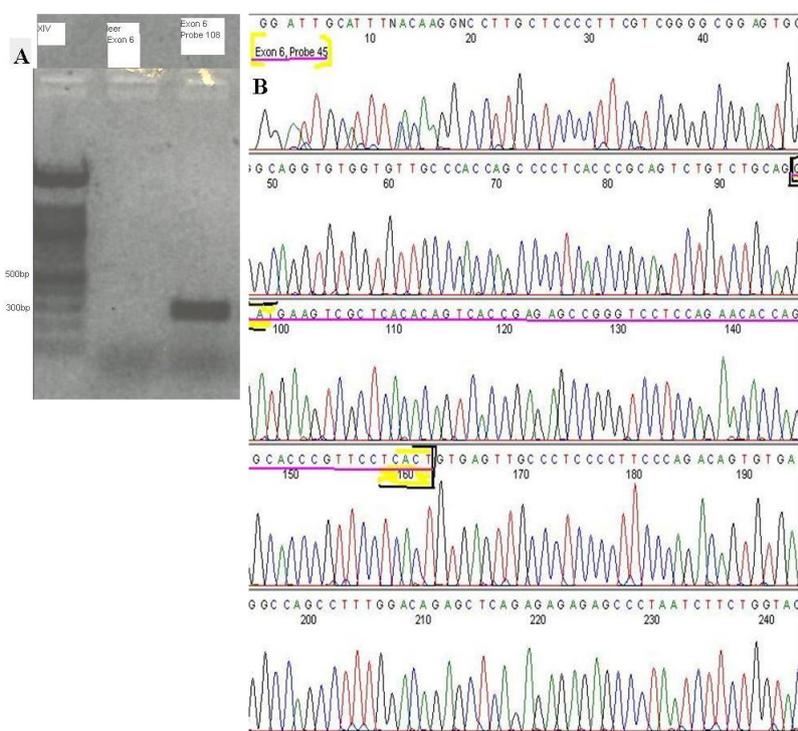


Abbildung 4.6: Exemplarisches Ergebnis für Exon 6 von AKT2/PKB β

Teil A: Exon 6 von AKT2/PKB β wurde aus der gDNA von Patient 108 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare
Teil B: Das in Teil A dargestellte PCR-Produkt wurde nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Die PCR von Exon 6 ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment aus etwa 300bp (siehe Abb. 4.6 Teil A), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.6). Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.6 Teil B). Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speißenden wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt. Das traf auf alle untersuchten Proben zu.

Analyse von Exon 7

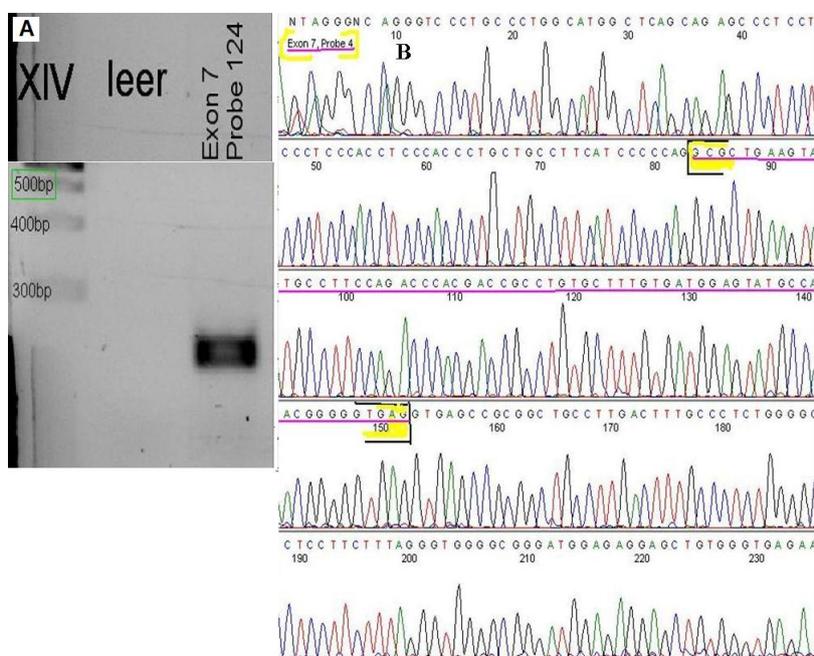


Abbildung 4.7: Exemplarisches Ergebnis für Exon 7 von AKT2/PKB β

Teil A: Exon 7 von AKT2/PKB β wurde aus der gDNA von Patient 124 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare **Teil B:** Das in Teil A dargestellte PCR-Produkt wurde nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Die PCR von Exon 7 ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment aus etwa 250bp (siehe Abb. 4.7 Teil A), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.6). Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.7 Teil B). Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speißenden wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt. Das traf auf alle untersuchten Proben zu.

Analyse von Exon 8

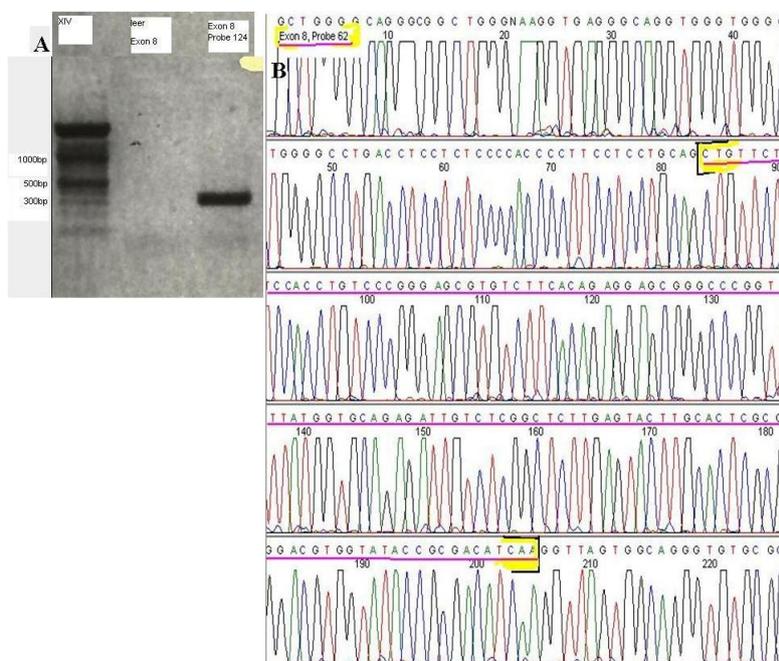


Abbildung 4.8: Exemplarisches Ergebnis für Exon 8 von AKT2/PKB β

Teil A: Exon 8 von AKT2/PKB β wurde aus der gDNA von Patient 124 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare
Teil B: Das in Teil A dargestellte PCR-Produkt wurde nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Die PCR von Exon 8 ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment aus etwa 300bp (siehe Abb. 4.8 Teil A), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.6). Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.8 Teil B). Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speißenden wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt. Das traf auf alle untersuchten Proben zu.

Analyse von Exon 9/10

Die PCR von Exon 9/10 ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment aus etwa 700bp (siehe Abb. 4.9), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.6).

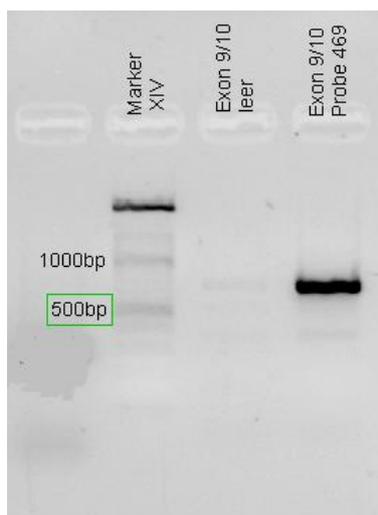


Abbildung 4.9: Exemplarische Gelelektrophorese von Exon 9/10 von AKT2/PKB β

Exon 9/10 von AKT2/PKB β wurde aus der gDNA von Patient 469 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare

Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.10 und Abb. 4.11). In den beiden Abb. 4.10 und 4.11 handelt es sich um ein und die selbe durchgehende Sequenz, was auch aus der Basenpaar-Nummerierung ersichtlich ist. Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speißenden wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt. Das traf auf alle untersuchten Proben zu.

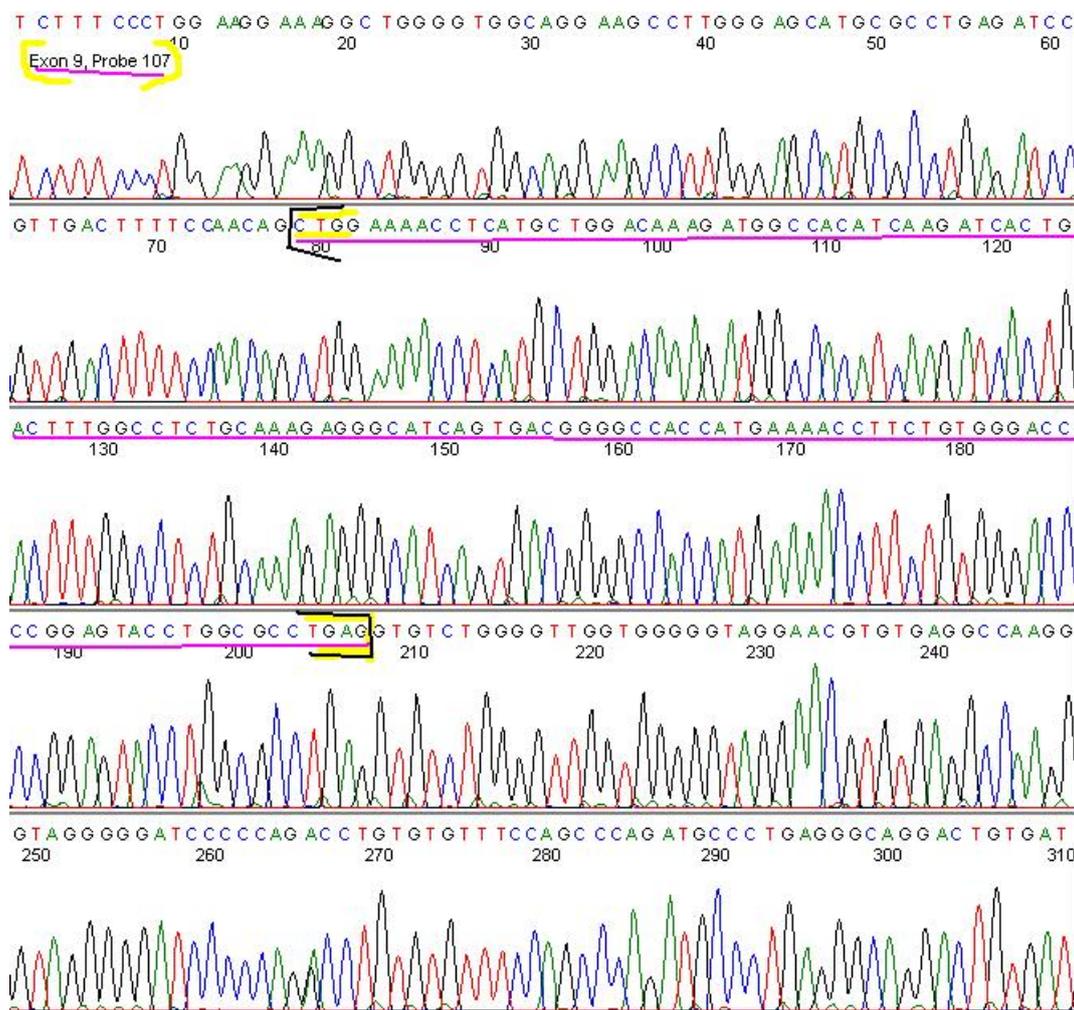


Abbildung 4.10: Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Exon 9/10 von AKT2/PKB β (Teil 1)

Die in Abb. 4.9 exemplarisch dargestellten PCR-Produkte wurden nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

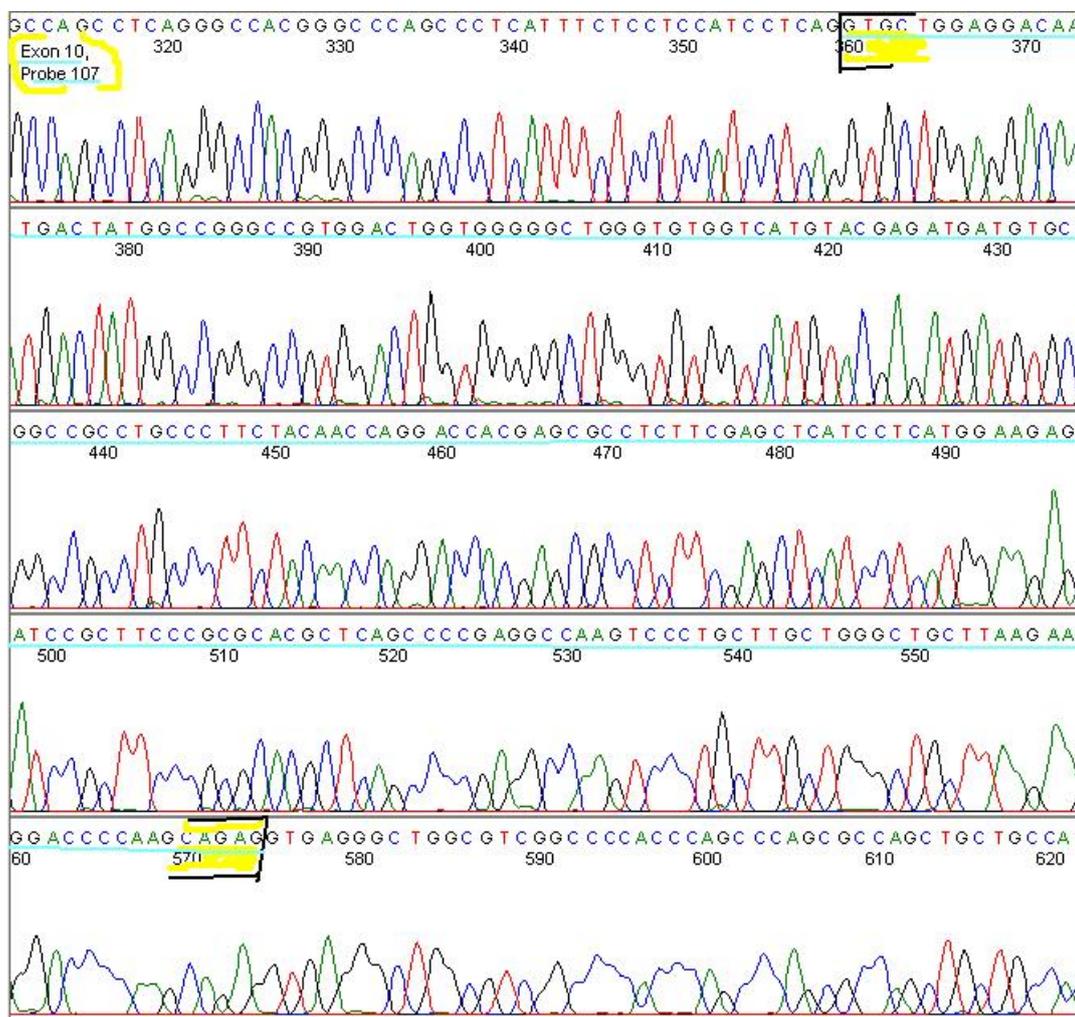


Abbildung 4.11: Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Exon 9/10 von AKT2/PKB β (Teil 2)

Die in Abb. 4.9 exemplarisch dargestellten PCR-Produkte wurden nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Analyse von Exon 11/12

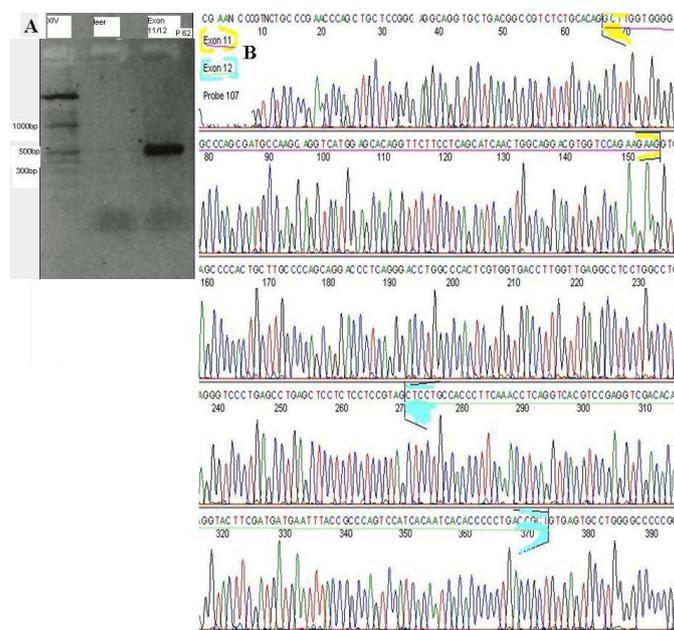


Abbildung 4.12: Exemplarisches Ergebnis für Exon 11 und 12 von AKT2/PKB β

Teil A: Exon 11/12 von AKT2/PKB β wurde aus der gDNA von Patient 62 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare
Teil B: Das in Teil A dargestellte PCR-Produkt wurde nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Die PCR von Exon 11/12 ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment aus etwa 500bp (siehe Abb. 4.12 Teil A), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.6). Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.12 Teil B). Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speißenden wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt. Das traf auf alle untersuchten Proben zu.

Analyse von Exon 13

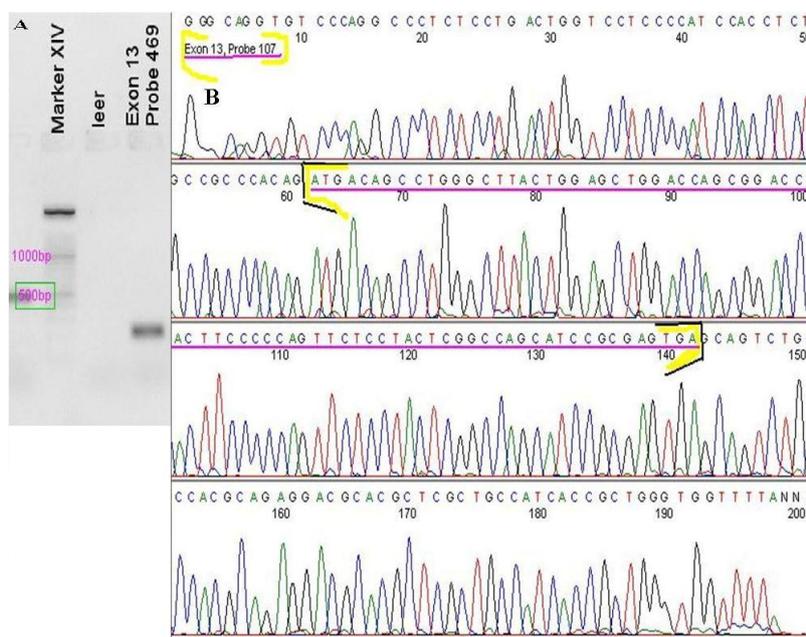


Abbildung 4.13: Exemplarisches Ergebnis für Exon 13 von AKT2/PKB β

Teil A: Exon 13 von AKT2/PKB β wurde aus der gDNA von Patient 469 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare **Teil B:** Das in Teil A dargestellte PCR-Produkt wurde nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Die PCR von Exon 13 ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment aus etwa 200bp (siehe Abb. 4.13 Teil A), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.6). Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.13 Teil B). Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speißenden wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt. Das traf auf alle untersuchten Proben zu.

Zusammenfassung der Analyse kolorektaler Karzinome anhand der gDNA

Die Analyse von 40 Proben genomischer Tumor-DNA kolorektaler Karzinome ergab somit keinen Anhaltspunkt für ein häufiges Auftreten von Mutationen im AKT2/PKB β -Gen. Um eventuell geringe Mutationsereignisse in diesem Gen dennoch zu erfassen und andere gegebenenfalls stärker von Mutationen im AKT2/PKB β -Gen betroffenen Tumorentitäten ebenfalls in die Analyse mit einzuziehen und dennoch den Kostenrahmen des Projekts nicht zu überschreiten, sollte anschließend eine Analyse für cDNA aufgebaut werden.

4.1.2 Ergebnisse der Sequenzanalyse einer cDNA-Tumorbank

Patientendaten der cDNA-Tumorbank

Der Grund für die cDNA-Analyse war, wie bereits oben erwähnt (Abschnitt: 3.14—“cDNA-Generierung”), die Überlegung, dass manche Mutationen erst auf der Ebene der mRNA entstehen. Die Tabellen 4.7 und 4.8 geben einen Überblick über das für die Untersuchung ausgewählte Patientenkollektiv. Auf die Ein- und Ausschlusskriterien bei der Auswahl der cDNA-Proben aus der cDNA-Sammlung des Gastro-Enterologischen Forschungslabors der Uniklinik des Saarlandes wurde bereits im Kapitel 3 (Abschnitt: 3.6—“Tumorproben”) eingegangen. Die Tabelle 4.9 fasst die Patientendaten aus den Tabellen 4.7 und 4.8 nach Diagnose zusammen.

Pa- tient	Kode- Nummer	Diagnose	Datum der Diagnose- Stellung
1	H10528/90	Sigma-CA	09.07.1990
2	H6335/91	Nieren-CA I	17.04.1991
3	H6335/91	Nieren-CA II	17.04.1991
4	H92669/90	Tumor I	
5	H92669/90	Tumor II	
6	H12669/90	Colon-CA	21.08.1990
7	H10583/90	Nieren-CA	10.07.1990
8	H10888/90	Sigma-CA	16.07.1990
9	H7951/88	Magen-CA	11.07.1988
10	H14294	Colon-CA	
11	H12597/90	Rectum-CA	20.08.1990
12	H10489/90	Nieren-CA	09.07.1990
13	H4120/89	Magen-CA	22.03.1989
14	H636/89	Magen-CA	16.01.1989
15	H15980	Nieren-CA	15.10.1990
16	H9481449	Colon-CA	
17	H3303/89	Magen-CA	07.03.1989
18	H4230	Magen-CA	28.03.1989
19	H2705/90	Nieren-CA	16.02.1990
20	H14957/89	Colon-CA	23.10.1989

Tabelle 4.7: Patientendaten der cDNA-Bank (Teil 1)

Pa- tient	Kode- Nummer	Diagnose	Datum der Diagnose- Stellung
21	H4454/89	Sigma-CA I	03.04.1989
22	H4454/89	Sigma-CA II	03.04.1989
23I	H8314/90	Nieren-CA I	30.09.1990
23II	H8314/90	Nieren-CA II	30.09.1990
24	H10489/90	Nieren-CA	09.03.1990
26	H14007/89	Sigma-CA	11.10.1989
27	H4632/90	Colon-CA	31.03.1990
28	H69875/92	Colon-CA	
29	H7971/89	Rectum-CA	14.06.1989
30	H17863/89	Colon-CA	18.12.1989
31	H5433/89	Colon-CA	20.04.1989
32	H85370/91	Colon-CA	1991
33	H12906/89	Rectum-CA	21.09.1989
34	H12082/89	Rectum-CA	06.09.1989
35	H12390/89	Rectum-CA	12.09.1989
36	H9985/90	Colon-CA	28.06.1990
37	H10801/90	Sigma-CA	13.07.1990
38	H18912/89	Sigma-CA	21.12.1989
39	H11505/90	Colon-CA	27.07.1990
40	H12835/90	Colon-CA	23.08.1990

Tabelle 4.8: Patientendaten der cDNA-Bank (Teil 2)

Diagnose	Colon- CA	Nieren- CA	Magen- CA	Rectum- CA	unbekannt	gesamt
Anzahl	19	9	5	5	2	40

Tabelle 4.9: Diagnosen des Patientenkollektivs aus der cDNA-Datenbank

Überblick über die Sequenz der cDNA

Die Tabelle 4.10 zeigt die cDNA-Sequenz des AKT2/PKB β Gens. Die Primer-Bildungsstellen, die zur Amplifizierung dieses Transkripts verwendet wurden, sind farbig dargestellt. Insgesamt wurde die kodierende Sequenz zur Analyse in drei PCR-Abschnitte unterteilt (siehe Tab. 4.11).

Zeile	Sequenz					
1	gaattccagc	ggcggcgccg	ttgcgcctgc	cgggaaacac	aaggaaaggg	aaccagcgca
61	gcgtggcgat	ggcggggggt	agagcccgcg	cggagaggct	ggcgggctgc	cggtgacaga
121	ctgtgccctg	tccacgggtgc	ctcctgcatg	tccctgctgc	ctcctgctgc	ctcctgctgc gg
181	tgacagcgta	ccacgctgcc	accATGaatg	aggtgtctgt	catcaaaagaa	ggctggctcc
241	acaagcgtgg	tgaatacatc	aagacctgga	ggccaacgta	cttcctgctg	aagagcgacg
301	gctccttcat	tgggtacaag	gagaggcccg	aggccctga	tcagactcta	cccccttaa
361	acaactcttc	cgtagcagaa	tgccagctga	tgaagaccga	gagggccgga	cccaacacct
421	ttgtcatacg	ctgcctgcag	tgaccacaag	tcatcgagag	gacctccac	gtggattctc
481	cagacgagag	ggaggagtgg	atgcccggcca	tccaagatggt	cgccaacagc	ctcaagcagc
541	gggccccagg	cgaggaccoc	atggactaca	agtgtggctc	ccccagtgac	tcctccaaga
601	ctgaggagat	ggaagt ggcg	gtcagcaagg	cacgggctaa	agtga ccatg	agtga ccatg
661	actatctcaa	actccttggc	aagggaaacct	ttggc aaact	catcctgctc	ctcctgctgc ggaaggg
721	ccactggccg	ctactacgcc	atgaagatcc	tgcaaaagga	agtcattcatt	gccaaggatg
781	aagtgcctca	cacagtcaac	gagagccggg	tcctccagaa	caccaggcac	ccgttctca
841	ctgcgctgaa	gtatgccttc	cagaccacg	accgcctgtg	ctttgtgatg	gagtatgcca
901	acgggggtga	gctgttcttc	cacctgtccc	gggagcgtgt	cttcacagag	gagcgggccc
961	ggttttatgg	tgagagatt	gtctcgcttc	ttgagtactt	gcactcggcg	gacgtggtat
1021	accgcgacat	caagctggaa	caacctcatc	tgacaaga	tgccacatc	aagatcaactg
1081	actttggcct	ct ctcctgctgc	ctcctgctgc	ctcctgctgc	catgaaaac	ttctgtggga
1141	ccccggagta	cctggcgct	gctcctgctgc	ctcctgctgc	ctcctgctgc	gccgtggact
1201	ggtgggggct	gggtgtggtc	atgtacgaga	<u>tgatgtgctg</u>	<u>ctcctgctgc</u>	ttctacaacc
1261	aggaccacga	ggcctcttc	gagctcatcc	tcattggaaga	gatccgttc	ccgcgacgc
1321	tcagcccga	ggcoaatcc	ctgctgctg	ggctgctaa	gaaggacccc	aagcagaagc
1381	ttggtggggg	gcccagcgat	gccaaggagg	tcattggagca	caggtcttc	ctcagatca
1441	actggcagga	cgtggtccag	aagaagctcc	tgcaaccctt	caaacctcag	gtcacgtccg
1501	aggtcgacac	aaggtacttc	gatgatgaat	ttaccgccca	gtccatcaca	atcacacccc
1561	ctgaccgcta	tgacagcctg	ggcttactgg	agctggacca	gcggacccc	ttccccaggt
1621	tctcctaect	ggccagcatc	cgagTGAg	cgtctgctc	ctcctgctgc	cgacgctcg
1681	ctgccatcac	cgctgggtgg	ttttttacc	ctgcc		

Tabelle 4.10: cDNA-Sequenz des AKT2/PKB β

Die Primer AKT2-3AF, AKT2-3BF und AKT2-3CF lagerten sich am komplementären Strang der cDNA an. Zur besseren Übersicht werden hier trotzdem die Positionen der vorwärts Oligonukleotid-Primer am komplementären Strang mit dargestellt. AKT2-3AR, AKT2-3BR und AKT2-3CR lagerten sich direkt an die markierten Sequenzen an. Durch die Überlagerung mit AKT2-3BF wird der AKT2-3B2F fett geschrieben. Die groß geschriebenen Buchstaben ATG und TGA stehen für Beginn und Ende der zu untersuchenden DNA-Sequenz. Farbkodierung: **AKT2-3AF**, **AKT2-3BF**, **AKT2-3CF**, **AKT2-3AR**, **AKT2-3BR**, **AKT2-3CR**, AKT2-3B2F: fett, AKT2-3B2R

Abschnitt	Länge des Abschnitts (in bp)
A	554
B	565
B2	641
C	577

Tabelle 4.11: Abschnitt-Längen

Die Abschnitte beinhalten auch die Längen der Primer, die zwischen 18 und 22 bp lang sind.

Durch die Verwendung verschiedener Primer beim B-Fragment konnte außerdem ein "Nested-PCR"-Ansatz durchgeführt werden, wodurch sich unspezifische Signale verringern ließen.

Analyse von Abschnitt A

Die PCR von Abschnitts A ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment von etwa 500bp (siehe Abb. 4.14), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.11).

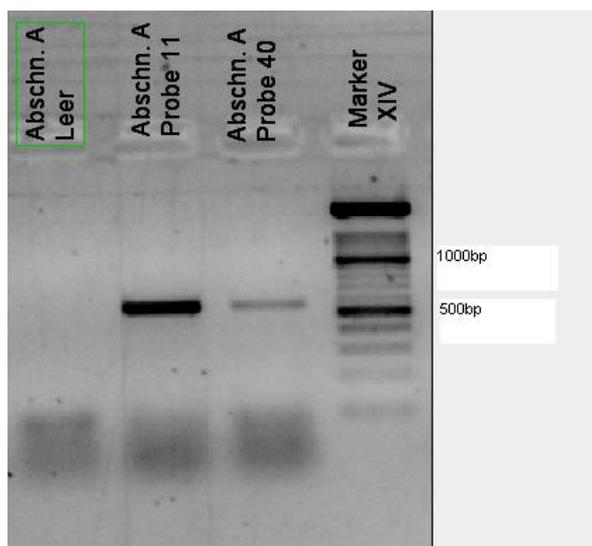


Abbildung 4.14: Exemplarisches Gelelektrophorese-Ergebnis des Abschnitts A der cDNA von AKT2/PKB β

Abschnitts A von AKT2/PKB β wurde aus der cDNA von Patient 11 und 40 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare

Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.15 und Abb. 4.16). Abschnitt A wurde in allen 40 Proben untersucht. Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speiß-Stellen wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt.

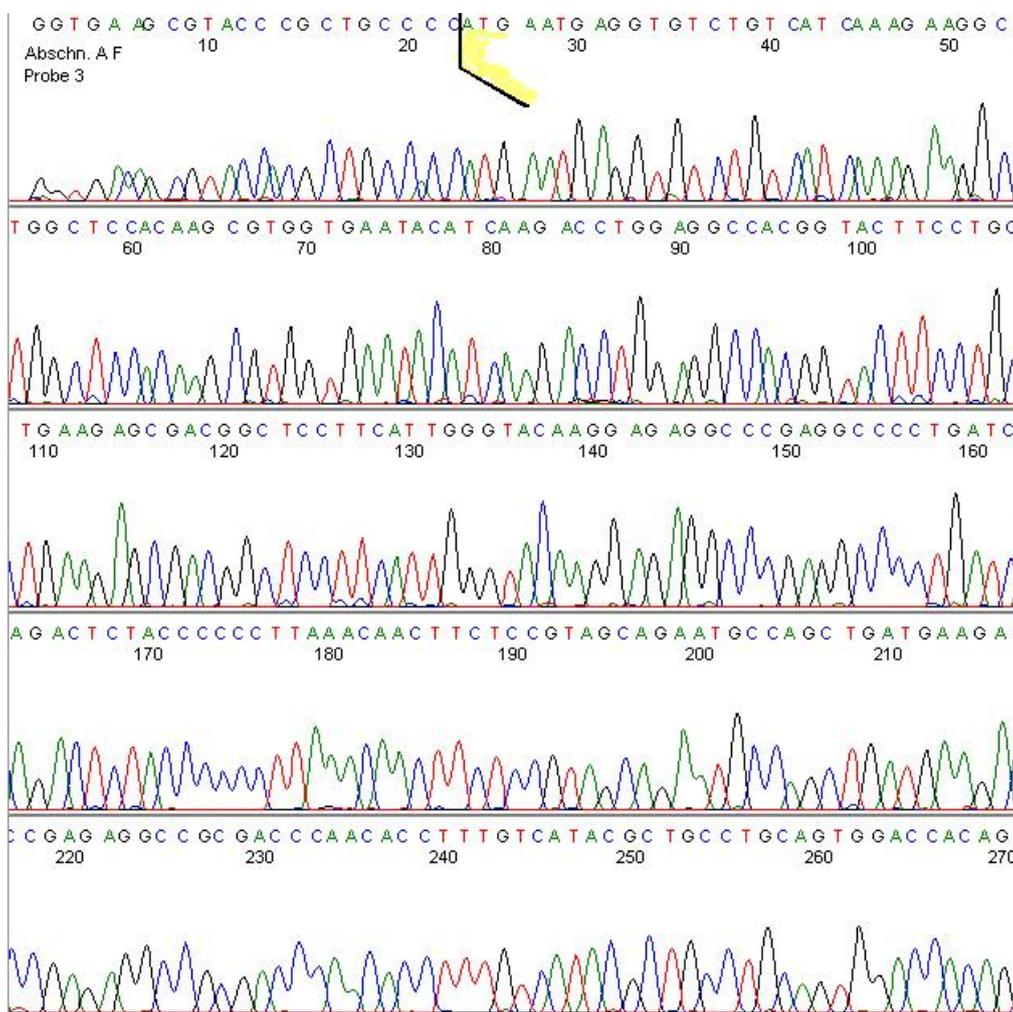


Abbildung 4.15: Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitt A der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 1)

Die in Abb. 4.14 exemplarisch dargestellten PCR-Produkte wurden nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Die Intron-Exon-Grenzen sind mit gelb-schwarzen Klammern hervorgehoben. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

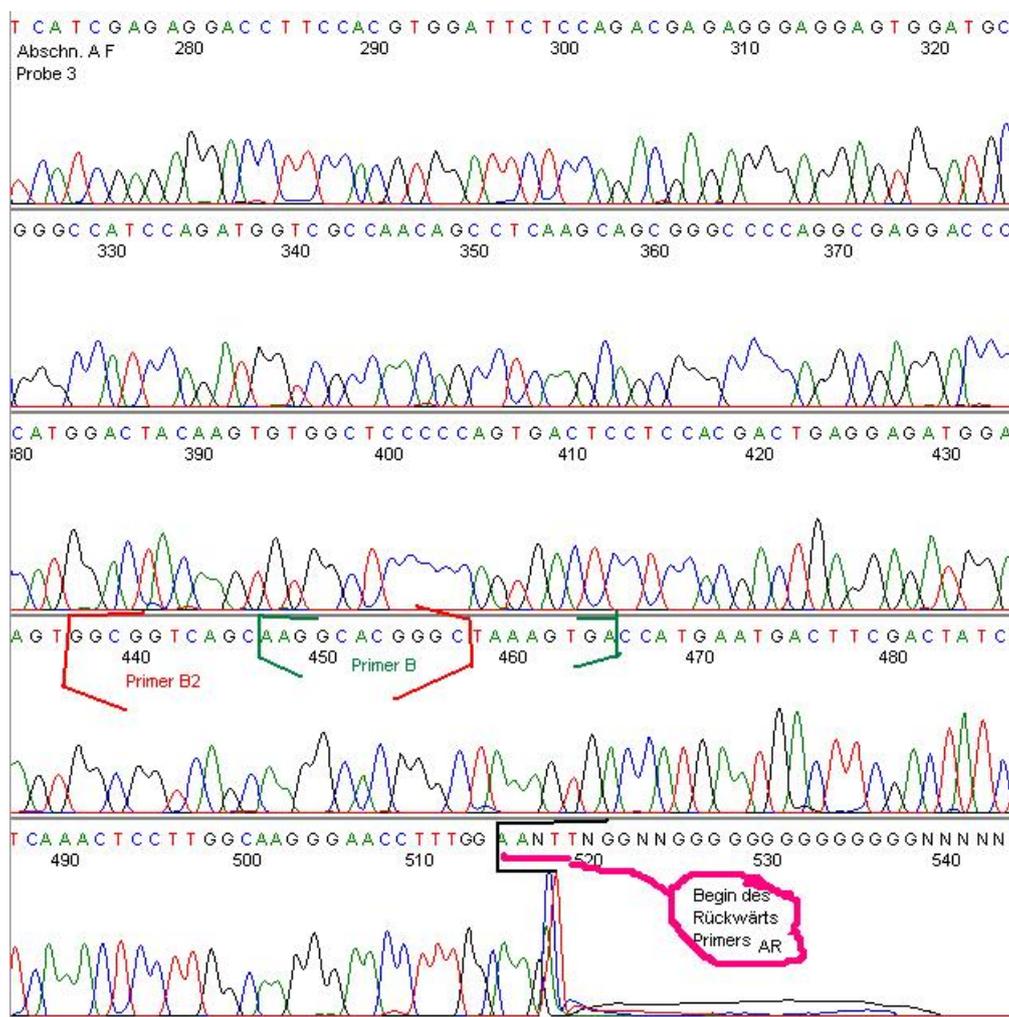


Abbildung 4.16: Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitt A der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 2)

Die in Abb. 4.14 exemplarisch dargestellten PCR-Produkte wurden nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Die Anlagerungsstelle des Primers BF ist mit grünen, während die damit überlappende Anlagerungsstelle des Primers B2F mit roten Klammern hervorgehoben ist. Der Beginn des AR-Primers ist mit schwarzen Klammern und dem violetten Textmarker hervorgehoben. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Analyse von Abschnitt B

Die PCR von Abschnitts B ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment aus etwa 500bp (siehe Abb. 4.17), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.11).

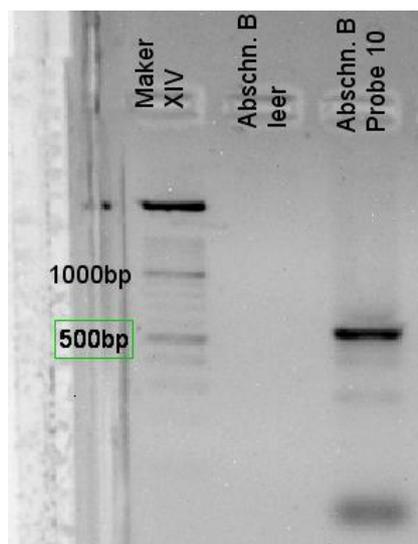


Abbildung 4.17: Exemplarisches Gelelektrophorese-Ergebnis des Abschnitts B der cDNA von AKT2/PKB β

Abschnitt B von AKT2/PKB β wurde aus der cDNA von Patient 10 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare

Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.18 und Abb. 4.19). Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speißenden wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt.

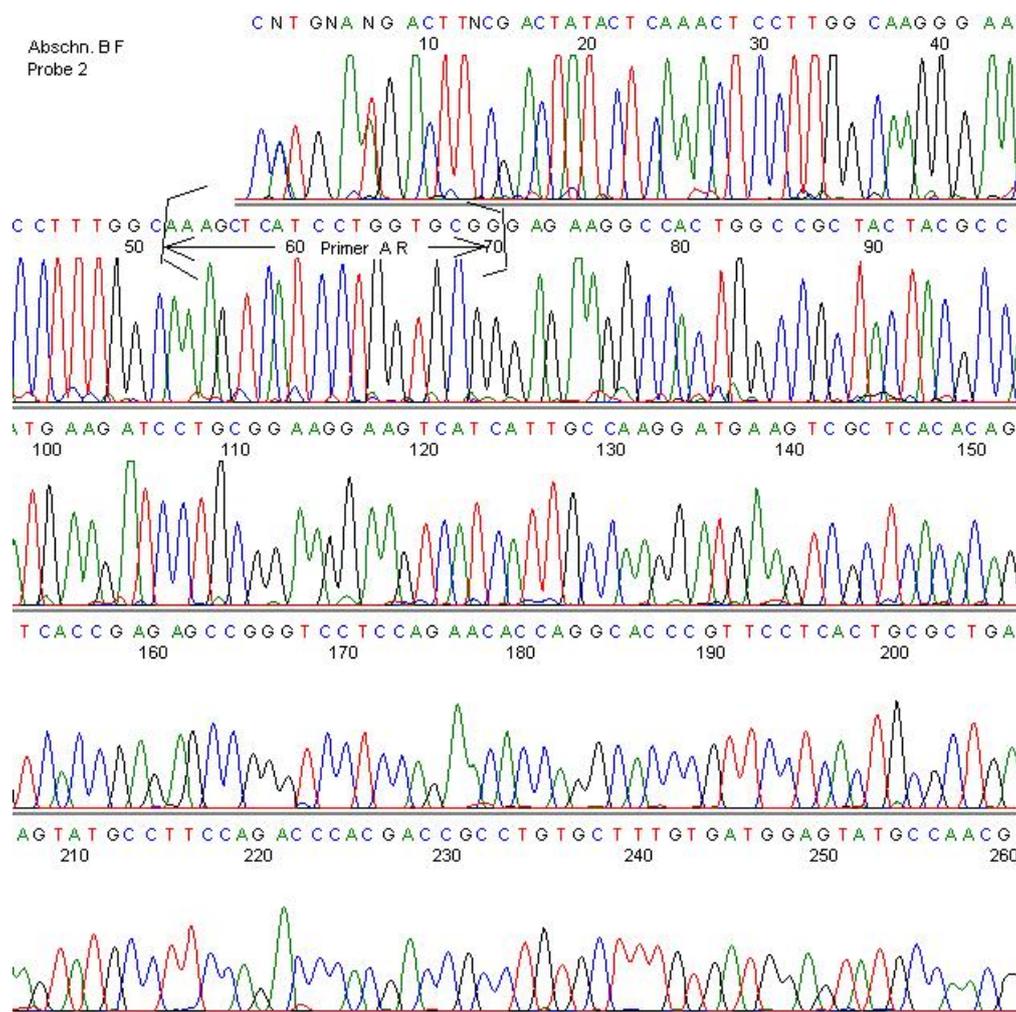


Abbildung 4.18: Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitt B der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 1)

Die in Abb. 4.17 exemplarisch dargestellten PCR-Produkte wurden nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Die Anlagerungsstelle des Primers AR ist mit schwarzen Klammern hervorgehoben. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

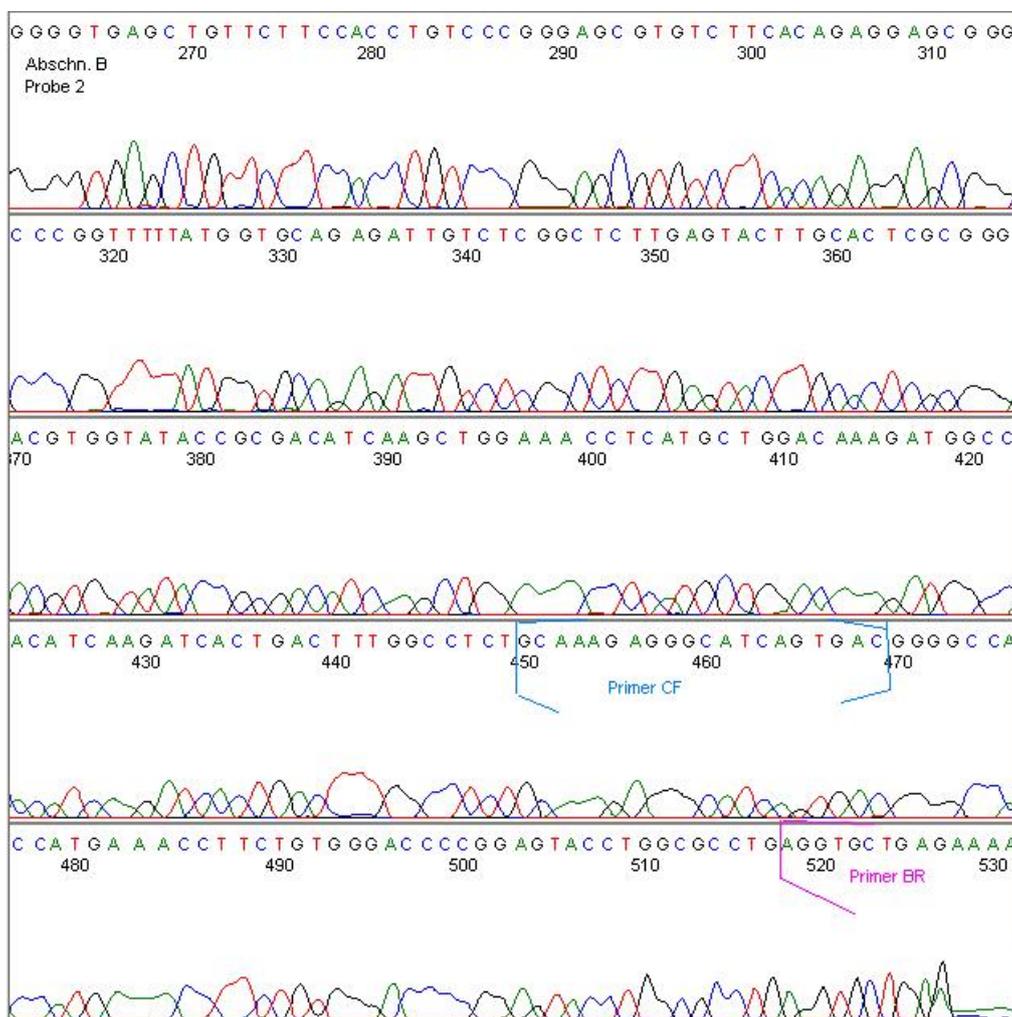


Abbildung 4.19: Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitt B der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 2)

Die in Abb. 4.17 exemplarisch dargestellten PCR-Produkte wurden nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Die Anlagerungsstelle des Primers CF ist mit hellblau hervorgehoben. Der Beginn des BR-Primers ist mit violetten Klammern hervorgehoben. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Analyse von Abschnitt B2

Um die Analyse effizienter zu gestalten, wurden im Laufe der Arbeit zwei weitere B-Primer erprobt und erfolgreich eingesetzt. Diese wurden B2-Primer genannt und auch das nun größere Sequenzfragment bekam die Bezeichnung Abschnitt B2 (siehe Abb. 4.10). Die PCR von Abschnitts B2 ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment aus etwa 600bp (siehe Abb. 4.20), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.11).



Abbildung 4.20: Exemplarische Gelelektrophorese-Ergebnis des Abschnitts B2 der cDNA von AKT2/PKB β

Abschnitt B2 von AKT2/PKB β wurde aus der cDNA von Patient 40 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare

Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.21 und Abb. 4.22). Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speißenden wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt. Das traf auf alle untersuchten Proben zu.

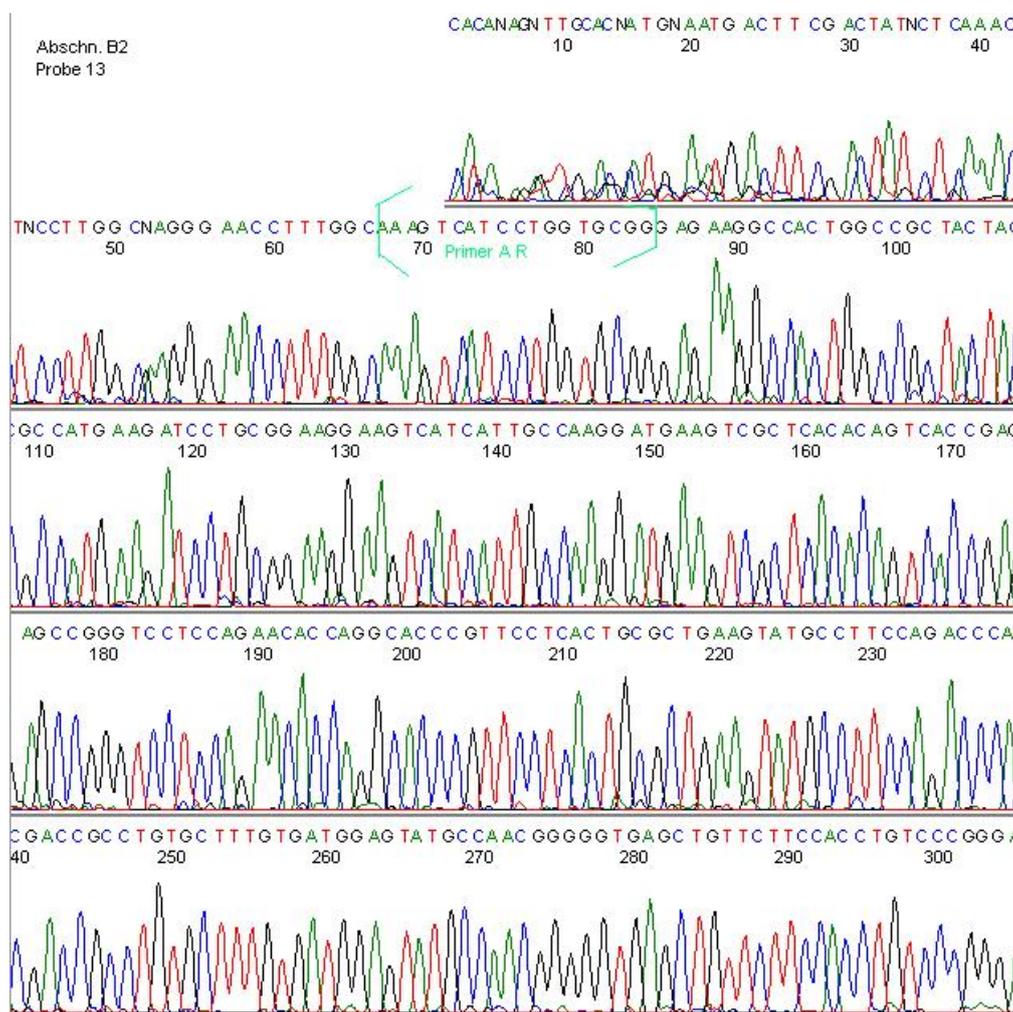


Abbildung 4.21: Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitt B2 der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 1)

Die in Abb. 4.20 exemplarisch dargestellten PCR-Produkte wurden nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Die Anlagerungsstelle des Primers AR ist mit hell-blau-grünen Klammern hervorgehoben. Die Sequenz, die vor den Klammern liegt, ist also bereits bei der Sequenzierung des Abschnitts A untersucht worden. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

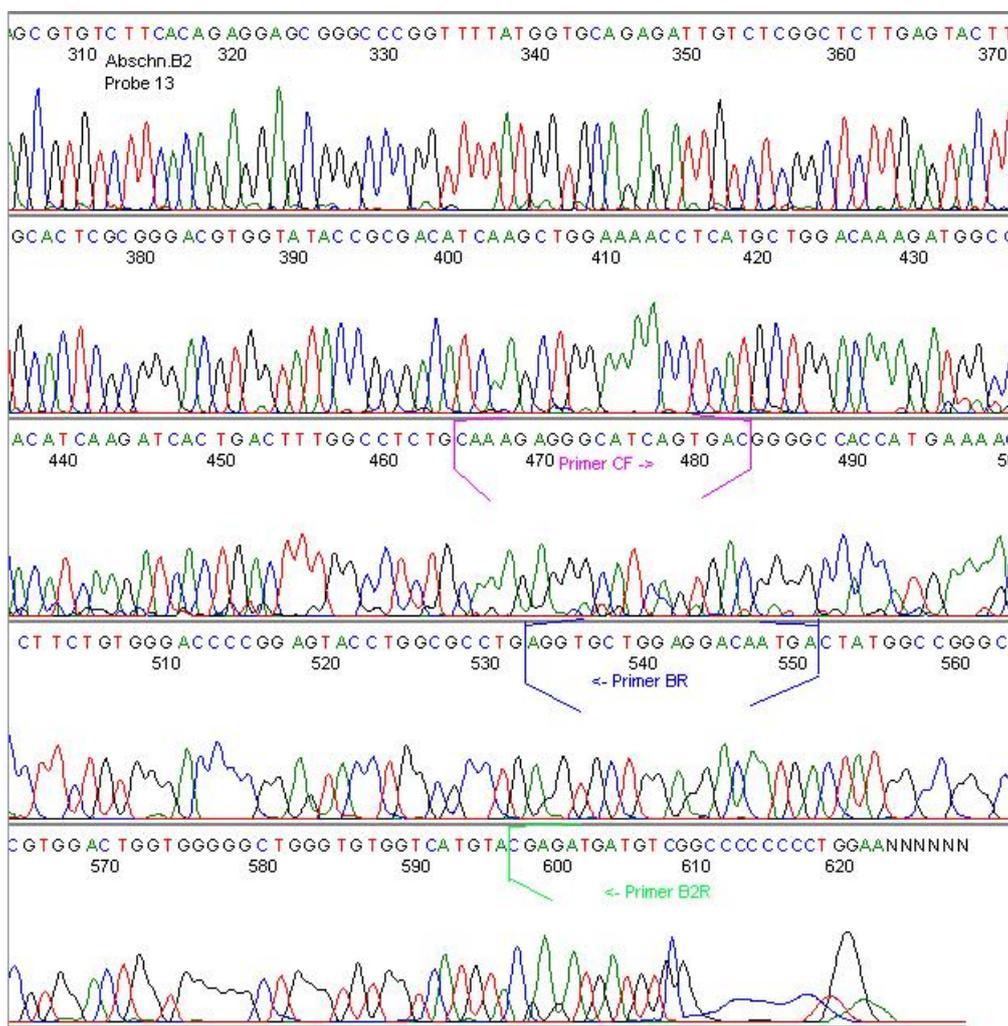


Abbildung 4.22: Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitt B2 der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 2)

Die in Abb. 4.20 exemplarisch dargestellten PCR-Produkte wurden nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Die Anlagerungsstelle des Primers CF ist mit violetten, während die Anlagerungsstelle des Primers BR mit blauen Klammern hervorgehoben ist. Der Beginn des B2R-Primers ist mit hellgrünen Klammern hervorgehoben. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Analyse von Kombination aus B1- und B2-Primern

Die von den Primern B1 erfasste Sequenz wird durch die B2-Primer etwas weiter umschlossen (siehe Abb. 4.10). Diese Tatsache wurde in der Kombination aus B1- und B2-Primern genutzt um die unspezifischen Produkte, die die Auswertung erschweren zu eliminieren. Um die Wirksamkeit der Kombination aus B1- und B2-Primern zu demonstrieren, wurde nach der cDNA-PCR der Probe 37 mit den beiden B2-Primern, ein Ansatz in der Sequenzierungs-PCR mit Primer B2F (siehe Abb. 4.23) und ein anderer mit dem Primer B1R (siehe Abb. 4.24) versetzt.

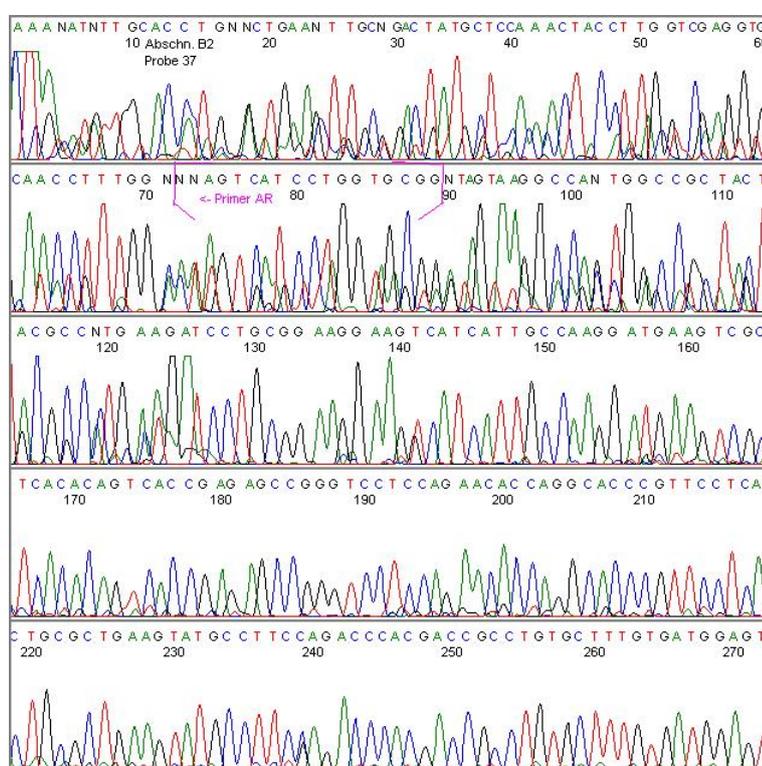


Abbildung 4.23: Sequenzierungsergebnis für Abschnitt B (nur B2-Primer)

Das Ergebnis der Sequenzierung des Abschnitts B2 vorwärts. Abschnitts B2 von AKT2/PKB β wurde aus der cDNA von Patient 37 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Die Anlagerungsstelle des Primers AR ist mit violetten Klammern hervorgehoben. Bei dieser Sequenz erkennt man gut die unspezifischen Produkte, die bis ca 150bp Überlagerungen erzeugen und die Auswertung erschweren. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

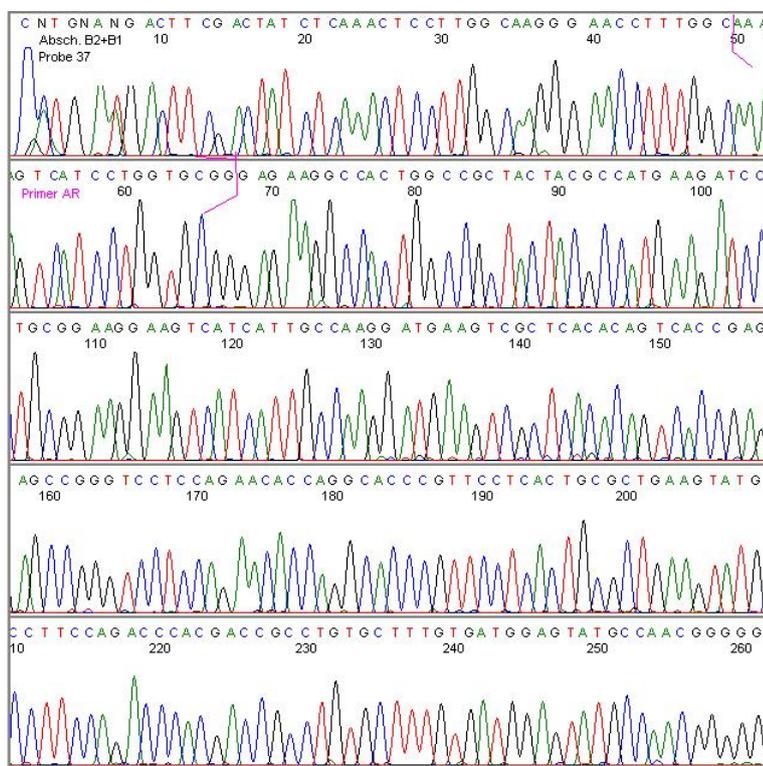


Abbildung 4.24: Kombination aus B1- und B2-Primern: Sequenzierungsergebnis für Abschnitt B

Abschnitts B von AKT2/PKB β wurde aus der cDNA von Patient 37 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Die Anlagerungsstelle des Primers AR ist mit violetten Klammern hervorgehoben. Die in der Abbildung 4.23 zahlreich vorhandenen unspezifischen Fragmente sind nun komplett verschwunden. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Da es sich bei der Abbildung 4.23 um Abschnitt B2 handelt, ist die Lage des Primers AR weiter vom Sequenzbeginn entfernt als bei der Kombination aus B1- und B2-Primern in der Abbildung 4.24. Die vorhandenen unspezifischen Fragmente konnten durch diesen Primer-Wechsel deutlich minimiert werden. Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz oder Veränderungen der Speißenden wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt. Das traf auf alle untersuchten Proben zu.

Analyse von Abschnitt C

Die PCR von Abschnitt C ergab bei gelelektrophoretischer Analyse ein Fragment aus etwa 500bp (siehe Abb. 4.25), was mit der erwarteten Länge übereinstimmte (siehe. Tab. 4.11).

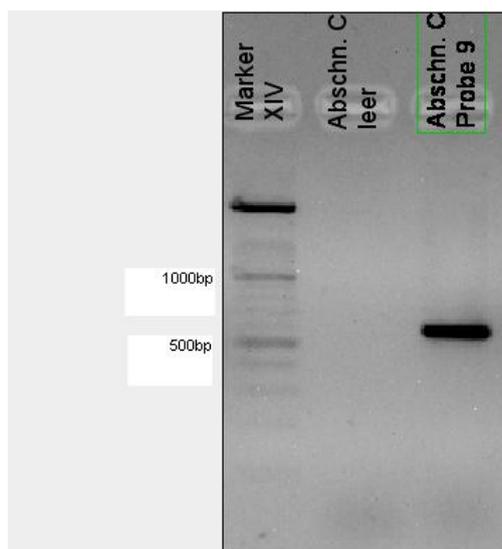


Abbildung 4.25: Exemplarisches Gelelektrophorese-Ergebnis des Abschnitts C der cDNA von AKT2/PKB β

Abschnitts C von AKT2/PKB β wurde aus der cDNA der Patienten 9 nach den in Kapitel 3 (Material und Methoden) geschilderten Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Abkürzungen: bp: Basenpaare

Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte seine Identität (siehe Abb. 4.26 und Abb. 4.27). Eine Veränderung im Vergleich mit der publizierten Wildtyp-Sequenz wurden weder homozygot (ablesbar an der Basenabfolge) noch heterozygot (detektierbar in Form von Peak-Überlagerungen im Elektropherogramm) entdeckt.

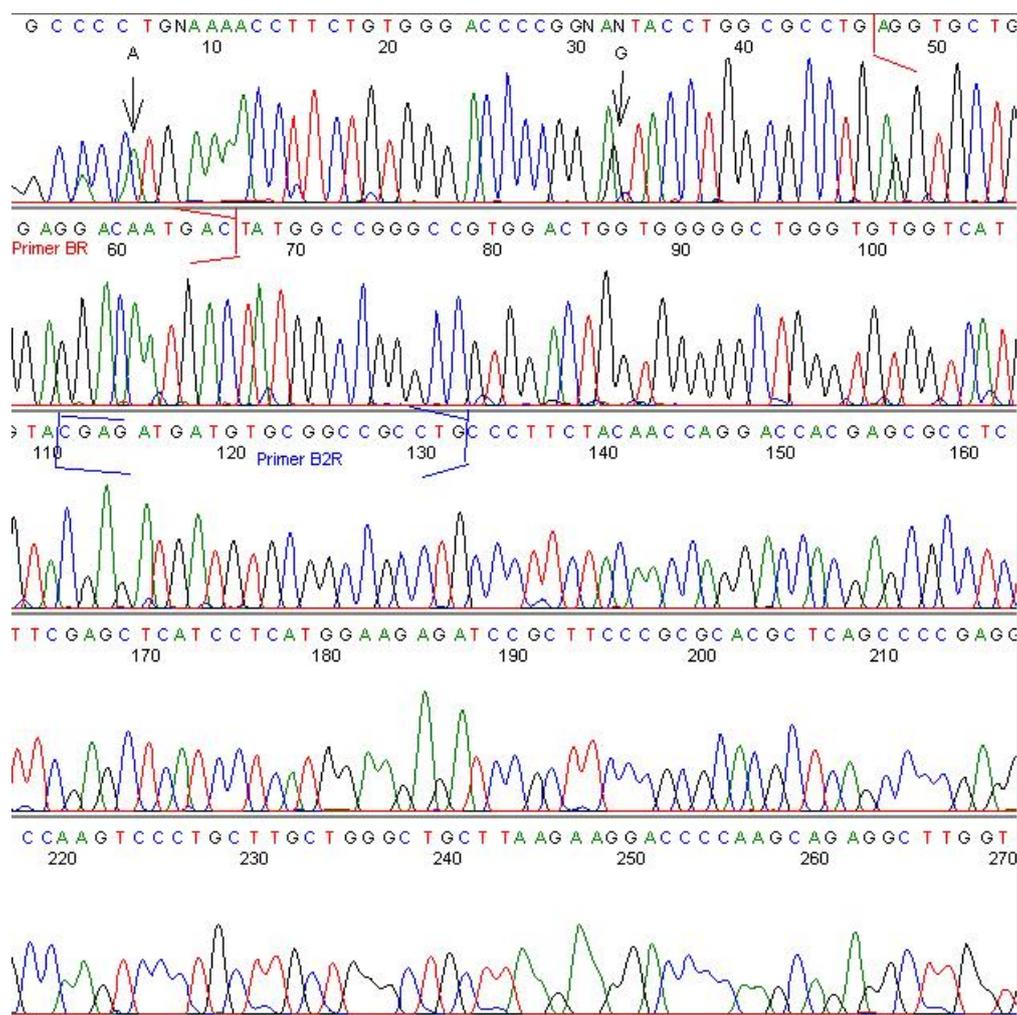


Abbildung 4.26: Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitts C der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 1)

Die in Abb. 4.25 exemplarisch dargestellten PCR-Produkte wurden nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Die Anlagerungsstelle des Primers BR ist mit roten, während die Anlagerungsstelle des Primers B2R mit blauen Klammern hervorgehoben ist. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

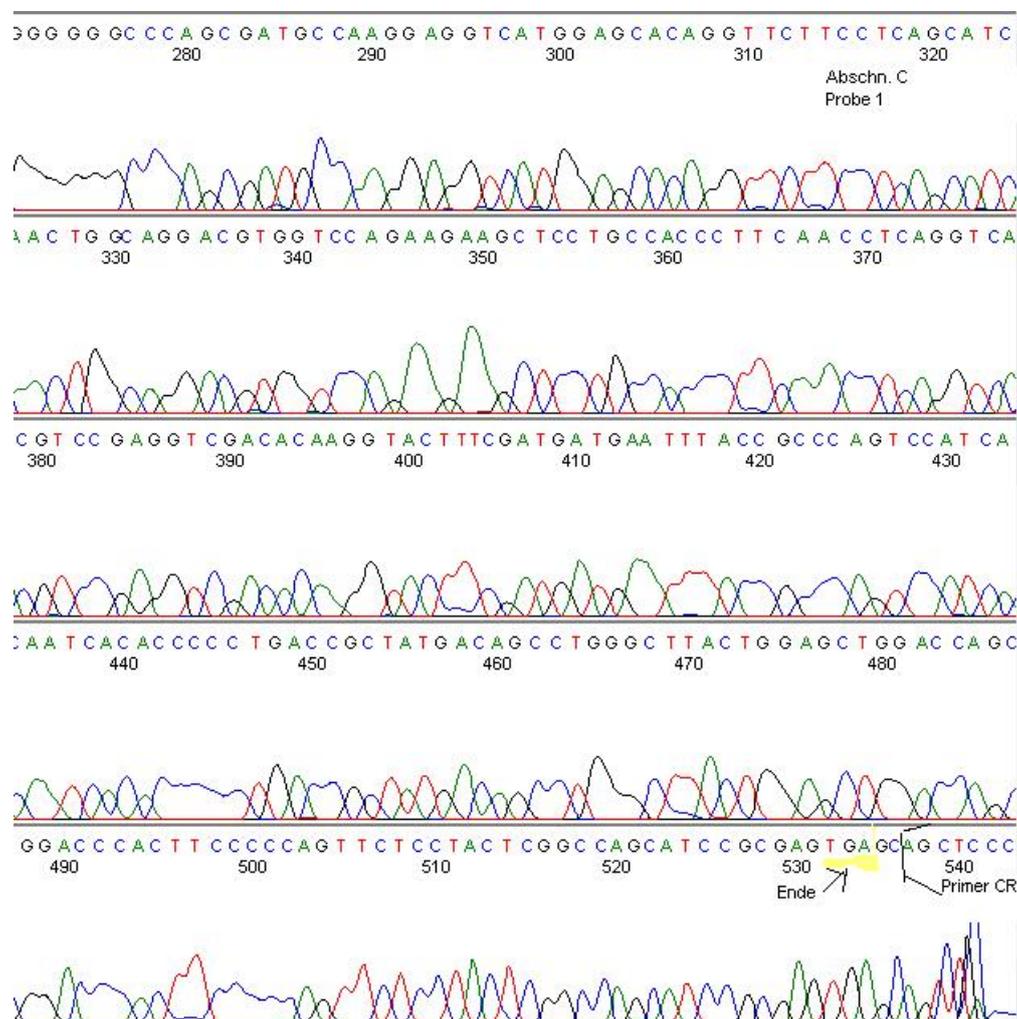


Abbildung 4.27: Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitts C der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 2)

Die in Abb. 4.25 exemplarisch dargestellten PCR-Produkte wurden nach Abtrennung von unerwünschten PCR-Bestandteilen mit dem in Vorwärts-Richtung liegenden Primer sequenziert (Big Dye 1.1, Applied Biosystems) und mit dem ABI3100 Sequenzierer analysiert. Das Ende der proteinkodierenden Sequenz ist gelb unterstrichen. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz

Zusammenfassung der Analyse einer cDNA-Tumorbank

Jeder Abschnitt der cDNA des AKT2/PKB β -Gens der 40 Tumorproben wurde mehrfach aufgereinigt und sequenziert mit dem Ergebnis, dass Mutationen auch hier nicht nachgewiesen werden konnten.

4.2 Analyse der alternative Spleiß-Variante 12a

Als die RNA-Spleißung bezeichnet man die im Zellkern ablaufende Modifikation des primären Transkriptionsprodukts (der prä-mRNA). Beim Spleißvorgang werden die nicht kodierenden Abschnitte (Introns) aus der prä-mRNA herausgeschnitten und die kodierenden Abschnitte (Exons) miteinander verknüpft. [39]. Während aus vielen prä-mRNA nur ein bestimmtes mRNA-Produkt gebildet wird, kann es durch das sogenannte „alternative Spleißen“, zur Bildung unterschiedlicher mRNAs kommen. Dies kann als normaler biologischer Prozess beabsichtigt sein, um aus einem Gen unterschiedliche mRNAs für unterschiedliche Proteinprodukte zu gewinnen, es kann sich aber auch um Fehler beim Spleißprozess handeln, die unter Umständen krankhafte Folgen nach sich ziehen können. Somit können Fehler im Spleißen von Genen genauso, wie Mutationen, für die Entartung von Zellen verantwortlich sein [2] [4].

Im Rahmen von Klonierungsarbeiten wurde in der cDNA des Tumorgewebes eine alternative Spleiß-Variante des Gens AKT2/PKB β entdeckt. In dieser alternative Spleiß-Variante war ein exon-ähnlicher Teil des Introns, das zwischen Exon 12 und Exon 13 liegt, in die mRNA eingespleißt (siehe Tab. 4.12). Die potentielle onkogene Bedeutung dieser alternativen Spleiß-Variante (12a) sollte in Tumoren untersucht werden.

Theoretische Analyse der Spleiß-Variante 12a

Die Tabelle 4.12 zeigt einen Ausschnitt der genomischen DNA-Sequenz des PKB β -Gens zwischen Exon 12 und Exon 13. Die eingespleißte DNA-Sequenz ist 123bp lang. Die Untersuchung dieser Spleiß-Variante ist deswegen vom Interesse, weil sich bei dem entstehenden Protein im Vergleich zum Wildtyp der c-Terminus verändert, der häufig regulatorische Funktionen erfüllt. Die Funktion des dabei entstehenden Proteins, seine Rolle in der Karzinomentstehung und seine Steuerung im Zellmetabolismus stehen gegenwärtig im Mittelpunkt der Forschung. Es sind auch die Oligonukleotid-Primer dargestellt, die zur Detektion der cDNA verwendet wurden. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde der Ologonukleotid-Primer AKT2splice-12aR so gewählt, dass er am Übergang zwischen Exon 12a und Exon 13 der cDNA liegt.

Zeile	Sequenz					
50041	cttgcccag	caggaccctc	agggactgg	cccactcgtg	gtgacctgg	ttgaggctc
50101	ctggcctcag	ggtccctgag	cctgagctcc	tctcctccgt	agctcctgcc	acccttcaaa
50161	ctcagggtca	egtccgaggt	cgacacaagg	facttcgata	atgaatttac	cgcccagtec
50221	atcaacaatca	caccccctga	ccgct gtgag	tgctctgggc	ccccgcgctg	gtgtgcctgc
50281	cccagggtg	gagggatggg	atctgctctt	aactcacttc	tcaaggaggg	ccctcgaagg
50341	ccccgccttc	atgtctggga	gatttcccga	agctgctct	caggcccttt	tgctgttggg
50401	cctctttgga	cctggtgagg	ccaccaggag	ccattgactg	cagcacgttc	tggagctcag
50461	tcggggggct	cagggcagga	ggcagcccgg	tcctgagcc	tggctgggtt	cactgcttta
50521	cagctgtttg	ggttcttact	ctgaactcag	cccagggtg	ggctatgctg	gggacacagc
50581	actgattgag	ccagccctgg	gcctgcctc	ggaaagctcc	cagcccaggt	aggggtggcg
50641	gcctggagtg	gtcagggcta	gggcgtggga	ggccagggac	tggggaatcc	cagggaaat
50701	atccgacctg	gcctgcag	ggcagggct	ctcagagc	ggaccaaa	gtccagctc
50761	ccccgggaa	cgacgtctgc	gatgcagca	atggggaac	atgggatcc	ctaggacc
50821	caagcagcc	gggagtggt	gtgagaaga	gagggcatgg	ggctggagtg	caagggctcg
50881	ggggccactg	ggaggggtgg	ggactgcttg	catggcggga	gccagccatg	gaagggtttc
50941	atacagagag	ggacagggtt	aaagcaggcc	tttagaaagc	ccccctggct	gccctggag
51001	aatggatggg	aggggtcag	aggcaggcca	ggacagggct	ctgggtgga	ctctggcatg
51061	gtgtgtgtg	gggcagagag	aaagtgagag	gctcagaagg	ccctgccagc	tgtggggcgc
51121	atgggcaagg	gcacaggaaa	ctcccagagg	aggccgcccg	ggctcaggt	tggggagtg
51181	ggtccgtggc	tgagggcctc	cattgcgag	ggatggcct	ttcctgtcct	gtcctgtggg
51241	cagccccgc	cagctggggc	cgtttcccga	gggagctcgg	gcaggtgtcc	caggccctct
51301	cctgactggt	cctcccattc	caactctgcc	gcccaacag	gacagcctgg	gcttactgga
51361	ccccgggaa	cgacccaac	ccccaggtt	ctcctactcg	ccagatcc	ccagatcc
51421	agtctgccc	gcagaggac	gcacgctcgc	tgcaatcacc	gctgggtggt	tttttcccc

Tabelle 4.12: Überblick über die Sequenz der Spleiß-Variante 12a in der genomischen DNA

Die Farbmarkierung bedeutet: **Exon 12**, **Exon 12a**, **Exon 13**, Primer AKT2splice-12aR, Fett: Primer AKT2splice-12F und Primer AKT2splice-13R

4.2.1 Qualitative Analyse der alternativen Spleiß-Variante 12a in Tumorproben

Es sollte zunächst festgestellt werden, wie oft die neue Spleißvariante in Tumorproben nachweisbar ist. Hierzu wurde die Wildtyp- und die alternativ gespleißte Form von AKT2/PKB β mittels PCR aus Tumorproben amplifiziert. Wie aus der Tabelle 4.12 ersichtlich ist, wurden hierzu PCR-Primer verwendet die entweder das "normale" Transkript amplifizieren oder spezifisch sind für das 12a-Transkript. Aus dem Überblick über die Sequenz der Spleiß-Variante 12a in der genomischen DNA (siehe Tab. 4.12) wird die Position der Oligonukleotid-Primer deutlich. Als Oligonukleotid-Primer wurden dabei in einem Ansatz die Primer 12F und 13R (Wildtyp) und in einem anderen Ansatz die 12a-Primer 12F und 12aR (12a-Typ) verwendet (siehe Tab. 3.11). Eine Leerprobe wurde ebenfalls stets angefertigt.

Die untersuchten DNA-Abschnitte hatten folgende Länge in Basenpaaren:

162bp: cDNA Wildtyp 12-13

218bp: Alternative Spleiß-Variante 12a

691bp: DNA-Fragment, das entsteht, wenn die Primer 12a und 12F sich an die genomische DNA anlagern

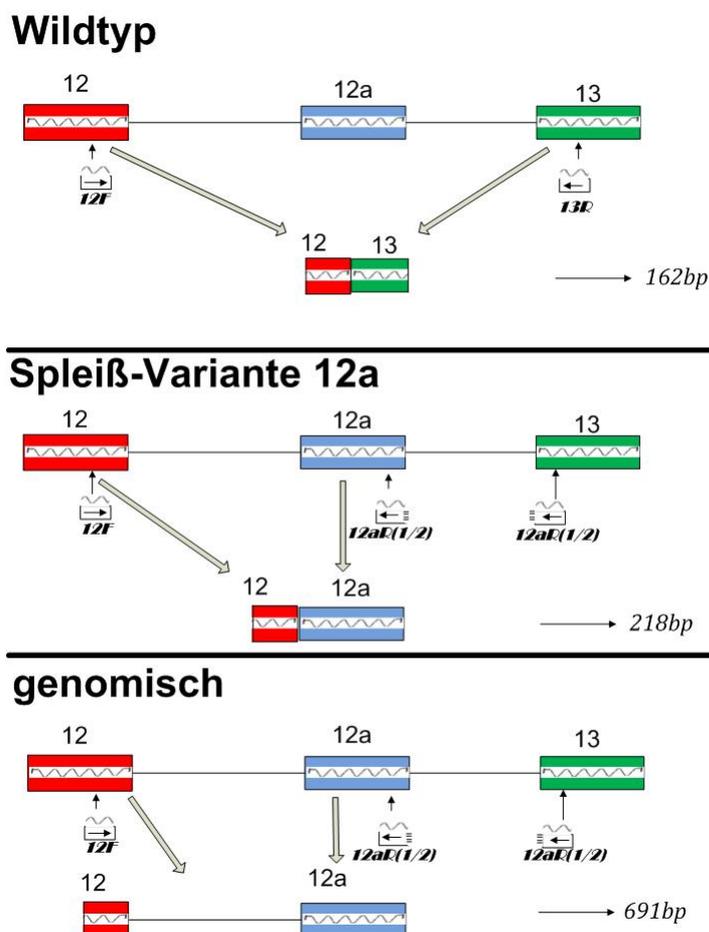


Abbildung 4.28: Schematische Erläuterung der Analyse-Strategie

Beim 691bp langen DNA-Fragment handelt es sich um Amplifikate genomischer DNA, die bei der RNA-Isolierung nicht quantitativ abgetrennt wurden. Diese Abbildung verdeutlicht schematisch die Entstehung der drei verschiedenen langen Gelbanden die in der Abbildung 4.29 dargestellt sind. Exons sind farbig, Introns sind als eine Linie dargestellt.

Das in der Abbildung 4.29 dargestellte Ergebnis der Gelelektrophorese gibt exemplarisch alle möglichen Ergebniskonstellationen wieder. Im Wildtyp-12-13-Ansatz sind in allen cDNA-Proben die 162bp lange Wildtypbanden zu sehen. Die Proben 16, 19 und 21 haben keine Bande im 12a-Ansatz und sind in die weitere Auswertung als **12a negativ** eingegangen. Die Proben 17 und 18 beinhalten im 12a-Ansatz die 691bp lange Bande, die einem Amplifikat genomischer DNA entspricht. Solche Proben sind in die Auswertung als **12a**

genomisch eingegangen. Die rot hervorgehobene Probe 22, ebenso wie Probe 23I und weitere, zeigte im 12a-Ansatz eine 218bp lange Bande der alternativen Spleiß-Variante 12a. Proben mit dieser Bande wurden in die Auswertung als **12a positiv** aufgenommen. Ein weiterer Teil der Proben zeigte im 12a-Ansatz sowohl die 691bp lange genomische als auch die 218bp lange Bande von 12a. Solche Proben gelten als **12a positiv** und **12a genomisch** zugleich, so z. B. die Probe 23I.

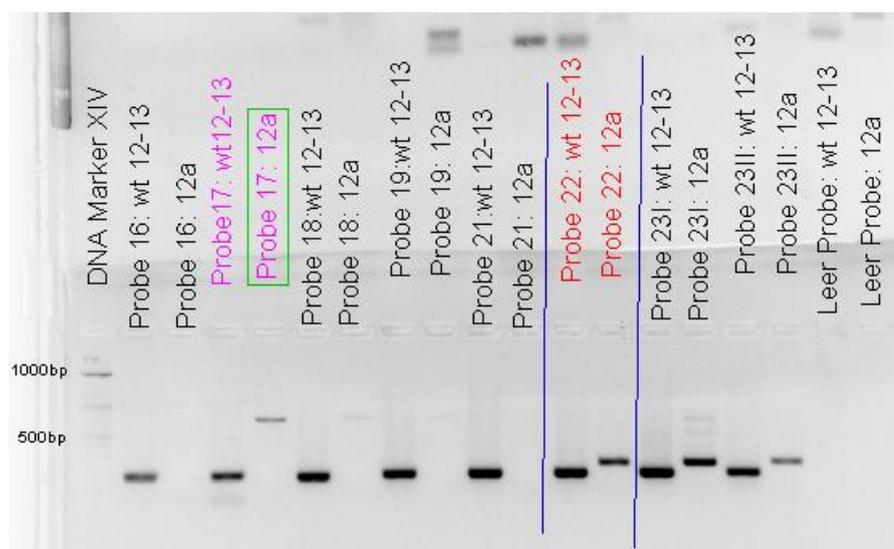


Abbildung 4.29: Exemplarische Gelelektrophorese der alternativen Spleiß-Variante 12a und des Wildtyps 12-13

Die *cDNA*-Proben wurden zunächst der *cDNA*-PCR unterzogen, danach folgte die Gelelektrophorese. Die Amplifikate einer Probe wurden stets paarweise aufgetragen und versetzt beschriftet. Die violett dargestellte Probe 17, aber auch die Probe 18, zeigen im 12a-Ansatz eine ca. 700pb lange Bande (**12a genomisch**), während die rot hervorgehobene Probe 22, ebenso wie die Proben 23I und 23II, eine ca. 200pb lange Bande im 12a-Ansatz aufweisen (**12a positiv**). Die Proben 16, 19 und 21 haben trotz einer sehr starken Wildtyp-12-13-Bande keinerlei Signal im 12a-Ansatz gegeben (**12a negativ**). Abkürzungen: wt: Wildtyp, bp: Basenpaare

Die Tabellen 4.13 und 4.14 geben die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Untersuchung auf das Vorhandensein der alternativen Spleiß-Variante 12a aller 40 cDNA-Proben wieder. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass wie erwartet der Wildtyp in allen untersuchten Proben vorhanden war, während die alternative Spleiß-Variante 12a in 42,5% der Proben zu finden war. Diese Ergebnisse sind in der Tabelle 4.15 zusammengefasst. 10 der 40 Proben, also 25% der Probengesamtheit, wiesen genomische Banden auf.

Probe	Wildtyp 12-13	12a
1	positiv	positiv + genomisch
2	positiv	positiv + genomisch
3	positiv	positiv + genomisch
4	positiv	positiv
5	positiv	negativ
6	positiv	positiv + genomisch
7	positiv	positiv + genomisch
8	positiv	positiv
9	positiv	negativ
10	positiv	positiv
11	positiv	positiv
12	positiv	positiv
13	positiv	negativ + genomisch
14	positiv	positiv + genomisch
15	positiv	negativ
16	positiv	negativ
17	positiv	negativ + genomisch
18	positiv	negativ + genomisch
19	positiv	negativ

Tabelle 4.13: Alternative Spleiß-Variante 12a: Ergebnisse der Gelelektrophorese (Teil 1)

Probe	Wildtyp 12-13	12a
20	positiv	negativ
21	positiv	negativ
22	positiv	positiv
23I	positiv	positiv + genomisch
23II	positiv	positiv
24	positiv	negativ
26	positiv	negativ
27	positiv	negativ
28	positiv	negativ
29	positiv	negativ
30	positiv	negativ
31	positiv	negativ
32	positiv	negativ
33	positiv	positiv
34	positiv	negativ
35	positiv	negativ
36	positiv	negativ
37	positiv	negativ
38	positiv	positiv
39	positiv	positiv
40	positiv	negativ

Tabelle 4.14: Alternative Spleiß-Variante 12a: Ergebnisse der Gelelektrophorese (Teil 2)

Entgegen der Erwartung wurden aus den untersuchten cDNA-Proben in den 12a-Ansätzen “nicht-spezifische“ Signale von genomischer DNA gefunden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Amplifikation des (deutlich größeren) genomischen Produkts deutlich weniger effizient abläuft als die des kurzen cDNA-Produkts, und dass daher die Anwesenheit genomischer DNA in der Probe den Nachweis des 12a-Transkripts nicht stört. Diese Vermutung wird dadurch, dass genomische Amplifikate fast ausschließlich zusammen mit 12a detektiert wurden, bestätigt. Auf eine Entfernung der gDNA durch DNase-Verdau vor der reversen Transkription wurde daher verzichtet.

Um die Identität der alternativen Spleiß-Variante 12a zu verifizieren, wurden einige Proben sequenziert (siehe Abb. 4.30). Die Identität der alternativen Spleiß-Variante 12a wurde damit bestätigt.

12a Nachweis	Anzahl absolut	Anzahl in%
positiv	17	42,5
negativ	23	57,5

Tabelle 4.15: Auftreten der alternativen Spleiß-Variante 12a in der Gelelektrophorese

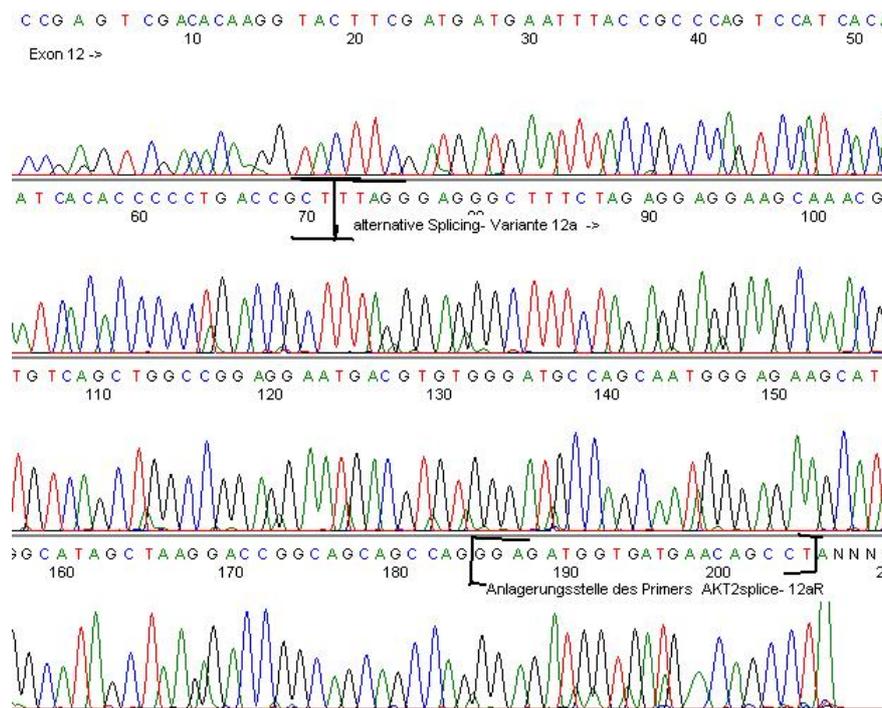


Abbildung 4.30: Ergebnis der 12a Sequenzanalyse

Die cDNA-Proben wurden zunächst der cDNA-PCR unterzogen, danach folgte die Gelelektrophorese, bei der das Vorhandensein von 12a verifiziert wurde. Zur Verifizierung wurden die entstandenen PCR-Fragmente nach Standardprotokoll (siehe Kapitel 3) sequenziert. Die Abbildung zeigt den Übergang zwischen Exon 12 und Exon 12a. Die Lage des AKT2splice-12aR-Primers wurde ebenfalls eingezeichnet.

4.2.2 Quantitative Analyse der alternativen Spleiß-Variante 12a in Tumorproben

Die Real-Time-PCR ermöglicht sowohl die Amplifikation als auch den Nachweis des PCR-Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß. Dabei wird die Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines jeden

PCR-Zyklus durchgeführt, was eine kontinuierliche Aufzeichnung der Produktbildung über die Zeit ermöglicht (Abschnitt: 3.16.1—“Prinzip der Real-Time-PCR”).

Es wurde das TaqMan©PCR-System verwendet und die Real-Time-PCR mit dem Gerät ABI-Prism 7000 Sequence Detection System und der SDS-Software durchgeführt. Bei jedem Analyselauf wurden sowohl das Housekeeping-Gen GAPDH als auch eine Verdünnungsreihe mit zuvor ermittelten bekannten Kopienzahlen der Wildtyp- und 12a-Transkripte, die in einem PCR 2.1.-Vektor vorlagen, gemessen. Die Messung von GAPDH ermöglichte somit eine Standardisierung der Proben untereinander, während die Konzentrationsreihe die absoluten vorliegenden Kopienzahlen berechenbar machte. Die Messung erfolgte für 50 PCR-Zyklen. Bei dieser Quantifizierung erfolgte die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) über die sog. $\Delta\Delta CP$ -Methode (Abschnitt: 3.16.4—“Auswertung der Real-Time-PCR”).

Es wurden insgesamt 31 Proben mit Hilfe der Real-Time-PCR quantitativ untersucht. Zunächst wurde die Kopienzahl der cDNA des gesamten Abschnittes zwischen Exon 12 und 13 bestimmt (siehe Abb. 4.31).

Wildtyp 12-13 Quantität

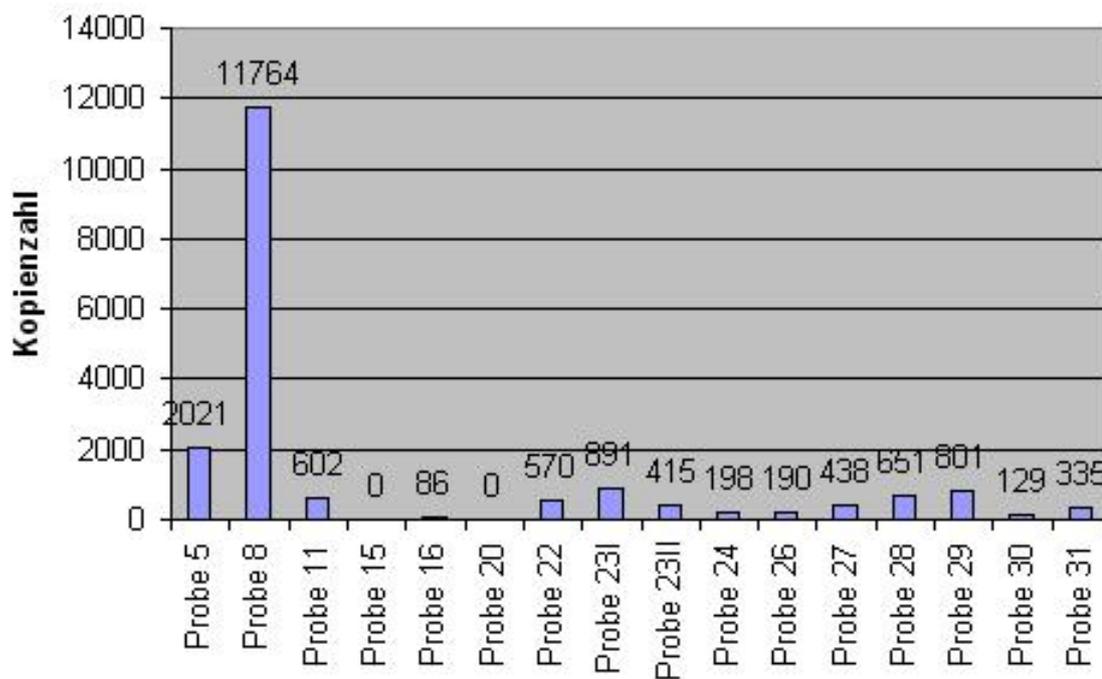


Abbildung 4.31: Ergebnis der 12-13 Gesamt-Kopienzahl-Bestimmung

Bei jedem Analyselauf wurden sowohl das Housekeeping-Gen GAPDH als auch eine Verdünnungsreihe mit zuvor ermittelten bekannten Konzentrationen eingesetzt. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) erfolgte über die $\Delta\Delta CP$ -Methode. Die Proben 15 und 20 lieferten in einer Doppelmessung kein verwertbares Ergebnis und werden hier mit der Zahl 0 aufgeführt.

In einem anderen PCR-Ansatz wurde exakt nur die cDNA-Menge der alternativen Spleiß-Variante 12a bestimmt. Das Balkendiagramm 4.32 zeigt das Ergebnis der quantitativen Bestimmung.

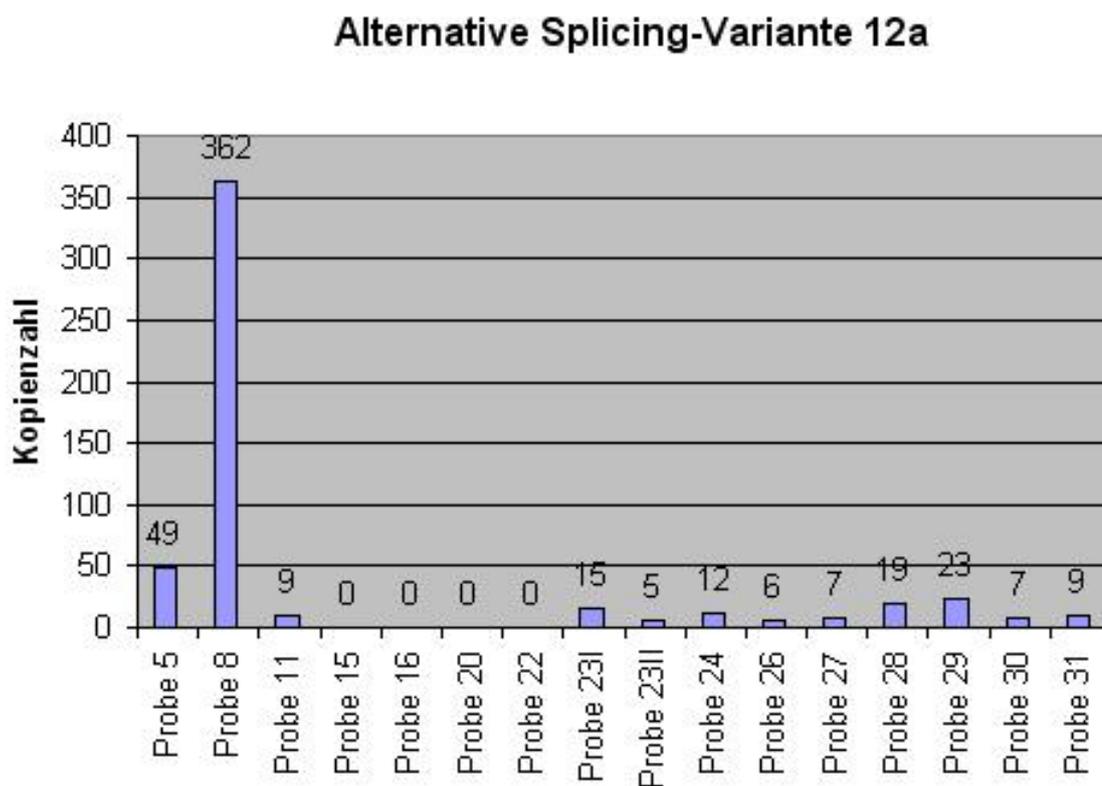


Abbildung 4.32: Ergebnis der 12a-Kopienzahl-Bestimmung

Bei jedem Analyselauf wurden sowohl das Housekeeping-Gen GAPDH als auch eine Verdünnungsreihe mit zuvor ermittelten bekannten Konzentrationen eingesetzt. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) erfolgte über die $\Delta\Delta CP$ -Methode. Die Proben 15, 16, 20 und 22 lieferten in einer Doppelmessung kein verwertbares Ergebnis und werden hier mit der Zahl 0 aufgeführt.

Da die Gesamt-Kopienzahl differiert, wurde zur besseren Aussagekraft das Verhältnis der alternativen Spleiß-Variante 12a zur Gesamtheit der AKT2/PKB β cDNA-Kopienzahl bestimmt (siehe Abb. 4.33):

$$\text{Verhältnis 12a zu 12-13 Gesamt [in \%]} = \frac{\text{Kopienzahl}_{12a}}{\text{Kopienzahl}_{12-13}} * 100$$

Die Analyse wurde um weitere 15 Proben ausgeweitet (siehe Abb. 4.34).

Verhältnis 12a/12-13

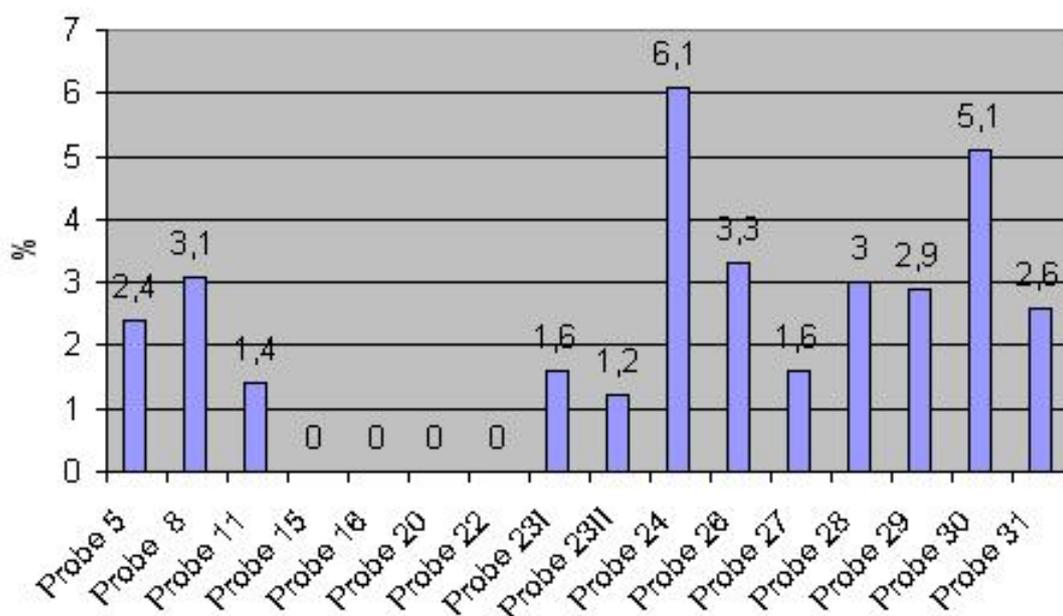


Abbildung 4.33: Verhältnis der 12a Kopienzahl zur Gesamt-AKT2/PKB β Kopienzahl in % (Teil 1)

Die vier "0"-Proben hatten bei den beiden quantitativen Bestimmungen (siehe Abb. 4.31 und 4.32) keine verwendbaren Ergebnisse geliefert.

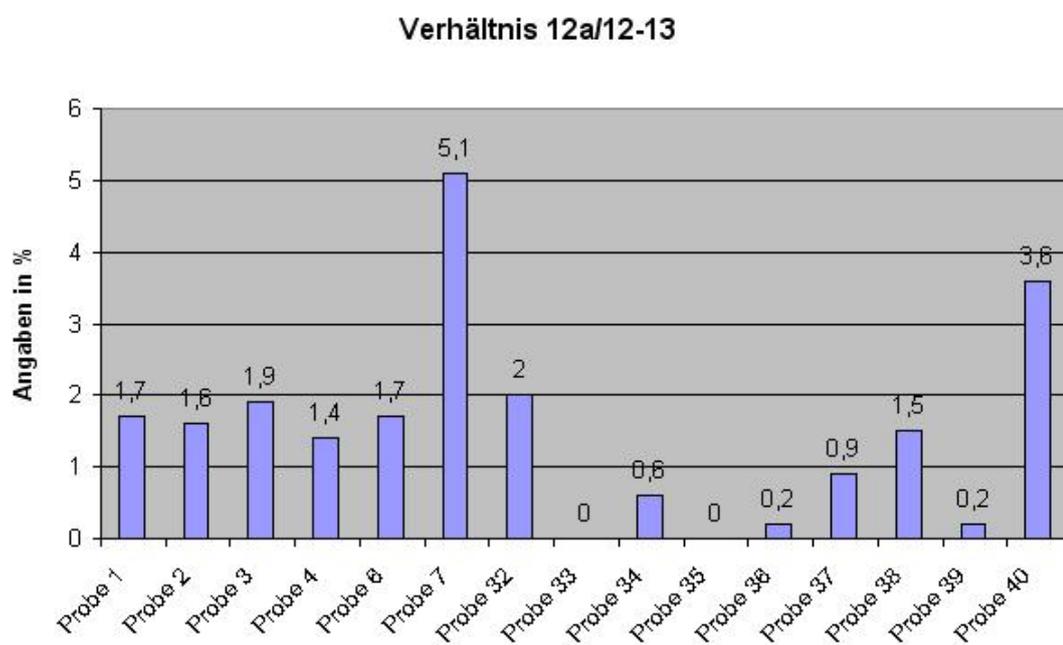


Abbildung 4.34: Verhältnis der 12a-Kopienzahl zur Gesamt-AKT2/PKB β Kopienzahl in % (Teil 2)

In der Tabelle 4.16 wird auf verschiedene Tumorenditäten eingegangen. Es wurde festgestellt, dass unabhängig vom Tumor die alternative Spleiß-Variante 12a ca. 2 bis 3% der Gesamt-AKT2/PKB β -RNA ausmacht.

Tumorart	Anzahl der Proben (gesamt)	Anzahl der Proben (verwendbar)	durchschnittliches prozentuale 12a-Vorkommen
unbekannter Tumor	2	2	1,9%
Colon CA	17	14	2,2%
Rectum CA	5	3	1,7%
Niere CA	7	6	2,9%
Tumoren gesamt	31	25	2,2%

Tabelle 4.16: 12a Vorkommen nach Tumorenditäten geordnet

Kapitel 5

Diskussion

Die Proteinkinase AKT2/PKB β nimmt in ihrer aktivierten Form als Bestandteil des PI(3)K/AKT-Signaltransduktionswegs, der durch Stimulation zahlreicher Wachstumsfaktorrezeptoren angeregt wird, eine zentrale Rolle als antiapoptotischer, proliferationsfördernder Signalvermittler ein. Die durch Phosphorylierung aktivierte Akt-Kinase phosphoryliert ihrerseits eine Vielzahl von Zielmolekülen, die unterschiedliche Funktionen wie Überleben und Proliferation, Stoffwechselprozesse, Zellgröße, Angiogenese und Resistenz gegenüber Sauerstoffmangel regeln. In Tumoren ist der PI(3)K/AKT-Weg häufig dereguliert und eine aberrante Aktivierung von AKT resultiert in der Blockade von Apoptose, Förderung der Proliferation, Neoangiogenese, einem in der Regel fortgeschrittenen und aggressiven Phänotyp sowie Resistenz gegenüber zytotoxischer Behandlung [73] [78].

5.1 Diskussion der Sequenzanalyse des AKT2/PKB β in Tumorproben

Die physiologische Funktion von AKT2/PKB β und die Ergebnisse früherer Untersuchungen legen eine Beteiligung dieser Proteinkinase an der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms nahe (Abschnitt: 2.4.3—“Bedeutung der Proteinkinase B”) [78]. Die Mutationsanalyse des AKT2/PKB β in 80 Tumorproben, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurde, zeigte jedoch keine Veränderungen. Es ist daher nicht davon auszugehen, dass AKT2/PKB β ein wichtiges Mutations-Target in Kolon-, Rektum-, Nieren- und Magenkarzinomen ist. Eine mögliche Erklärung für das komplette Fehlen der Mutationen des AKT2/PKB β in 80 untersuchten Tumoren könnte die geringe Mutationsrate sein, die eine größere Anzahl der Proben erfordern würde.

Die Suche nach AKT2/PKB β -Mutationen blieb in allen 80 untersuchten Proben erfolglos. Zwar ist das Kollektiv der 80 Proben durchaus repräsentativ, jedoch konnten eher seltene Mutationen, zu denen die in AKT2/PKB β -Gen zählen, bei dieser Anzahl nicht gefunden werden. Es ist nicht ausgeschlossen, dass bei einem weitaus umfangreicheren Probenkollektiv eine Mutationsrate des AKT2/PKB β -Gens, die sich im Bereich von wenigen Prozent bewegt, gefunden wird [78]. Eine weitere Forschungsrichtung wäre die Analyse des AKT2/PKB β -Gens in anderen Tumorarten. Jede Tumorart für sich ist genetisch gesehen heterogen, umso wahrscheinlicher ist es, dass verschiedene Tumorarten, die von unterschiedlichem enddifferenziertem Gewebe ausgehen, auch andere Mutationen aufweisen [5] [51] [68] [104] [42].

5.2 Diskussion der Erforschung der alternativen Spleiß-Variante 12a

Im Rahmen einer Klonierungsarbeit wurde ein Klon gefunden bei dem während des alternativen Spleißens der AKT2/PKB β -prä mRNA ein Teil des Introns zwischen dem Exon 12 und Exon 13 in die mRNA eingespleißt wurde. Das dabei entstandene Protein hätte demzufolge auch eine andere veränderte c-terminale Domäne, die oft regulatorische Funktionen erfüllt.

In der vorliegenden Arbeit wurde an einer 40 Karzinomproben großen Gruppe eine qualitative und quantitative Bestimmung der alternativen Spleiß-Variante 12a durchgeführt.

Nach vorliegenden Ergebnissen konnte die Existenz der Spleiß-Variante 12a mit Hilfe der Gelelektrophorese in 42,4% der Proben nachweisen werden.

Mit Hilfe der Real-Time-PCR wurde festgestellt, dass unabhängig von der Tumorentität die alternative Spleiß-Variante 12a in ca. 2 bis 3% der Gesamt-AKT2/PKB β gebildet wird. Das lässt den Schluss zu, dass das Vorkommen dieser alternativen Spleiß-Variante nicht spezifisch für kolorektale Karzinome ist. In Anbetracht dieser Ergebnislage stellt sich die Frage, wie präzise das Spleißosom die korrekte mRNA bildet. Anders gesprochen, wie viel Prozent der von einem korrekten Gen transkribierten mRNA sind einfach zufällig fehlerhaft und verfügen über keine physiologisch-biologische Funktion? Es ist einleuchtend, dass die Zelle versuchen wird, die mRNA-Synthese möglichst akkurat durchzuführen, um nicht "sinnlose" mRNAs oder Proteine zu syn-

thetisieren. Der sogenannte Nonsense-mediated mRNA decay ist ein System in der Zelle, welches dafür sorgt, dass fehlgespleißte Transkripte anhand zu früh auftretender Stopcodons identifiziert und eliminiert werden.

Es stellt sich die Frage, ob die Expressionsrate von 2 bis 3% der Gesamt-AKT2/PKB β mRNA eine biologische Rolle spielt oder ob es ein Zufallsprodukt von Fehlern des Spleißvorgangs ist. Bei einem Auftreten einer Spleißvariante von über einem Prozent wird vermutet, dass diese eventuell “absichtlich“ entsteht und kein zufälliges Ergebnis ist (Alberto Kornblihtt, persönliche Kommunikation) [102] [63].

Die Häufigkeit des Transkriptes 12a liegt mit ca. 2 bis 3% knapp über dieser “Erfahrungsgrenze“. Im Zusammenhang mit der Tatsache, dass die alternativ gespleißte AKT2/PKB β mRNA durchaus ein funktionelles wenn auch anders geregeltes Protein codieren könnte (Abschnitt: 4.2—“Analyse der alternative Spleiß-Variante 12a“). Es bleibt festzustellen, dass diese Spleißvariante durchaus eine biologische Rolle spielen könnte, entweder im normalen Zellhaushalt oder im Rahmen onkogener Entartung. Um dies zu klären, muss zunächst die Expression der Spleißvariante zum Protein nachgewiesen und danach die Regulation genau untersucht werden.

5.3 Resumé

Es wird angenommen, dass eine Mutation in dem AKT2/PKB β -Gen eine Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinasekaskade auslösen könnte. Mit der Erforschung der mutationsbedingten Aktivierung von Zell-Signal Wegen ist die Hoffnung verbunden, ein tieferes Verständnis der Pathogenese kolorektaler und anderer Karzinome zu erlangen, um präzisere Therapien entwickeln zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mutationsanalyse des Gens AKT2/PKB β auf genomischer und auf Ebene der mRNA durchgeführt. Unter den untersuchten 80 Tumoren wurde keine Mutation gefunden. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist ein Zusammenhang zwischen Mutationen im AKT2/PKB β -Gen und der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms nicht in der beschriebenen Häufigkeit bestätigt worden. Stattdessen wurde jedoch eine Spleißvariante von AKT2/PKB β gefunden, die aufgrund der Ergebnislage durchaus eine onkogene Rolle spielen kann. Dafür erscheint das tiefere Verständnis der funktionellen Zusammenhänge zwischen Bildung und Aktivierung von AKT2/PKB β und der Entstehung von Karzinomen weiterhin ein wertvolles Ziel der Krebsforschung zu bleiben.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABI	Applied Biosystems GmbH
AS	Aminosäure(n)
ascen.	ascendens
BMI	body mass index
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	Komplementäre DNA
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CA	Karzinom
CP-Wert	Crossing Point-Wert
CT-Wert	Threshold Cycle = "Schwellenwert-Zyklus"-Wert
desc.	descendens
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
ddNTP	2',3'-Dideoxy-Nukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii: und weitere
FAP	familiäre adenomatöse Polypose Syndrom
FRET	Fluoreszenz- (oder Förster-) Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²
G	Guanin
GFC	Gelfiltrations-Chromatographie
GPC	Gelpermeations-Chromatographie
h	Stunde
HKG	Housekeeping Gen
HNPCC	nichtpolypöses kolorektales Karzinomsyndrom

k	Kilo
m	Milli
m	männlich
M.	Morbus
M	molar
min	Minute
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MSI	micro satellite instability
μ	Mikro
neg.	negativ
p	piko
p	Signifikanzniveau
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI	Phosphatidyl-inositol
PI(3)K	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
PIK3CA	katalytische Untereinheit von PI(3)K
PIP	Phosphatidyl-Inositol-phosphat
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphate
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
pos.	positiv
RTK	Receptor-Tyrosin-Kinase
Rn-Wert	normalized reporter-Wert
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Reverse Transkription
SDS	Sequence Detektion System
SEC	Size Exclusion Chromatography
STKs	Serin/Threonin-Kinasen
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
trans.	transversum
U	Unit
u. a.	unter anderem

V	Volt
vgl.	vergleiche
W	Watt
w	weiblich
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

2.1	Diagramm der Krebsverteilung aus dem Jahr 2002 [10]	6
2.2	Diagramm der Krebstodesursachen aus dem Jahr 2002 [10] . .	7
2.3	Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität für Darmkrebs in Deutschland 1970 bis 2002 [10]	8
2.4	Schätzung der altersspezifischen Inzidenz in Deutschland 2002 für Darmkrebs [10]	9
2.5	Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität für Magenkrebs in Deutschland 1970 bis 2002 [10]	11
2.6	Altersstandardisierte Inzidenz und Mortalität für Nierenkrebs in Deutschland 1970 bis 2002 [10]	12
2.7	Zeitliche Entwicklung von einem Adenom zum Karzinom . . .	21
2.8	Schematische Repräsentation von PKB/AKT [20].	23
2.9	Dreidimensionale Struktur von AKT2/PKB β [37]	24
2.10	Intrazelluläre Signaltransduktion des PI(3)K-Wegs am Bei- spiel der Insel-1 Zellen [50]	25
2.11	Die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI(3)K) Signalkaska- de [78]	26
2.12	Umwandlung von PIP2 in PIP3 [48]	27
3.1	Prinzip der Polymerasekettenreaktion [74]	41
3.2	Prinzip der DNA-Sequenzierung [74]	49
3.3	Grundprinzip der TaqMan©Real-Time-PCR [74]	57
3.4	Exemplarische Darstellung der Ergebnisse einer Real-Time- PCR	60
4.1	Exemplarisches Ergebnis für Exon 1 von AKT2/PKB β	67
4.2	Exemplarisches Ergebnis für Exon 2 von AKT2/PKB β	68
4.3	Exemplarisches Ergebnis für Exon 3 von AKT2/PKB β	69
4.4	Exemplarisches Ergebnis für Exon 4 von AKT2/PKB β	70
4.5	Exemplarisches Ergebnis für Exon 5 von AKT2/PKB β	71
4.6	Exemplarisches Ergebnis für Exon 6 von AKT2/PKB β	72
4.7	Exemplarisches Ergebnis für Exon 7 von AKT2/PKB β	73

4.8	Exemplarisches Ergebnis für Exon 8 von AKT2/PKB β	74
4.9	Exemplarische Gelelektrophorese von Exon 9/10 von AKT2/PKB β	75
4.10	Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Exon 9/10 von AKT2/PKB β (Teil 1)	76
4.11	Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Exon 9/10 von AKT2/PKB β (Teil 2)	77
4.12	Exemplarisches Ergebnis für Exon 11 und 12 von AKT2/PKB β	78
4.13	Exemplarisches Ergebnis für Exon 13 von AKT2/PKB β	79
4.14	Exemplarisches Gelelektrophorese-Ergebnis des Abschnitts A der cDNA von AKT2/PKB β	84
4.15	Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitt A der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 1)	85
4.16	Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitt A der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 2)	86
4.17	Exemplarisches Gelelektrophorese-Ergebnis des Abschnitts B der cDNA von AKT2/PKB β	87
4.18	Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitt B der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 1)	88
4.19	Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitt B der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 2)	89
4.20	Exemplarische Gelelektrophorese-Ergebnis des Abschnitts B2 der cDNA von AKT2/PKB β	90
4.21	Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitt B2 der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 1)	91
4.22	Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitt B2 der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 2)	92
4.23	Sequenzierungsergebnis für Abschnitt B (nur B2-Primer)	93
4.24	Kombination aus B1- und B2-Primern: Sequenzierungsergeb- nis für Abschnitt B	94
4.25	Exemplarisches Gelelektrophorese-Ergebnis des Abschnitts C der cDNA von AKT2/PKB β	95
4.26	Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitts C der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 1)	96
4.27	Exemplarisches Sequenzierungsergebnis für Abschnitts C der cDNA von AKT2/PKB β (Teil 2)	97
4.28	Schematische Erläuterung der Analyse-Strategie	101
4.29	Exemplarische Gelelektrophorese der alternativen Spleiß-Variante 12a und des Wildtyps 12-13	102
4.30	Ergebnis der 12a Sequenzanalyse	105
4.31	Ergebnis der 12-13 Gesamt-Kopienzahl-Bestimmung	107

4.32	Ergebnis der 12a-Kopienzahl-Bestimmung	108
4.33	Verhältnis der 12a Kopienzahl zur Gesamt-AKT2/PKB β Ko- pienzahl in % (Teil 1)	109
4.34	Verhältnis der 12a-Kopienzahl zur Gesamt-AKT2/PKB β Ko- pienzahl in % (Teil 2)	110

Tabellenverzeichnis

2.1	Tumorstadieneinteilung nach verschiedenen Klassifikationen	18
3.1	Geräte und Einwegmaterialien (Teil 1)	30
3.2	Geräte und Einwegmaterialien (Teil 2)	31
3.3	Allgemeine Chemikalien	32
3.4	Fertige Reagenzien-Sets	33
3.5	DNA-Längenstandards	33
3.6	fluorogene Sonden	34
3.7	Primer für die genomische DNA (Teil 1)	34
3.8	Primer für die genomische DNA (Teil 2)	35
3.9	Primer für die Reverse Transkription	35
3.10	Primer für die cDNA	36
3.11	Primer für die alternative Spleiß-Variante 12a	37
3.12	Probenauftragungspuffer	37
3.13	Invitrogen-Puffer A/B/C/D	38
3.14	M-MLV RT 5X Reaktions-Puffer	38
3.15	Vorversuch	39
3.16	Standard-PCR-Pipettierschema 50 μ l Ansatz (Angaben in μ l)	42
3.17	Standard-PCR-Pipettierschema 30 μ l Ansatz (Angaben in μ l)	43
3.18	Standard-PCR-Programm	43
3.19	Sequenzierungs-PCR-Pipettierschema (Angaben in μ l)	47
3.20	Sequenzierungs-PCR-Programm	47
3.21	Pipettierschema der Reversen Transkription (Teil 1)	53
3.22	Pipettierschema der Reversen Transkription (Teil 2)	54
3.23	cDNA-PCR-Pipettierschema 50 μ l Ansatz (Angaben in μ l)	55
3.24	cDNA-PCR-Pipettierschema 30 μ l Ansatz (Angaben in μ l)	56
3.25	cDNA-PCR-Programm	56
3.26	Real-Time-PCR-Pipettierschema	58
3.27	Real-Time-PCR-Programm	59
4.1	Patientendaten der genomischen DNA-Bank (Teil 1)	63
4.2	Patientendaten der genomischen DNA-Bank (Teil 2)	64

4.3	Patientenalter bei der Diagnose (in Jahren)	64
4.4	Diagnosen des Patientenkollektivs aus der Datenbank der genomischen DNA	64
4.5	Übersicht über die Exon-Verteilung mit Hilfe der cDNA-Sequenz	65
4.6	Exonlängen	66
4.7	Patientendaten der cDNA-Bank (Teil 1)	81
4.8	Patientendaten der cDNA-Bank (Teil 2)	82
4.9	Diagnosen des Patientenkollektivs aus der cDNA-Datenbank .	82
4.10	cDNA-Sequenz des AKT2/PKB β	83
4.11	Abschnitt-Längen	83
4.12	Überblick über die Sequenz der Spleiß-Variante 12a in der genomischen DNA	100
4.13	Alternative Spleiß-Variante 12a: Ergebnisse der Gelelektrophorese (Teil 1)	103
4.14	Alternative Spleiß-Variante 12a: Ergebnisse der Gelelektrophorese (Teil 2)	104
4.15	Auftreten der alternativen Spleiß-Variante 12a in der Gelelektrophorese	105
4.16	12a Vorkommen nach Tumorenditäten geordnet	111

Literaturverzeichnis

- [1] AL, Greenlee R.: Cancer statistics 2000. In: *CA Cancer J Clin* 50(1), 7-33 (2000)
- [2] AL., Kalnina et: Splicing. In: *Genes Chrom Canc* 42:342-357 (2005)
- [3] AL, La Rosa F.: Descriptive epidemiology of malignant tumors of the colon and rectum [Article in Italian]. In: *Ann Ig* 1(5), 899-922 (1989)
- [4] AL., Vanables et: Splice. In: *Cancer Research* 64:7647 (2005)
- [5] BAISSE, Bouzourene H. Saraga E.P. Bosman F.T. Benhattar J. B.: Intratumor genetic heterogeneity in advanced human colorectal adenocarcinoma. In: *Int J Cancer*, 93(3): 346-352 (2001)
- [6] BARDELLI, A. et a.: Mutational analysis of the tyrosine kinase in colorectal cancers. In: *Science* 300, 949 (2003)
- [7] BECKER, J. N.Wahrendorf: Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland. In: *Springer-Verlag, Heidelberg* (1998)
- [8] BEHNKE, A. et a.: Reproductive compatibility and rDNA sequence analysis in the Sellaphora *Pupula* Species complex. In: *Journal of Phycology* 40 (1), 193-208 (2004)
- [9] BERGSMA-KADIJK, van 't Veer P. Kampman E. Burema J. J.A.: Calcium does not protect against colorectal neoplasia. In: *Epidemiology*, 7(6): 590-597 (1996)
- [10] BERTZ, Giersiepen K. et a. J.: Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. In: *Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken* (2006)
- [11] BERTZ, Kaatsch P. Schön D. et a. J.: Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends, 4 Ausgabe. In: *Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland/ Robert Koch Institut; . p.28-31* (2004)

- [12] BLUME-JENSEN, Hunter T. P.: Oncogenic kinase signalling. In: *Nature* 411, 355–365 (2001)
- [13] BONITHON-KOPP C., Benhamiche A.: Are there several colorectal cancers? Epidemiological data. In: *Eur J Cancer Prev* 9 Suppl1, S3-12 (1999)
- [14] BOOM, J. van d.: Molekulare Grundlagen der malignen Progression von Gliomen. In: *Inaugural- Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf* (2004)
- [15] BOYLE, D.G. Zaridze M. S. P.: Descriptive epidemiology of colorectal cancer. In: *Int.J.Cancer*, 36:9-18 (1985)
- [16] CANTLEY L.C., Carpenter C. Duckworth B. Graziani A. Kapeller R. Soltoff S. Auger K.R. K. Auger K.R.: Oncogenes and signal transduction. In: *Cell* 64: 281–302 (1991)
- [17] CARROLL, K.K.: Dietary fats and cancer. In: *Am J Clin Nutr*, 53, 1064S-1067S (1991)
- [18] CHEN J.T., Cheng Y.W. Lee H. Ho W.L. W. Ho W.L.: Detection of p53 mutations in sputum smears precedes diagnosis of non-small cell lung carcinoma. In: *Anticancer Res* 20: 2687-2690 (2000)
- [19] CHIRGWIN, J.M. et a.: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. In: *Biochemistry* 18, 5294-5299 (1979)
- [20] COFFER P.J., Woodgett J. Jin J. J. Jin J.: Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. In: *Biochem. J.* 335:1 -13 (1998)
- [21] DAVIES, H. et a.: Mutations of the BRAF gene in human cancer. In: *Nature* 417, 949–954 (2002)
- [22] DENOIX, D. P.F. S. P.F. Schwartz: [General rules for classification of cancers and presentation of the therapeutic results]. In: *Mem Acad Chir (Paris)*, 85(15-16): 415-424 (1959)
- [23] DIEGISSER, T. et a.: Genetic and morphological differentiation in *Tephritisbardanae*. In: *Journal of Evolutionary Biology* 17 (1), 83-89 (2004)

- [24] DUTTA, Hammons K. Willibey B. Haney M. P.K.: Chromotography. In: *J. Chromatogr.* 536, 113-121 (1991)
- [25] E-L, Winnacker: From Genes to Clones. In: *VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim*, pp. 85-88 (1987)
- [26] EASTWOOD, M.A.: The physiological effect of dietary fiber: an update. In: *Annu Rev Nutr*, 12, 19-35 (1992)
- [27] EIDE, T.J.: Risk of colorectal cancer in adenoma-bearing individuals within a defined population. In: *Int J Cancer*, 38(2): 173-176 (1986)
- [28] FEARON, B. E.R. V. E.R. Vogelstein: A genetic model for colorectal tumorigenesis. In: *Cell*, 61(5): 759-767 (1990)
- [29] FIELDING, Arsenault P.A. Chapuis P.H. et a. L.P.: Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). In: *J Gastroenterol Hepatol*, 6(4): 325-344. (1991)
- [30] FLOOD, Weiss N.S. Cook L.S. Emerson J.C. Schwartz S.M. Potter J. D.M.: Colorectal cancer incidence in Asian migrants to the United States and their descendants. In: *Cancer Causes Control*, 11(5): 403-411 (2000)
- [31] F.P., Perera: Molecular epidemiology: Insights into cancer susceptibility, risk assessment and prevention. In: *J Natl Cancer Institute* 88(8), 496-509 (1996)
- [32] FUTREAL, P. A. et a.: Somatic mutations in human cancer: insights from resequencing the protein kinase gene family. In: *Nature Rev. Cancer* 4, 177-183 (2004)
- [33] GIOVANNUCCI, Rimm E.B. Stampfer M.J. Colditz G.A. Ascherio A. Willett W. E.: Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. In: *Cancer Res*, 54(9): 2390-2397 (1994)
- [34] GIOVANNUCCI, Stampfer M.J. Colditz G.A. et a. E.: Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study. In: *Ann Intern Med*, 129(7): 517-524 (1998)
- [35] GREENBERG, Baron J.A. Tosteson T.D. et a. E.R.: A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. Polyp Prevention Study Group. In: *N Engl J Med*, 331(3): 141-147 (1994)

- [36] HAN, J.H. et a.: Isolation of full-length putative rat lysophospholipase cDNA using improved methods for mRNA isolation and cDNA cloning. In: *Biochemistry* 26, 1617-1625 (1987)
- [37] HAUGE, Antal T.L. Hirschberg D. Doehn U. Thorup K. Idrissova L. Hansen K. Jensen O.N. Jorgensen T.J. Biondi R.M. Frödin M. C.: Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation. In: *The EMBO Journal*, 1-11 2007 European Molecular Biology Organization 0261-4189/07 www.embojournal.org (2007)
- [38] HEINIMANN, K.: Molekulargenetische Diagnostik bei HNPCC (Hereditäres Kolorektal- Karzinom ohne generalisierte Polypose. In: *Schweizerische Ärztezeitung Nr. 36, Seiten 2009-2012* (2000)
- [39] HODGES, Bernstein S. D.: Genetic and biochemical analysis of alternative RNA splicing. In: *Adv.Genet.31, 207-281* (1994)
- [40] HOGEZAND, Eichhorn R.F. Choudry A. Veenendaal R.A. Lamers C. R.A.: Malignancies in inflammatory bowel disease: fact or fiction? In: *Scand J Gastroenterol Suppl, 236: 48-53* (2002)
- [41] HOLLAND, Abramson R.D. Watson R. Gelfand D. P.M.: Detection of specific polymerase chain reaktion product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. In: *National Academy of Science, USA 88, 7276-7280* (1991)
- [42] HORI, Miyake S. Akiyama Y. Endo M. Yuasa Y. H.: Clonal heterogeneity in human esophageal squamous cell carcinomas on DNA analysis. In: *Jpn J Cancer Res, 87(9): 923-929. 67* (1996)
- [43] HOWE, Aronson K.J. Benito E. et a. G.R.: The relationship between dietary fat intake and risk of colorectal cancer: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. In: *Cancer Causes Control, 8(2): 215-228* (1997)
- [44] HSING, McLaughlin J.K. Chow W.H. et a. A.W.: Risk factors for colorectal cancer in a prospective study among U.S. white men. In: *Int J Cancer, 77(4): 549-553* (1998)
- [45] HWANG D., Rhee S.: Receptor-mediated signaling pathways: potential targets of modulation by dietary fatty acids. In: *Am J Clin Nutr 70, 545-556* (1999)

- [46] INNIS, Myambo K.B. Gelfand D.H. Brow M. M.A.: DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction- amplified DNA. In: *National Academy of Science, USA 85, 9436-9440* (1988)
- [47] JATZKO, Herbst F. Hauser H. et a. G.: Consensusbericht kolorektales Karzinom. In: *ACO-Manual* (1995)
- [48] KARAKAS, Bachman K.E. Park B. B.: Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. In: *British Journal of Cancer advance online publication, 31 January 2006; doi:10.1038/sj.bjc.6602970* (2006)
- [49] KATSO R., Ahmadi K. White S. Timms J. Waterfield M. Okkenhaug K. K. Okkenhaug K.: Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, immunity, homeostasis, and cancer. In: *Annu Rev Cell Dev Biol 17: 615-675* (2001)
- [50] K.I.P., Trümper: Die differentielle Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase und der Proteinkinase B/Akt durch Insulin, IGF-1 und Glucagon-like-peptide-1 in der b-Zell-Linie INS-1. In: *Dissertation, Philipps-Universität Marburg* (2002)
- [51] KONISHI, Hiasa Y. Matsuda H. et a. N.: Intratumor cellular heterogeneity and alterations in ras oncogene and p53 tumor suppressor gene in human prostate carcinoma. In: *Am J Pathol, 147(4): 1112-1122* (1995)
- [52] KOZMA S.C., Thomas G.: Regulation of cell size in growth, development and human disease: PI3K, PKB and S6K. In: *Bioessays 24: 65-71* (2002)
- [53] KUNE, Kune G.A. Watson L. S.: Case-control study of dietary etiological factors: the Melbourne Colorectal Cancer Study. In: *Nutr Cancer, 9, 21-42* (1987)
- [54] LAMOND, A.I.: Nuclear RNA processing. In: *Curr. Opin. Cell Biology 3, 493-501* (1991)
- [55] LAWYER, Stoffel S. Saiki R.K. Myambo K.B. Drummond R. Gelfand D. F.C.: Isolation, characterization, and expression in *E. coli* of the DNA polymerase gene from the extreme thermophile, *Thermus aquaticus*. In: *Journal of Biological Chemistry 264, 6427-6437* (1989)
- [56] LEE, C. R. Connell W. B. L.G.: Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. In: *Nucleic Acids Res. 21: 3761-3766* (1993)

- [57] LEEVERS S.J., Waterfield M. Vanhaesebroeck B. B. Vanhaesebroeck B.: Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. In: *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:219-225 (1999)
- [58] LEWIN, B.: Driving the cell cycle: M phase, its partners and substates. In: *Cell* 61, 743-752 (1990)
- [59] LIVAK, Schmittgen T. K.J.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2exp-delta delta C(T) Method. In: *Methods.*, 25(4): 402-408 (2001)
- [60] LOCKE, H. J. F.B. King K. F.B. King: Cancer mortality risk among Japanese in the United States. In: *Natl Cancer Inst.*, 65(5): 1149-1156. (1980)
- [61] MA Y.Y., Lin Y.C. Lung J.C. Chang T.C. Whang-Peng J. Liu J.M. Yang D.M. Yang W.K. Shen C. Wei S.J. S. Wei S.J.: PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. In: *Oncogene* 19: 2739-2744 (2000)
- [62] MARQUARDT, H.: multi hit model, Lehrbuch der Toxikologie von H. Marquardt und S. G. Schäfer (Editors). In: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart* (2003)
- [63] MATA M, Kornblihtt A. I.: RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. In: *Nat Struct Mol Biol* 2006 Nov;13(11):973-80, PMID: 17028590 (2006)
- [64] MAXAM, W. A. G. A. Gilbert: A new method of sequencing DNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences Bd. 74, S. 560-564. PMID 265521 PDF* (1977)
- [65] METTLIN, C.: Recent developments in colorectal cancer epidemiology and early detection. In: *Curr. Opin. Oncol.* 2:731-37 (1990)
- [66] MIGOZUCHI M., Mohapatra G. Louis D. Nutt C.L. C. Nutt C.L.: Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. In: *Brain Pathol* 14: 372-377 (2004)
- [67] MILLER, L.A. Gloeckler W.F. H. B.A.: Cancer Statistics Review 1973-1989. In: *US Department of Health and Human Services: Bethesda, MD* (1992)
- [68] MIRCHANDANI, Zheng J. Miller G.J. et al. D.: Heterogeneity in intratumor distribution of p53 mutations in human prostate cancer. In: *Am J Pathol*, 147(1): 92-101 (1995)

- [69] MORI, Barth H. G. S.: Size Exclusion Chromatography. In: *Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg* (1999)
- [70] MULLER, R. A. F. A. Fishel: Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). In: *Cancer Invest;* 20(1): 102-109 (2002)
- [71] MULLIS, Faloona F. K.B.: Specificsynthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. In: *Methods in Enzymology 155, 335-350* (1987)
- [72] NEUFANG, Pfreunds Schuh M. M.G.: Identifizierung differentiell exprimierter mRNA aus einzelnen Hodgkin/Reed-Sternberg Zellen. (2003)
- [73] OPALKA, Schütt P. B.: Ein neuer Akt in der Tumorthherapie? Inhibition des PI3K/Akt-Kinasewegs als neue Therapieoption bei Tumorerkrankungen. In: *Tumordiagn u Ther ; 26: 105-112 DOI: 10.1055/s-2005-858178* (2005)
- [74] OSPRIAN, I. 4. S.: Labordiagnostik in der Molekularbiologie Bakka-laureat Biomedizinische Informatik. In: *Institut für biomedizinische Signalverarbeitung und Bildgebung, SS 06* (2006)
- [75] P., Nowell: The clonal evolution of tumor cell populations. In: *Science 194, 23-28* (1976)
- [76] PARKER P.J., Foulkes J.G. e. Couhen P. P. Couhen P.: The hormaonal control of Gene transcription. In: Molecular aspects of cellular regulation. In: *Vol. 6, 77-98, Elsevier, Amsterdam* (1991)
- [77] PARKIN, Pisani P Ferlay J. D.M.: Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. In: *Int J Cancer, 80(6): 827-841* (1999)
- [78] PARSONS, Wang T.L. Samuels Y. Bardelli A. Cummins J.M. DeLong-L. Silliman N. Ptak J. Szabo S. Willson J.K.V. Markowitz S. Kinzler K.W. Vogelstein B. Lengauer C Velculescu V. D.W.: Colorectalcancer: Mutations in a signalling pathway. In: *Nature 11 August, Vol 436* (2005)
- [79] PEDRERO J.M.G., Pinto C.M. Zapatero A.H. Rodrigo J.P. Nieto C.S. Gonzales M. Carracedo D.G. D. Carracedo D.G.: Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Int J Cancer 114: 242-248* (2005)

- [80] PERRY, R.P. et a.: On the lability of poly (A) sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes. In: *Biochem. Biophys. Acta* 262, 220-226 (1972)
- [81] PFAFFL, Hageleit M. M.W.: Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT PCR. In: *Biotechnology Letters*, 23: 275-282 (2001)
- [82] PFAFFL, M.W.: Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. In: *BIOspektrum*, 1/04, 10. Jahrgang (2004)
- [83] POTTER, Slattery M.L. Bostick R. J.D. ; GAPSTUR, S.M.: Colon cancer: a review of the epidemiology. In: *Epidemiol Rev*, 15(2): 499-545. (1993)
- [84] PREISS, Dornhoff W. Hagmann F.G. Schmieder A. J.C.: Empfehlungen zur Therapie, 11 Edition: Onkologische Arbeitsgemeinschaft Saarpfalz-Mosel-E.V. In: *Onkologie* 2002/03, p.312-314 (2002)
- [85] PROFESSOR WOLFGANG SCHEPPACH, Universitätsklinikum W.: Genocult-Test. In: <http://www.aerztezeitung.de/docs/2002/10/23/191a1101.asp> (2007)
- [86] RASMUSSEN, R.: Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, Nakagawara, K, eds. Rapid Cycle Realtime PCR, Methods and Applications. In: *Springer Press, Heidelberg; ISBN 3-540-66736-9, 21-34* (2001)
- [87] REDDY, S. B.S. S. B.S. Sugie: Effect of different levels of omega-3 and omega-6 fatty acids on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. In: *Cancer Res*, 48, 6642-7. (1988)
- [88] ROTH, M.J. et a.: Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in Escherichia coli. In: *J. Biol. Chem.* 260, 9326-9335 (1985)
- [89] RUF, Fahrtmann E.H. Engelhardt R. et a. G.: Leitlinien zum kolorektalen Karzinom. In: *Tumorzentrum Freiburg* (2000)
- [90] RUSSO, Franceschi S. La Vecchia C. et a. A.: Body size and colorectal-cancer risk. In: *Int J Cancer*, 78(2): 161-165 (1998)
- [91] RYCHLIK, Spencer W.J. Rhoads R. W.: Optimisation of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. In: *Nucleic Acid Research* 18, 6409-6412 (1990)

- [92] SAIKI, Gelfand D.H. Stoffel S. R.K.: Primer- directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science* (1988)
- [93] SAMBROOK, Fritsch E.F. Maniatis T. J.: Molecular cloning: A Laboratory Manual. In: *cold Spring Harbor Laboratory, New York, 8.64.* (1989)
- [94] SAMUELS Y., Bardelli A. Silliman N. Ptak J. Szabo S. Yan H. Gazdar A. Powell S.M. Riggins G. Wang Z. Z. Wang Z.: High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. In: *Science 304: 554* (2004)
- [95] SAMUELS Y., Schmidt-Kittler O. Cummins J.M. DeLong L. Cheong I. Rago C. Huso D.L. Lengauer C. Diaz J. J. Diaz J.: Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. In: *Cancer Cell 7: 561–57* (2005)
- [96] SANGER, Nicklen S. Coulson-A.R. F.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences. Bd. 74, S. 5463-5467. PMID 271968 PDF* (1977)
- [97] SCHMOLL H.J., Possinger K. Höffken K. K. Höffken K.: Kompendium Internistische Onkologie. In: *Springer Verlag* (1999)
- [98] SHAYESTEH L., Kuo W.L. Baldocchi R. Godfrey T. Collins C. Pinkel D. Powell B. Mills G.B. Gray J. Lu Y. Y. Lu Y.: PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. In: *Nat Genet 21: 99–102* (1999)
- [99] SLATTERY, Sorenson A.W. Ford M. M.L.: Dietary calcium intake as a mitigating factor in colon cancer. In: *Am J Epidemiol, 128(3): 504-514* (1988)
- [100] SLATTERY, Sorenson A.W. Mahoney A.W. French T.K. Kritchevsky D. Street J. M.L.: Diet and colon cancer: assessment of risk by fiber type and food source. In: *J Natl Cancer Inst, 80(18): 1474-1480* (1988)
- [101] SLATTERY M.L., Smith K.R. West D.W. Abd-Elghany N. Schumacher M.C. M. Schumacher M.C.: Physical activity, diet and risk of colon cancer in Utah. In: *Am J Epidemiol 128: 989-999* (1988)
- [102] SREBROW A, Kornblihtt A.: The connection between splicing and cancer. In: *J Cell Sci. 2006 Jul 1;119(Pt 13):2635-41, PMID: 16787944* (2006)

- [103] STIFTUNG, Felix B.: STAGING und GRADING. In: *www.darmkrebs.de* (2007)
- [104] SZOLLOSI, Balazs M. Feuerstein B.G. Benz C.C. Waldman-F.M. J.: ERBB-2(HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. In: *Cancer Res*, 55(22): 5400-5407 (1995)
- [105] T., Hunter: Cooperation between oncogenes. In: *Cell* 64(2), 249-270 (1991)
- [106] TORIBARA N.W., Sleisenger M.: Screening for colorectal cancer. In: *N Engl J Medicine* 332(13), 861-867 (1995)
- [107] TROCK, Lanza E. Greenwald P. B.: Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. In: *J Natl Cancer Inst*, 82(8): 650-661 (1990)
- [108] TYAGI, F. R. K. S.: Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. In: *Nat. Biotechnol.* 14: 303-308 (1996)
- [109] VARMUS H., Weinberg R.: Genes and the biology of cancer. In: *Scientific American Library, New York* (1993)
- [110] VCH, Ibelgaufts H.: Polymerase Chain Reaction. Gentechnologie von A-Z. In: *Verlagsgesellschaft, Weinheim, S. 380* (1990)
- [111] VIVANCO, Sawyers C. L. I.: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. In: *Nature Rev. Cancer* 2, 489-501 (2002)
- [112] VOGELSTEIN, B. et a.: Preparative and analytical purification of DNA from agarose. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 76, (2) 615-619 (1979)
- [113] VOGELSTEIN, Fearon E.R. Hamilton S.R. Kern S.E. Preisinger-A.C. Leppert M. Nakamura Y. White R. Smits A.M. Bos J.L. N Engl J M. B.: Genetic alterations during colorectal-tumor development. In: *Sep 1;319(9):525-32. PMID 2841597* (1988)
- [114] VOGELSTEIN, Lane D. Levine A. J. B.: Surfing the p53 network. In: *Nature*, 408: 307-310 (2000)
- [115] VOLINIA S., Ormondroyd E. Nizetic D. Antonacci R. Rocchi M. Waterfield M. Hiles I. I. Hiles I.: Molecular cloning, cDNA sequence, and chromosomal localization of the human phosphatidylinositol 3-kinase p110alpha (PIK3CA). In: *Gene. Genomics* 24: 472-477 (1994)

- [116] WANG, T. L. et a.: Digital karyotyping. In: *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 16156–16161 (2002)
- [117] WEINBERG, R.A.: wie Krebs entsteht. In: *Spektrum Spezial* 5, 7-15 Heidelberg (1996)
- [118] WELLS, Abo A. Ridley A. J. J. C. M. M. C. M.: PAK4 is activated via PI3K in HGF-stimulated epithelial cells. In: *Cell Sci.* 115, 3947–3956 (2002)
- [119] WYNDER, Reddy B.S. Weisburger J. E.L.: Environmental dietary factors in colorectal cancer. Some unresolved issues. In: *Cancer*, 70 (5 Suppl): 1222-1228 (1992)

Anhang A

Danksagung

Für die Überlassung der Themas und die vorbildliche Betreuung der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Stefan Zeuzem meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Herrn Dr. Guido Plotz, der jederzeit unkompliziert und hilfsbereit für jedes Problem stets eine Lösung hatte, danke ich für die aufwendige Einarbeitung in die Methodik, für die Bemühungen, mir in Praxis und Theorie Hilfe zu geben, für die Vorkorrektur vieler Kapitel sowie für die gesamte Betreuung der Arbeit. Ferner danke ich Herrn PD. Dr. Dr. Albrecht Piiper für seine wichtige Unterstützung, seine wertvollen Anregungen und seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie allen Mitarbeitern des Labors der Inneren II für die ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft. Insbesondere danke ich Marc Wormek, der mir geduldig das "handwerkliche Arbeiten" im Labor beibrachte. Herrn Michael Winkfein danke ich herzlich für die gute kooperative Zusammenarbeit, für die Unterstützung auf geistigem und fachlichem Wege und die offene Bereitschaft, bei vielen Problemen mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Besonders dankbar bin ich meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Großmutter fürs Mutmachen und für die tatkräftige Unterstützung bei diesem und vielen anderen Projekten. Carolin Pfeiffer danke ich für die akribische Korrektur dieser Arbeit.

Uwe Groß danke ich, neben vielem anderen, für das Verständnis, die Geduld, die Herzlichkeit und seine Fähigkeit, die schönsten Dinge des Lebens, die oft durch die Alltäglichkeit verborgen sind, für mich sichtbar zu machen.

Anhang B

Selbständigkeitserklärung

Erklärung gemäß §7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung der Tumorproben haben mir die nachstehend aufgeführten Personen unentgeltlich geholfen:

1. Dr. Guido Plotz
2. Dr. Ricardo Biondi
3. Michael Winkfein
4. Marc Wormek

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Homburg, den

Unterschrift der Promovierenden

Unterschrift der die Versicherung an Eides statt aufnehmenden Beamtin/Beamten

Lebenslauf

ANNA NAIN

ADRESSE

Borromäusstraße 11
66663 Merzig
Telefon: 0175/9435694

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum:	27.04.1983
Geburtsort:	Blagoweschtschenka
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig, keine Kinder

BILDUNGSWEG

1990-1995	1.-6.	Klasse	Allgemeinbildende Schule, Kasachstan
1995-2000	6.-10.	Klasse	Gesamtschule, Bornheim
2000-2003	11.-13.	Klasse	Robert Schuman Gymnasium, Saarlouis

Frühjahr 2003	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)	1,8
	Das große Latinum	
Herbst 2003	Medizinstudium an der Universität des Saarlandes	
Sommer 2005	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (neue AO)	2,5
Sommer 2007	Klinisches Semester	5

ANGESTREBTER BERUF

Ärztin

HOBBYS

Ölmalerei, Schwimmen

Stand: August 2007