

Aus der Klinik für Innere Medizin II  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. F. Lammert

**Analyse von Veränderungen in PDK1 sowie einer Spleiß-Variante  
von PKB $\beta$  in humanem Tumorgewebe**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2010

vorgelegt von: Michael Winkfein  
geboren am 19.07.1982 in Karlsburg

„grosse Dinge sollten gelassen angegangen werden“

*hagakure*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Deutsch</b>	<b>5</b>
<b>1.2 English</b>	<b>6</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>2.1 CRC-Definition</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Ätiologie-Pathogenese</b>	<b>7</b>
Risikofaktoren für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms	8
2.2.1 Exogene Risikofaktoren	8
2.2.2 Endogene Risikofaktoren	10
Zusammenfassung der Risiken	11
2.2.3 Prävention	12
<b>2.3 Molekularbiologische Grundlagen</b>	<b>13</b>
2.3.1 Tumorentstehung aus molekulargenetischer Sicht	13
2.3.2 Mikrosatelliten-Instabilität	14
2.3.3 Bedeutung und Funktion der Proteinkinase PDK1	15
<b>2.4 Fragestellung der Doktorarbeit</b>	<b>18</b>
2.4.1 Sequenzanalyse von PDK1 in Tumorproben	18
2.4.2 Alternative Splice-Variante 12a der Proteinkinase AKT2/ PKB b	19
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Patienten und Materialien</b>	<b>21</b>
3.1.1 Laborgerät	21
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	22
3.1.3 Allgemeine Chemikalien	23
3.1.4 Molekularbiologische Chemikalien	24
3.1.5 Verwendete Kit-Systeme	27
3.1.6 Puffer und Lösungen	28
3.1.7 Medien	29
3.1.8 Tumorproben	30
<b>3.2 Methoden</b>	<b>31</b>
3.2.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
3.2.2 Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten	32
3.2.3 Aufreinigung der DNA-Fragmente	33
3.2.4 Sequenzierungs-PCR	33
3.2.5 Größenausschlusschromatographie	35
3.2.6 Polyacrylamid Gelelektrophorese (Sequenzierung)	35
3.2.7 cDNA Generierung	36
3.2.8 Transformation der Plasmide	40
3.2.9 Plasmid-Mini-Präparation	40
3.2.10 Qualitativer Nachweis der Spleißvariante 12a	41
3.2.11 Quantitativer Nachweis der Spleißvariante 12a	41
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Sequenzanalyse des Proteins PDK1 in Tumorproben</b>	<b>47</b>
4.1.1 Ergebnisse der Sequenzanalyse der genomischen DNA	47
4.1.2 Ergebnisse der Sequenzanalyse der cDNA	53

<b>4.2 Alternative Spleiß-Variante von <i>AKT2/PKB<math>\beta</math></i></b>	<b>61</b>
4.2.1 Ergebnisse der qualitativen Bestimmung der alternativen Spleiß-Variante von <i>PKB<math>\beta</math></i>	62
4.2.2 Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der alternativen Spleiß-Variante von <i>PKB<math>\beta</math></i>	65
<b>5. Diskussion</b>	<b>68</b>
<b>5.1 Diskussion der Sequenzanalyse des <i>PDK1</i>-Gens in Tumorproben</b>	<b>68</b>
<b>5.2 Diskussion der alternativen Spleiß-Variante <i>PKB<math>\beta</math> 12a</i></b>	<b>70</b>
<b>5.3 Ausblick</b>	<b>71</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>7. Publikationen/ Danksagung</b>	<b>84</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>85</b>

# 1. Zusammenfassung

## 1.1 Deutsch

Darmkrebs ist eine der häufigsten bösartigen Tumorerkrankungen weltweit. Für die Tumorentstehung sind verschiedene Gene verantwortlich. Eines dieser Genprodukte ist die Proteinkinase PDK1.

PDK1 ist entscheidend für die Aktivierung nachgeschalteter Proteinkinasen wie beispielsweise AKT/PKB, PKC und S6K. Eine wichtige Rolle von PDK1 ist hierbei die Aktivierung mehrerer Wachstumsfaktoren einschließlich der Insulin-Signalkaskade.

Nähere Forschungen an PDK1 hinsichtlich Mutationen in Tumorgewebe geben Aufschluss über die Rolle des Proteins in intrazellulären Regulationsmechanismen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinkinase PDK1 auf DNA- und mRNA-Ebene in humanen Kolon-, Nieren- sowie Magenkarzinomen hinsichtlich Mutationen untersucht. Es wurden 40 Tumore auf gDNA-Ebene und weitere 40 Tumore nach Transkription der mRNA in cDNA auf cDNA-Ebene untersucht.

In den untersuchten 80 Tumorproben konnten in keinem der 14 Exons von *PDK1* Mutationen oder Polymorphismen nachgewiesen werden. Eine häufige relevante Rolle dieser Kinase in der Tumorentstehung ist daher nicht nachweisbar.

In einem weiteren Teilprojekt wurde eine Spleiß-Variante PKB $\beta$  (genannt 12a) des *AKT2/PKB $\beta$* -Gens untersucht. Bei dieser Spleiß-Variante ist ein kryptisches Exon zwischen Exon 12 und Exon 13 in die mRNA hinzugespleißt. Hierdurch wird der regulatorisch relevante extreme C-terminus des Proteins leicht verändert, weshalb für diese Spleißvariante eine biologische Bedeutung denkbar ist.

Hierzu wurden 24 verschiedene Gewebeproben untersucht. Durch Gelelektrophorese konnte die Spleißvariante in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Mittels Real-Time-PCR erfolgte die quantitative Bestimmung der Spleiß-Variante PKB $\beta$  12a in Relation zur Wildtyp-Variante. Dabei wurde festgestellt, dass die Spleiß-Variante PKB $\beta$  12a in allen

Gewebe in einem prozentualen Anteil von 0,2 % bis 3,9 % (im Schnitt 1,2 %) von der Gesamt PKB $\beta$ -mRNA gebildet wird.

Die funktionelle Charakterisierung der alternativen Spleiß-Variante PKB $\beta$  12a des Proteins PKB $\beta$  stellt den nächsten Schritt zur Untersuchung ihrer potentiellen biologischen Rolle dar.

## 1.2 English

Colorectal cancer is one of the most common forms of malignant cancer. Several genes are responsible for development of cancer. One of these gene products is protein kinase PDK1 which activates several signal cascades such as AKT/PKB, PKC and S6K. An important role of PDK1 is the activation of several growth factors including the insulin signaling cascade.

In order to verify if *PDK1* mutations occur in tumor tissue, we investigated genetic changes of *PDK1* in gDNA and mRNA in human colorectal, kidney and stomach cancer. The genomic DNA of 40 Tumors and the cDNA of another 40 tumors after transcription of mRNA to cDNA were analyzed.

The analysis of all 80 tumors did not show an evidence of mutation or polymorphism in any of the 14 exons of *PDK1*. Therefore, PDK1 alterations do not seem to be a frequent event in the tumorigenesis of these organs.

In a second project, an alternative splice form of PKB $\beta$  (called 12a) of the *AKT2/PKB $\beta$*  gene was examined. In this splice form, an cryptic exon situated between exon 12 and exon 13 was added to the mRNA. This introduces a small alteration in the extreme C-terminus of the Protein, which is normally responsible for its regulation. Therefore, a potential biological role of this splice variant is plausible.

We analyzed 24 different tissue samples. The splice form could be detected in all samples by means of PCR and gel electrophoresis. Quantitative determination of the splicing version in relation to the wild type was carried out by real-time PCR.

It was found out that the splice form PKB $\beta$  12a makes up 0,2 % to 3,9 % (on average 1,2 %) of the overall PKB $\beta$  mRNA in all analyzed tissues. The functional characterization of the splicing version PKB $\beta$  12a of the protein PKB $\beta$  is the next step to the analysis of the potential biological role.

## **2. Einleitung**

### **2.1 CRC-Definition**

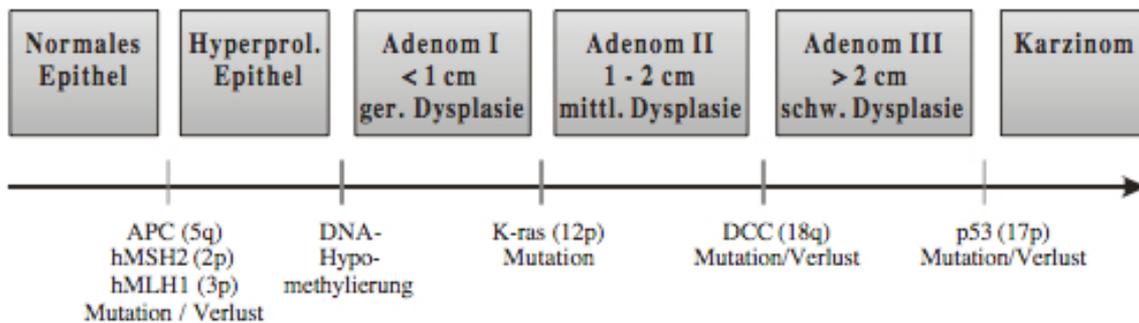
Der Dickdarmkrebs ist nach dem Lungenkrebs die zweithäufigste Todesursache in der BRD (statistisches Bundesamt). Das kolorektale Karzinom befällt überwiegend Personen, die älter als 50 Jahre sind. Da es anatomisch keine scharfen Grenzen im rekto-kolonalen Übergang gibt (aufgrund der individuellen peritonealen Umschlagsfalte), gelten definitionsgemäß alle Tumore als Kolonkarzinome, deren aboraler Rand bei der Messung mit dem starren Rektoskop mehr als 16 cm von der linea dentata entfernt sind. Dementsprechend sind Rektumkarzinome weniger als 16 cm von der linea dentata entfernt (Fielding *et al.*, 1991).

Aufgrund dieser willkürlichen Trennung zwischen Kolon- und Rektumkarzinom wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit Gewebeproben von Patienten sowohl mit Kolon- als auch mit Rektumkarzinomen untersucht.

### **2.2 Ätiologie-Pathogenese**

Die meisten kolorektalen Karzinome entwickeln sich aus adenomatösen Polypen. Diese präsentieren sich für gewöhnlich als eine plumpe, sichtbare Vorwölbung der Schleimhautoberfläche. Von der Vielzahl der Polypen werden nur die Adenome als prämaligne Veränderungen betrachtet und nur ein kleiner Teil von ihnen entartet in ein invasives Adenokarzinom. In Screeninguntersuchungen (Walsh *et al.*, 2003) konnte gezeigt werden, dass bei mehr als 30 Prozent der untersuchten Personen (mittleren und höheren Alters) kolorektale Adenome nachweisbar sind. Von diesen entartet wiederum weniger als ein Prozent jemals in ein invasives Adenokarzinom. Da die meisten Polypen asymptomatisch bleiben, werden sie nicht diagnostiziert. Bei weniger als fünf Prozent der Menschen mit Polypen wird okkultes Blut im Stuhl nachgewiesen.

Ein mehrstufiges Modell der Tumorprogression durch Akkumulation bestimmter Mutationen wurde 1988 von Fearon und Vogelstein entwickelt. Im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz kommt es zur Ausbildung von kolorektalen Karzinomen aus Adenomen über verschiedene Stufen genetischer Mutationen (Vogelstein *et al.*, 1988).



**Abbildung 2.1. Adenom-Karzinom-Sequenz.**

Prämaligene sowie maligne Veränderungen tragen eine Reihe von DNA-Veränderungen (z. B. Mutationen/Verluste). Über eine Onkogen-Aktivierung oder einem Allel-Verlust von Genen, die die Tumorentstehung unterdrücken (Tumorsuppressorgenen) führen sie zur Entstehung eines Karzinoms.

## Risikofaktoren für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms

### 2.2.1 Exogene Risikofaktoren

Einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung von Dickdarmkarzinomen scheinen Umweltfaktoren zu haben (Perera *et al.*, 1996; Hwang *et al.*, 1999). Darüber hinaus besteht ein Zusammenhang zwischen sozioökonomischer Schicht und dem Auftreten von Dickdarmkarzinomen: das kolorektale Karzinom befällt häufiger die oberen sozioökonomischen Schichten der Stadtbevölkerung (van Loon *et al.*, 1995).

#### 2.2.1.1 Ernährung

Eine entscheidende Rolle bei der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms wird den Ernährungsgewohnheiten zugeschrieben (Hsing *et al.*, 1998). Es besteht eine direkte Korrelation zwischen dem Auftreten eines kolorektalen Karzinoms und dem Pro-Kopf-Konsum von Kalorien, dem Verzehr von rotem Muskelfleisch, von Nahrungsfetten und -ölen sowie einem erhöhten Serumcholesterinwert (Giovannucci *et al.*, 1994; Howe *et al.*, 1997;

Trock *et al.*, 1990). Einer Theorie zufolge führt die Aufnahme tierischer Fette zu einem erhöhten Anteil von Anaerobiern in der Mikroflora des Darmes (Bingham, 1990). Dies könne dazu führen, dass normale Gallensäuren in Karzinogene umgewandelt werden. Einen protektiven Effekt scheint der Verzehr einer ballaststoffreichen Kost aus Obst und Gemüse zu haben (Eastwood, 1992). Ebenso scheint die regelmäßige Einnahme von Vitaminen (A, C, E), Folsäure sowie Mineralstoffen (Selen) mit antioxidativer Wirkung einen protektiven Effekt auf die Entstehung des kolorektalen Karzinoms zu haben (Giovannucci *et al.*, 1998; Slattery *et al.*, 1988). Dieser Effekt ist jedoch ebenso umstritten wie die protektive Wirkung von Calcium und Vitamin D (Bergsma-Kadijk *et al.*, 1996; Greenberg *et al.*, 1994).

### **2.2.1.2 Geographische Verteilung**

Geographische Unterschiede in der Inzidenz des kolorektalen Karzinoms scheinen nicht Folge von genetischen Unterschieden zu sein (Kliwer, 1992). In Migrationsstudien konnte gezeigt werden, dass sich die Migranten der Erkrankungsrate des Einwanderungslandes anpassen. Das Neuerkrankungsrisiko an kolorektalem Karzinom bei Immigranten nach 20 Jahren Aufenthalt in den USA erreicht das Niveau der dort geborenen weißen Bevölkerung (Flood *et al.*, 2000; Locke, 1980; Potter *et al.*, 1993). Die derzeitige Datenlage korreliert mit der Annahme, dass westliche Ernährungsgewohnheiten, insbesondere fettreiche und ballaststoffarme Ernährung, zu einer ungleichen geographischen Verteilung der Inzidenzraten von Dickdarmkrebs mit dem Schwerpunkt in der westlichen Welt liegt (Giovannucci *et al.*, 1994).

### **2.2.1.3 Adipositas**

Übergewicht sowie mangelnde körperliche Aktivität erhöhen das Risiko, an einem kolorektalem Karzinom zu erkranken (Russo *et al.*, 1998; Moghaddam *et al.*, 2007). Für das Entstehen von kolorektalen Karzinomen wird vor allem der erhöhte Taillen-Hüftumfang-Quotient (Slattery *et al.*, 1988) sowie sitzende Tätigkeiten verantwortlich gemacht (Hsing *et al.*, 1998). Darüber hinaus entwickeln Menschen mit einer exzessiven Gewichtszunahme eine Insulinresistenz mit erhöhten Insulinspiegeln im Serum. Dies führt zu erhöhten Serumspiegeln von Insulin-like Growth Factor Type 1 (IGF-1). IGF-1 steht im Verdacht, die Proliferation der intestinalen Schleimhaut und die Entstehung von Neoplasien zu begünstigen (Kaczka *et al.*, 2007; LeRoith *et al.*, 2003; Giovannucci, 2001; Tran *et al.*, 2006).

#### **2.2.1.4 Tabakkonsum/ Alkoholkonsum**

Sowohl der Konsum von Tabak als auch von Alkohol korrelieren mit der Entstehung kolorektaler Adenome (Tsong *et al.*, 2007; Buc *et al.*, 2006). Bislang wurde noch keine biologische Erklärung für diese Assoziation gefunden.

#### **2.2.1.5 Uretersigmoidostomie**

Patienten, bei denen wegen einer kongenitalen Blasenektrophie eine Uretersigmoidostomie angelegt wurde, tragen 20 bis 26 Jahre später ein fünf- bis zehnprozentiges Risiko, an einem Dickdarmkarzinom zu erkranken (Azimuddin *et al.*, 1999). Die Karzinome entstehen typischerweise distal der Ureterimplantationsstelle, wo die Darmschleimhaut ständig dem Kontakt mit Urin und Fäzes ausgesetzt ist (Hurlstone *et al.*, 2004). Dies beruht auf der Bildung von Nitrosaminen, die verstärkt gebildet werden und eine krebserzeugende Wirkung haben. Über eine chronische Entzündung der Darmschleimhaut kommt es nach Jahren zur Entstehung eines Karzinoms.

#### **2.2.1.6 Streptococcus-bovis-Bakteriämie**

Patienten, die eine Endokarditis oder Septikämie mit diesen Darmbakterien entwickeln, weisen aus unbekanntem Gründen eine hohe Inzidenz an okkulten kolorektalen Tumoren und möglicherweise auch an Tumoren des oberen Gastrointestinaltraktes auf. In diesen Fällen ist eine endoskopische oder röntgenologische Abklärung ratsam (Gold *et al.*, 2004; Ellmerich *et al.*, 2000).

### **2.2.2 Endogene Risikofaktoren**

#### **2.2.2.1 Genetische Prädisposition**

Zwischen 12 und 25 Prozent aller Patienten mit kolorektalem Karzinom weisen eine positive Familienanamnese für diese Krankheit auf (Tung *et al.*, 2000; Gaglia *et al.*, 1995; Pariente *et al.*, 1998; Guillem *et al.*, 1992). Dieser Umstand lässt auf eine genetische Prädisposition schließen (Toribara *et al.*, 1995; Vogelstein *et al.*, 1988). Für das Auftreten kolorektaler Karzinome vor dem 40. Lebensjahr spielt die genetische Prädisposition eine entscheidende

Rolle, insbesondere für Personen mit einer erhöhten familiären Vorbelastung. (Bertz *et al.*, 2006).

Die erblichen Dickdarmkarzinome können in die Gruppe der seltenen Polyposis-Syndrome und die häufigeren nicht-polypösen Tumorsyndrome unterteilt werden.

### **2.2.2.2 Hereditäre Tumorsyndrome**

Die Familiäre Adenomatöse Polyposis coli (FAP) ist eine seltene Krankheit, die durch das Auftreten tausender adenomatöser Polypen im gesamten Dickdarm gekennzeichnet ist. Demgegenüber steht das erbliche nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC), bekannt auch unter dem Namen Lynch-Syndrom. Das HNPCC wird für 2-7% aller kolorektalen Karzinome verantwortlich gemacht (Muller, 2002). Beiden hereditären kolorektalen Karzinomsyndromen liegt ein autosomal dominanter Erbgang zugrunde.

Weitere seltene genetische Prädispositionen für das Auftreten von Dickdarmkarzinomen sind das Gardner-, Turcot- und Peutz-Jeghers-Syndrom sowie die juvenile Polyposis.

### **2.2.2.3 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Dickdarmkarzinome treten bei Patienten mit einer lange bestehenden chronisch entzündlichen Darmerkrankung gehäuft auf. In Studien konnte gezeigt werden, dass chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, zu den endogenen Risikofaktoren des kolorektalen Karzinoms zählen (Hogezand *et al.*, 2002).

## **Zusammenfassung der Risiken**

Es lässt sich abschließend sagen, dass der größte Teil der Fälle von Dickdarmkrebs (80 - 90%) auf vermeidbare Risikofaktoren zurückgeführt werden können. Hierzu zählen die Ernährungsgewohnheiten, der Tabak- und Nikotinkonsum sowie berufliche Expositionen und die Belastung durch Luftschadstoffe (Becker, 1998). Für das sporadische Auftreten von Dickdarmkarzinomen wird eine multifaktorielle Genese angenommen. In der Regel scheint hier eine Kombination aus genetischen Ursachen und exogenen Faktoren zu bestehen.

### 2.2.3 Prävention

Hinsichtlich der primären Prävention des Dickdarmkarzinoms wurden verschiedene oral zu verabreichende Substanzen als mögliche Inhibitoren von Dickdarmkarzinomen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die effektivsten Substanzen Acetylsalicylsäure und andere nicht steroidale Antiphlogistika (NSAR) sind (Jacobs *et al.*, 2007; Rigas, 2007; Reddy, 2007; Luciani *et al.*, 2007). Für diese Pharmaka wird angenommen, dass es zu einer Inhibierung der Zellproliferation durch Hemmung der Prostaglandinsynthese kommt. Der inhibitorische Effekt von Aspirin auf die kolorektale Karzinogenese scheint mit zunehmender Dauer der Einnahme anzusteigen. Neueren Studien zufolge konnte durch eine langfristige cholesterinsenkende Therapie mit HMG-CoA-Reduktasehemmern (Statine) das Risiko für die Entstehung kolorektaler Neoplasien signifikant gesenkt werden (Yasui *et al.*, 2007; Poynter *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2008). Weitere präventive Faktoren sind der Verzehr von faserreicher Nahrung sowie die Reduktion von tierischem Fett und rotem Fleisch.

Zur Senkung der Inzidenz und Mortalität sollte im Sinne einer sekundären Prävention bei Risikopatienten eine regelmäßige endoskopische Screeninguntersuchung erfolgen (Toribara *et al.*, 1995; Vogelaar *et al.*, 2006; Winawer, 2005).

Vorsorgeuntersuchungen dienen der Früherkennung. Hierbei spielen Stuhluntersuchungen eine wichtige Rolle. Sie sind die Screening-Methode der Wahl, da hierdurch Kolonkarzinome frühzeitig erkannt werden können. Hierbei helfen Biomarker wie Tumor M2-PK (Zhang *et al.*, 2004) bei der frühzeitigen Erkennung von Karzinomen. Dieser Marker ist ein Schlüsselenzym im Stoffwechsel von Tumoren. Weitere Marker, die in der Diagnostik gastrointestinaler Tumore genutzt werden sind CEA, CA 19-9 sowie CA 72-4 (Schneider *et al.*, 2003).

Als weitere wichtige Vorsorgeuntersuchung für die Erkennung von Kolonkarzinomen ist die Darmspiegelung zu erwähnen. Die Entdeckung der Adenom-Karzinom-Sequenz führte dazu, dass im Rahmen der Darmspiegelungen und der dabei erfolgenden Probenentnahme die Kolonkarzinome in einem frühen Stadium festgestellt werden können. Dadurch kann eine frühzeitige Therapie erfolgen.

## 2.3 Molekularbiologische Grundlagen

### 2.3.1 Tumorentstehung aus molekulargenetischer Sicht

Genetisch betrachtet scheint die Entstehung von Dickdarmkarzinomen das Ergebnis einer progressiven Umwandlung von Zellen des Dickdarms zu sein. Diese Zellen sammeln im Laufe der Zeit Mutationen in zahlreichen Protoonkogenen sowie in Tumorsuppressorgenen (Fearon *et al.*, 1990). Die meisten kolorektalen Tumore entwickeln sich aus adenomatösen Polypen. Als eine prä maligne Veränderung werden ausschließlich die Adenome betrachtet.

Zu Anfang der Forschung war man der Meinung, dass zwei Mutationen zur Krebsentstehung ausreichen („two hit model“) (Knudson, 1971). Derzeit geht man von einem mehrstufigen Prozess der Krebsentstehung aus, bei dem sich im Laufe der Zeit Schäden im Erbgut anhäufen („multi hit model“) (Marquardt, 2003). Hierbei sind viele endogene sowie exogene Faktoren beteiligt. Der mehrstufige Prozess der Krebsentstehung, die sog. Adenom-Karzinom-Sequenz, kann von normaler Kolonschleimhaut über das Adenom, Dysplasien bis zur Entstehung eines kolorektalen Karzinoms führen (Vogelstein *et al.*, 1988). Zu den Entwicklungsschritten gehören mehrere Punkte. Punktmutationen im *K-ras*-Protoonkogen gehören zu den am besten beschriebenen und den am häufigsten vorkommenden Mutationen, die für die Entstehung von Dickdarmkarzinomen verantwortlich sind (Mulcahy *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1999). Als weiterer Punkt gilt die Hypomethylierung der DNA, die zu einer gesteigerten Genaktivierung führen kann (Patra, 2008; Suter *et al.*, 2003). Ein Verlust der Wachstumsregulation entsteht durch den Verlust von DNA („Allel-Verlust“) im Bereich von Tumorsuppressorgenen. Hierzu zählt der Allel-Verlust im „*Adenomatöse Polyposis coli*“- (*APC*)-Gen (Panduro *et al.*, 1993; Aoki *et al.*, 2007), der Allel-Verlust im so genannten *Deleted in Colorectal Cancer*-(*DCC*)-Gen (Bosman, 1999; Huert *et al.*, 2001), sowie ein Allel-Verlust auf Chromosom 17p, der mit Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens einhergeht (Hollstein *et al.*, 1991; Polyak *et al.*, 1997). Die Zahl der genetischen Alterationen in den Tumorzellen nimmt im Verlauf der Karzinogenese stetig zu. Die mutagene Aktivierung eines oder mehrerer Onkogene zum einen und zum anderen der Verlust von Genen (Tumorsuppressorgenen), die normalerweise die Karzinogenese unterdrücken, führen zu einer Veränderung der Kolonschleimhaut, die schließlich in ein Karzinom mündet. Unklar bleibt jedoch die Frage, ob die genetischen Veränderungen immer in einer festgelegten Abfolge auftreten. Gestützt auf das Model der Adenom-Karzinom-Sequenz geht man davon aus, dass sich ein Karzinom nur dann entwickelt, wenn alle beschriebenen mutagenen

Veränderungen auftreten (Cappell, 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Abweichungen im Regulationszyklus der Genexpression die Ursache für die Entstehung von Krebs sind.

Neben der Veränderung der genetischen Information durch Punktmutationen und Insertionen/Deletionen gibt es einen weiteren Weg, auf dem Zellen in Richtung Karzinogenese entarten können: das sogenannte epigenetische Silencing (Klein, 2002). Die derzeit am besten verstandenen epigenetischen Mechanismen beinhalten die DNA-Methylierung und die Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung der Histone (Garinis *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2002). Die Demethylierung von Promotorregionen in CpG-Sequenzen können zu einer erhöhten Expressionsrate an Protoonkogenen führen. Methylierungen in CpG-Sequenzen eines Gens können bewirken, dass diese Gene nicht mehr abgelesen werden (Jacinto *et al.*, 2007). Diese das Chromatin betreffenden epigenetischen Veränderungen können auch die Sensitivität von DNA-Sequenzen gegenüber Mutationen verändern, indem sie Gene für toxische Schäden empfänglicher machen (Nardone *et al.*, 2007; Okino *et al.*, 2006). Die enge Verbindung von Chromatinstruktur bis zur Genexpression, der DNA-Reparatur und der Mutagenese ist ein wichtiger Bereich für weitergehende Studien die Karzinogenese betreffend.

### **2.3.2 Mikrosatelliten-Instabilität**

Mikrosatelliten sind kurze, repetitive, meistens nicht kodierende DNA-Sequenzen, die im Genom häufig vorkommen. Im Rahmen der Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) kommt es zu Längenveränderungen innerhalb dieser repetitiven DNA-Sequenzen. Durch Verrutschen eines Teils des neureplizierten Stranges an am Mutterstrang können unter Ausbildung von Insertions-/Deletionsschleifen eines Stranges Längenmutationen in diesen Mikrosatelliten entstehen, wenn das Verrutschen nicht während der Replikation erkannt und behoben wird. Für die Beseitigung der Längenveränderung eines DNA-Abschnittes sind die Mismatch-Reparaturproteine zuständig. Kommt es zu Mutationen in den Reparaturgenen, kann die Längenveränderung eines Mikrosatelliten nicht mehr korrigiert werden und es kommt zur Instabilität der Mikrosatelliten. In Zellen, denen diese Mikrosatelliten-Instabilität vorliegt, werden zudem auch zahlreiche andere Tumorsuppressorgene oder Protoonkogene mutiert. Durch Vergleich mit den Mikrosatelliten-Längen des Normalgewebes lässt sich in einem Tumor, dessen Zellen eine defekte Mismatch-Reparatur haben, dies anhand der

Längenänderungen der Mikrosatelliten nachweisen. Es bestehen hierbei Unterschiede zwischen gesundem und entartetem Gewebe. Zu den in der klinischen Diagnostik derzeit verwendeten Mikrosatelliten-Markern zählen BAT25, BAT26, BAT40, D5S346 und D2S123 (Potocnik *et al.*, 2000). Die DNA-Reparaturproteine hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1 und hPMS2 lassen sich durch eine immunhistochemische Expressionsanalyse sowie direkt durch eine Mikrosatellitenanalyse mittels spezifischer Antikörper nachweisen (Mead *et al.*, 2007). Kommt es zu einem Defekt in einem oder mehreren dieser für die Reparatur zuständigen Gene, sammeln sich in der neu replizierten DNA nach und nach Mutationen an (Ahlquist *et al.*, 2000). Die Untersuchung auf Mikrosatelliten-Instabilität ist beim erblichen Dickdarmkarzinom vom nicht-polypösen Typ (HNPCC) eine gängige Untersuchung (Heinimann, 2000).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Tumorproben gezielt ausgewählt, bei denen die MSI-Diagnostik zuvor durchgeführt worden ist. Besonders in den MSI-positiven Proben wurde, wegen der höheren Mutationswahrscheinlichkeit, eine Veränderung im PDK1-Gen vermutet.

### **2.3.3 Bedeutung und Funktion der Proteinkinase PDK1**

Proteinkinasen sind Enzyme, die wichtig sind für Kontrolle zahlreicher zellulärer Wachstumsvorgänge, Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse sowie für die Regulation der zellulären Kommunikation. Ihre Fehlfunktion kann Krankheiten beim Menschen auslösen, insbesondere die Entstehung von Tumoren.

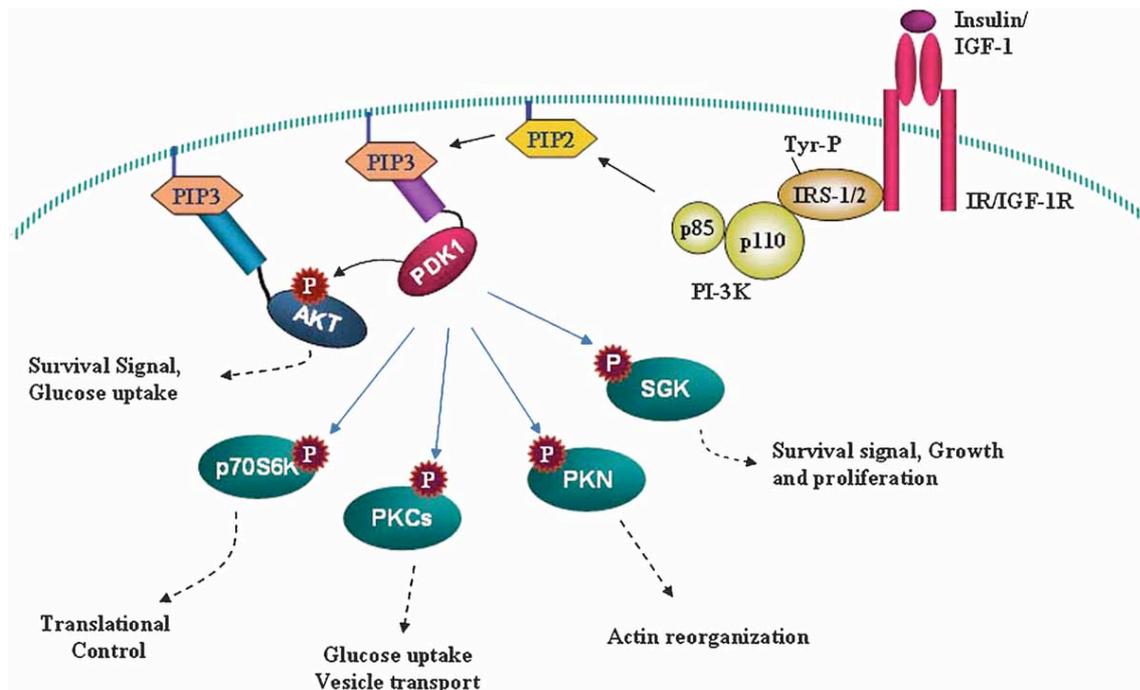
Die Proteinkinase 3-Phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1 oder PDK1), eine 63 kDa große Proteinkinase, ist eine Serin/Threonin Kinase, die zur Familie der AGC (cAMP-abhängig, cGMP-abhängig, Proteinkinase C(PKC)) Proteinkinasen gehört (Mora *et al.*, 2004; Storz *et al.*, 2002). Sie ist im Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signaltransduktionsweg involviert, von dem eine Reihe zellulärer Prozesse geregelt werden. PDK1 wurde als Aktivierungskinasen der Proteinkinase B $\alpha$  (PKB $\alpha$ , auch bekannt als Akt1) identifiziert. In den letzten Jahren wurde PDK1 in umfangreichen Studien untersucht, da es ein Schlüsselenzym zellulärer Regulationsprozesse, der Insulinaufnahme, dem Überleben der Zelle, der Zellzykluskontrolle, der Proteintranslation sowie dem Glukose-Metabolismus ist (Downward, 2004; Hanada *et al.*, 2004; Lawlor *et al.*, 2001). Es ist an der Phosphorylierung und Aktivierung von mindestens 24 Proteinkinasen beteiligt, die zur Familie der AGC (cAMP-abhängig, cGMP-abhängig, Proteinkinase C(PKC)) Proteinkinasen gehören. Diese beinhalten Isoformen der Proteinkinase B (PKB, auch bekannt als Akt), p70 ribosomale S6-Kinase

(S6K), Serum und Glukokortikoid-responsiv Kinase (SGK), p90 ribosomale S6 Kinase (RSK) und Proteinkinase C (PKC). Diese Enzyme werden durch Phosphorylierung eines Serin- oder eines Threonin-Restes aktiviert. PDK1 ist ein 556 Aminosäuren großes Protein, welches an seinem N-Terminus eine Kinasedomäne und an seinem C-Terminus eine *pleckstrin homology* (PH) Domäne besitzt (Alessi *et al.*, 1997; Stephens *et al.*, 1998). Letztere bindet mit hoher Affinität an den *second messenger* Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) (Stephens *et al.*, 1998; Currie *et al.*, 1999), welcher durch insulin- und wachstumsfaktorvermittelte Aktivierung der PI-3-Kinase erzeugt wird (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). Verschiedene Forschungsprojekte konnten zeigen, dass Insulin sowie Wachstumsfaktoren die Proteinkinase PDK1 eher durch Kontrolle der Interaktion mit Substraten regulieren als durch direkte Aktivierung von PDK1 (Alessi *et al.*, 1997; Vanhaesebroeck *et al.*, 2001). Der durch Insulin aktivierte Insulinrezeptor führt über eine Kaskade zur Bildung von PIP<sub>3</sub>, welches seinerseits zur Aktivierung von im Zytosol befindlichen PDK1 führt (Kikani *et al.*, 2005).

Andere Substrate von PDK1 wie S6K und SGK, die nicht über eine PH-Domäne verfügen oder an der Plasmamembran aktiviert werden, werden hingegen durch direkte Bindung an PDK1 aktiviert (Biondi, 2004). Die Kinasedomäne von PDK1 besitzt drei Bindungsstellen: die Substrat- und die ATP-Bindungsstellen sowie eine sog. „*PIF-pocket*“ (*PDK1-interacting fragment, PIF*). Über eine *PIF-pocket*-Interaktion werden diese Enzyme aktiviert (Mora *et al.*, 2004). PDK1 selbst wird ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert (Casamayor *et al.*, 1999). Zusätzlich zu der Phosphorylierung konnte gezeigt werden, dass die Funktion von PDK1 sowohl durch Protein-Protein-Interaktion als auch durch seine subzelluläre Lokalisierung geregelt wird (Makris *et al.*, 2002).

Weitere Substrate, wie S6K, RSK und SGK werden von PDK1 eher im Zytosol als an der Plasmamembran phosphoryliert und damit aktiviert. Extrazelluläre Faktoren regulieren die Aktivierung von S6K, RSK und SGK durch PDK1, indem sie eine Phosphorylierung dieser Enzyme an einem hydrophoben Motiv des konservierten C-Terminus (nicht katalytisch) bewirken (Mora *et al.*, 2004).

Sobald diese Enzyme aktiviert sind, vermitteln sie viele der verschiedenen Effekte von Insulin und Wachstumsfaktoren an Zellen, indem sie ihrerseits Schlüsselenzyme phosphorylieren, die eine wichtige Rolle spielen bei Kontrollprozessen wie Zellüberleben, Wachstum, Nährstoffaufnahme und Speicherung (Lawlor *et al.*, 2002).



**Abbildung 2.2. Die Rolle von PDK1 im Insulin Signalweg:**

Insulin fördert die Phosphorylierung seines eigenen Rezeptors durch Tyrosin-Phosphorylierung. Die aktivierten Insulinrezeptoren aktivieren ihrerseits die Insulin-Rezeptorsubstrate 1/2 (IRS1/2), die zur Aktivierung von PI-3K führen. Diese generiert nachfolgend PIP<sub>3</sub>. PIP<sub>3</sub> hat an der Plasmamembran PDK1 und Akt zum Ziel, wo PDK1 durch Phosphorylierung die Kinase Akt aktiviert.

Viele Tumore weisen erhöhte Level von PIP<sub>3</sub>, dem *second messenger*, der die Proteinkinasen PKB/Akt und S6K aktiviert, auf. Dadurch werden die Proliferation, das Wachstum sowie das Überleben der Zelle stimuliert (Vanhaesebroeck *et al.*, 2001; Cantley, 2002). Die Wichtigkeit dieses Signaltransduktionsweges für die Tumorentstehung wurde deutlich, nachdem man herausgefunden hatte, dass die Lipidphosphatase PTEN, die PIP<sub>3</sub> in PIP<sub>2</sub> spaltet, in menschlichen Tumoren oftmals mutiert vorliegt (Leslie *et al.*, 2004; Sulis *et al.*, 2003). Zellen, denen PTEN fehlt, haben einen erhöhten Level an PIP<sub>3</sub> sowie eine erhöhte Aktivität von PKB und S6K (Myers *et al.*, 1998; Maehama *et al.*, 1998; Stambolic *et al.*, 1998). Infolge dessen können unterschiedliche Arten von Tumoren entstehen (Podsypanina *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verringerung der Expressionsrate von PDK1 in Zellen ohne PTEN-Funktion eine signifikante Reduzierung der Tumorraten bewirkt (Bayascas *et al.*, 2005). Daraus wird ersichtlich, dass bei fehlender PTEN-Funktion PDK1 ein Schlüsselenzym bei der Entstehung von Neoplasien ist. Dies macht PDK1 zu einem vielversprechenden Ziel für weitergehende Krebsforschung an Tumoren mit erhöhter PKB- und S6K-Aktivität.

## 2.4 Fragestellung der Doktorarbeit

### 2.4.1 Sequenzanalyse von PDK1 in Tumorproben

Es konnte hinlänglich gezeigt werden, dass genetische Veränderungen in Tyrosinkinase an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind (Cantley *et al.*, 1991; Katso *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2000; Migozuchi *et al.*, 2004). Die Beteiligung von Serin-/Threoninkinase (STKs) ist im Vergleich hierzu nur wenig bekannt (Blume-Jensen *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2002; Futreal *et al.*, 2004). Im Herbst 2005 wurde eine Studie veröffentlicht, für die 340 Serin-/Threoninkinase in menschlichen kolorektalen Karzinomen auf das Vorhandensein von Mutationen untersucht wurden. Es wurden insgesamt 23 Mutationen identifiziert, die 8 verschiedene Gene betrafen (Parsons *et al.*). Drei der veränderten Gene, *PDK1*, *AKT2* und *PAK4*, kodieren Proteine, die in der PI(3)K Signalkaskade involviert sind (Vivanco *et al.*, 2002; Wells *et al.*, 2002); Abbildung 2.3. Zwei von ihnen (*AKT2* und *PAK4*) waren in menschlichen Tumoren überexprimiert (Blume-Jensen *et al.*, 2001). Quantitative PCR-Analysen an 146 kolorektalen Tumoren konnten Co-Amplifikation von *AKT2* und *PAK4* auf dem Chromosom 19q13.2 in zwei Proben zeigen (Wang *et al.*, 2002). Es wurden andere nicht-STK-Mitglieder (*INSRR*, *ERBB4*, *PTEN*, *IRS2*) der PI(3)K Signalkaskade untersucht und Mutationen in weiteren Genen gefunden (Vivanco *et al.*, 2002). Beim Vergleich der 58 Mutationen fiel auf, dass bis auf zwei Veränderungen alle in unterschiedlichen Tumoren vorlagen (Parsons *et al.*). Dies wurde dahingehend gedeutet, dass die veränderten Gene wahrscheinlich gleiche Effekte in der Tumorgenese hatten und somit die Bedeutung dieser Signalkaskade in der Tumorentstehung unterstrichen wird.

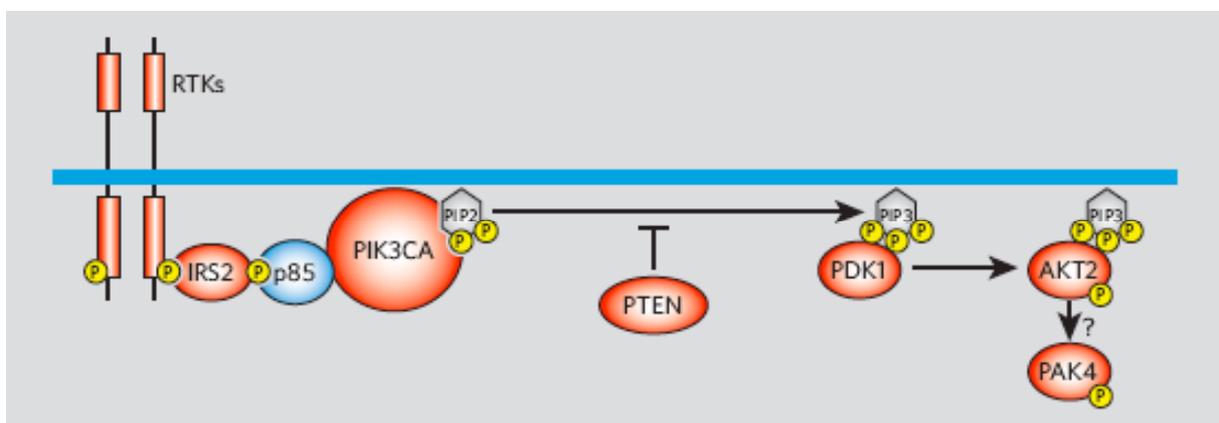


Abbildung 2.3. Die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI(3)K)-Signalkaskade (Parsons *et al.*)

Am Anfang der Kaskade rekrutieren die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) 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. 1.11). 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 (Parsons et al.). Die Phosphatgruppen sind gelb gekennzeichnet. Abkürzungsverzeichnis: IRS2: insulin receptor substrat 2, PIK3CA: katalytische Untereinheit p110 $\alpha$  der Phosphoinositide-3-kinase, PTEN: phosphatase-and-tensin homologue, PDK1: phosphoinositide-dependent protein kinase-1, AKT2: v-akt murine thymoma viral oncogene homologue-2 Kinase, PAK4: p21-activated kinase 4

Insgesamt wiesen fast 40% der kolorektalen Tumore Veränderungen in einem von acht Genen der PI(3)K-Signalkaskade auf. Da die meisten von ihnen für Proteinkinasen kodieren, könnten sie als Zielproteine für therapeutische Interventionen dienen. Als Erfolg versprechende Angriffspunkte für eine wirksame Therapie wurden von den Autoren insbesondere die Gene für PDK1 und AKT2 vorgeschlagen (Parsons et al.).

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war es, Mutationen von PDK1 in kolorektalen sowie anderen Karzinomen zu suchen, um deren Bedeutung in verschiedenen Tumorarten zu erfassen. Dies erfolgte mittels Sequenzanalyse auf Ebene der genomischen DNA und der mRNA. Die Mutationsanalysen der Proteinkinase PDK1 wurden an histologisch gesicherten Gewebeproben von kolorektalen Karzinomen sowie an Karzinomproben einer Tumorbank des Instituts für Humangenetik durchgeführt.

#### **2.4.2 Alternative Splice-Variante 12a der Proteinkinase AKT2/ PKB $\beta$**

Die post-transkriptionelle Modifikation ist ein Prozess, bei dem das primäre Transkriptionsprodukt (die prä-mRNA) in reife RNA umgewandelt wird (Lamond et al., 1991). Hierzu zählt insbesondere das Spleißen, bei dem die nichtkodierenden Abschnitte (Introns) aus der prä-mRNA herausgeschnitten und die kodierenden Abschnitte (Exons) miteinander verknüpft werden. Dieser Vorgang ist von entscheidender Bedeutung für die korrekte Translation des Gens, da hierbei die nichtkodierenden Anteile der mRNA herausgeschnitten werden. Durch alternatives Spleißen können somit aus prä-mRNA verschieden reife mRNA-Produkte entstehen, die unterschiedliche Proteine kodieren (Hodges et al., 1994).

Im Rahmen von Klonierungsarbeiten wurde in einem Tumorgewebe eine alternative Spleiß-

Variante des Gens AKT2/PKB $\beta$  entdeckt. Darin war ein Teil des Introns, das zwischen Exon 12 und Exon 13 liegt, in die mRNA eingespleißt.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die qualitative sowie quantitative Beschreibung dieser alternativen Spleißvariante in unterschiedlichen Zelltypen. Hierzu wurde mittels (Real-Time-)PCR die Häufigkeit der Spleißvariante in verschiedenen Gewebeproben analysiert.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Patienten und Materialien

#### 3.1.1 Laborgerät

Agarose-Gelapparaturen	Horizon 11.4, Gibco, Eggenstein
Analysenwaage	Sartorius, R 160P-D1, Göttingen
Autoklav	HA-300M3CF, Wolf, Geislingen
Automatische Pipettierhilfe	Pipetus Akku, Hirschmann, Eberstadt
Bakterienbrutschrank	WTB, Bindler, Tuttlingen
Bakterienschüttler	TR 225, Infors, Bottmingen
Chemikalienwaage	Sartorius, Göttingen
Elektroblotapparat	MultiphorII, Pharmacia Biotech Nova Blot
Elektrophoresetransformator	Power Supply E 835, Consort, Turnhout
Elektrophoresekammer	Horizon 11.4, Gibco, Eggenstein
Fotoapparatur	MP4 Modell 44-16, Polaroid, Cambridge
Mikrowellenherd	SS 611, Bosch, München
Pipetten	Pipetman 10yl, 20yl, 200yl, 1ml, Gilson, Villiers-le-Bel
Schüttelinkubator	Certo U, B. Braun, Berlin
Schüttler, Vortex	Reax Top, Heidolph, Kelheim
Semi-dry-Blotter	Pharmacia, Freiburg
Sequenziergerät	Abi Prism 3100 Genetic Analyzer Applied Biosystems, Foster City
Sequenzierungssoftware	DNA Sequencing Analysis 3.7 Applied Biosystems, Foster City
Spektralphotometer	UV-DU 800, Beckmann-Coulter, Fullerton
Sterilbank	Heraeus HS12, Kendro, Hanau

Thermocycler 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermocycler 9600	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermocycler 9700	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermomixer	Compact 5350, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen	Micro Centrifuge SD 220 VAC, Roth, Karlsruhe
	Spectrafuge Mini C1301, Labnet, Woodbridge
UV-Lampe FluoLink	Biometra, Göttingen
Vertikalelektrophoresekammer	Protean II, Biorad, München
Wasserbad	1092 GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Rotanda 46R, Hettich, Tuttlingen
	5417C, Eppendorf, Hamburg
	5417R, Eppendorf, Hamburg
	5702, Eppendorf, Hamburg

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Collection Tubes 2 ml	Sigma, Deisenhofen
Eppendorfgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Desinfektionsmittel Freka Nol	Fresenius, Bad Homburg
Filterpapier	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala
Glaspipetten (5 ml/10 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Hyperfilm™ MP	Amersham, Braunschweig
Küvetten (10 x 10 x 45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schüll, Dassel
PCR-Reaktionsgefäße	Multiply Pro, Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen (150 x 20 mm, 100 x 20 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen steril (10/20/200 µl, 1 ml)	Starlab, Ahrensburg
Pipettenspitzen unsteril (0,2 ml, 1ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Quarzküvetten	Heraeus, Hanau
Vacutainer-CPT- Röhrchen	Becton Dickonson, Heidelberg
Wasser steril	Braun, Melsungen

Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm <sup>2</sup> )	Falcon, Heidelberg
Zellschaber	Costar, Wiesbaden

### 3.1.3 Allgemeine Chemikalien

Acrylamid/ Bisacrylamid (30:1)	Sigma, Deisenhofen
Agarose Broad Range	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Boehringer, Mannheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
dNTP (10 mM)	Applied Biosystems
ddNTP (10mM)	Applied Biosystems
Dodecylsulfat, Natriumsalz (SDS)	ICN Biomedicals, Eschwege
DTT	Boehringer, Mannheim
ECL-Detektionsreagenz	Amersham, Braunschweig
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol (absolut)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	Nunc, Heidelberg
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
LB-Agar	Gibco BRL, Karlsruhe
Luria Broth Base (LB)	Gibco BRL, Karlsruhe
Lysis-Puffer (10x)	Biolabs, New England
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Milchpulver, fettfrei	Biorad, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Nukleotidmix (Je 100mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Sigma, Deisenhofen
PBS (Dulbeccos)	Gibco BRL, Karlsruhe

PCR-Puffer (5x Konz.)	Invitrogen, Groningen
PMSF	Boehring, Mannheim
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Reinstwasser	Braun, Melsungen
Roti-Load1 (4x Konz.)	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Riedel de Haen, Hannover
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris-Base	US Biochemical, Cleveland
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Tween 20	ICN Biomedicals, Eschwege

### 3.1.4 Molekularbiologische Chemikalien

#### 3.1.4.1 Restriktionsendonukleasen und Plasmide

EcoRI	Boehringer, Mannheim
Prokaryontischer Klonierungsvektor pCR 2.1	Invitrogen, Groningen

Dieser Vektor ist im Topo TA Cloning Kit der Firma Invitrogen enthalten. Der Vektor (Abbildung 3.1) liegt linearisiert vor und besitzt an den freien 3'-Enden ein überhängendes Thymidin. Diese Enden können mit den 3'-überhängenden Adeninen, die durch die *Taq*-Polymerase an das Amplifikat angelagert werden, Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Der Vektor besitzt zusätzlich die Möglichkeit, den Einbau eines PCR-Produktes durch den Verlust der *LacZ*-Genfunktion zu erkennen. Bakterienkolonien, die einen Vektor mit Insert enthalten, erscheinen auf IPTG/X-Gal-haltigen Agarplatten weiß.

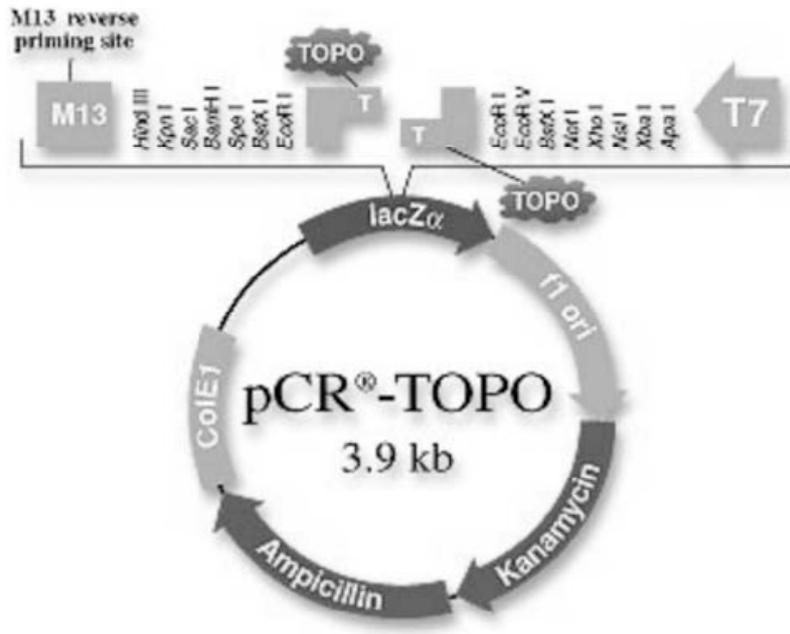


Abbildung 3.1: Aufbau des Topo-TA-Cloning Vektors pCR 2.1.

### 3.1.4.2 Weitere Enzyme

*Ampli Taq Gold*-Polymerase

Perkin Elmer, Weiterstadt

M-MLV Reverse Transkriptase

Promega, USA

### 3.1.4.3 DNA-Längenstandards

DNA Molecular Weight Marker XIV

Roche Applied Science, Penzberg

Fragmente einer Länge von 100 bis 2642 bp

Lambda DNA/Eco130I (StyI) Marker

Fermentas, St. Leon-Rot

Fragmente einer Länge von 421 bis 19329 bp

### 3.1.4.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden mit dem Programm Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) ausgewählt und von der Firma Operon, Köln synthetisiert.

Sequenz Name	Sequenz 5'-3'
PDK1-AexpF1	AGCGCTGCGGGGGAG
PDK1-AexpF2	GCGCCGACGCGGGGC
PDK1-AexpF3	ATGGCCAGGACCACCAG
PDK1-cDNA-3AF	GGAGGAGGACGCTGAGGAG
PDK1-cDNA-3AbR	CACGATCTCAGCCGTGTAAA
PDPK1-1F	GGAGGAGGACGCTGAGGA
PDPK1-1R	CCGGCTGCAGGTAAGGAG
PDPK1-2F	TAGTCCGTGCATTGAGAGCA
PDPK1-2R	ACCAGCCTTGCTTGGAGTCT
PDPK1-3:4F	AGGCCAGTGTCCTGGTTAT
PDPK1-3:4R	GGGAACACACAGGGTCTGAT
PDPK1-5F	CGGAGTAAACCTGCTCCAAA
PDPK1-5R	GTGAGCCAAACGGTCACTG
PDPK1-6F	TCGTTCAATTTGTTTTAGCA
PDPK1-6R	CTCCTCAGAAGTCGCTTCC
PDPK1-7F	CGGACAAGTCTGGCTCCTG
PDPK1-7R	GGCCACCAAATCACTCTCT
PDPK1-8:9F	ACTGGGCTTGTCGCTTGAT
PDPK1-8:9R	GCAGGTTGAGAGGACTCAGG
PDPK1-10F	GGTTTGGGTTTCTTTGGTCA
PDPK1-10R	TTTCGGCTACAAATCACACG
PDPK1-11F	GGCTGGGGTTTTAGGACCTT
PDPK1-11R	AAAGGCACCCACCATAAGC
PDPK1-12F	AGGAGGAGCGTGGAGAATTT
PDPK1-12R	CTCCCCTAAGCTGGAGTCG
PDPK1-13:14F	CCCTCTAGGCTCCAGGAGAT
PDPK1-13:14R	TGGCAGGTGGTCTGGAAG
PDPK1_13-14-R2	AAAAATGCTGCAAGGTTTCC
PDK1-cDNA-3Ak1R	TTCTCTGGAGGTTGCCAGTT
PDK1-cDNA-3Ak2F	CAATGGTGAGGACCCAGACT
PDK1-cDNA-3Ak2R	ATCGGGTACAGGTCTCATCG

PKBbBamH1-F	CCGGATCCATGAATGAGGTGTCTGTCATC
PKBb-FLKpnl-R	CCGGTACCTCACTCGCGGATGCTGGCCGAG
PKBb-SVKpnl-R	CCGGTACCTCATGCCATGCTTCTCCCATTGC
PKBbA431T-F	GCCACCCTTCAAACCTCAGGTAC GTCCGAGGTGACACAAGGTAC
PKBbA431T-F-r	GTACCTTGTGTCGACCTCGGACGT GACCTGAGGTTTGAAGGGTGGC
PKBbS359F-F	CCAGGACCACGAGCGCCTCTTCGA GCTCATCCTCATGGAAGAG
PKBbS359F-F-r	CTCTTCCATGAGGATGAGCTCGAA GAGGCGCTCGTGGTCCTGG
PDK1-cDNA-2R	CTAACCGCTTTGTGGCATCT
PDK1-cDNA-2F	TCCGAGCTGGAAACGAGTAT
PDPK1-cDNA-F	GAGGAGGACGCTGAGGAG
PDPK1-cDNA-R	TGGCAGGTGGTCTGGAAG
AKT2splice-12F	ACCCTTCAAACCTCAGGTCA
AKT2splice-13R	CTGGCCGAGTAGGAGAAGT
AKT2splice-12aR	AGGCTGTCATCACCATCTCC
Oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTT

**Tabelle 3.1: Verwendete Oligonukleotide.**

### 3.1.4.5 Flourogene Sonden

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

### 3.1.5 Verwendete Kit-Systeme

AbiPrism BigDyeTerminator Kit v.1.1	Applied Biosystems, Foster City
QIAamp DNA Mini-Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Maxi Kit	Qiagen, Hilden
HighPure PCR Purification Kit	Roche, Mannheim
RNAgent	Promega, USA
Sephadex G-50 Superfine	Sigma
TaqMan Universal PCR Master Mix	Promega, USA
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen, Groningen

### 3.1.6 Puffer und Lösungen

#### 3.1.6.1 Probenauftragungspuffer

SUBSTANZ	VOLUMEN
Wasser	3,75 ml
Glycerin	5 ml
TAE 40X	250 µl
SDS 0,5%	1 ml
Bromphenolblau, Xylencyanol	1 ml

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des Probenauftragungspuffers.

#### 3.1.6.2 PCR- Puffer A-B-C-D

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

Puffer	MgCl <sub>2</sub> Konzentration	MgCl <sub>2</sub> 500 mM	PCR-Wasser
A	7,5 mM	375 µl	2130 µl
B	10 mM	500 µl	2000 µl
C	12,5 mM	625 µl	1880 µl

D	17,5 mM	875 µl	1630 µl
---	---------	--------	---------

**Tabelle 3.3: Verwendete Puffer.**

### 3.1.6.3 M-MLV RT 5X Reaktions-Puffer

Substanz	Menge (Angaben des Herstellers)
Tris-HCl (pH 8,3 bei 25° C)	250 mM
KCl	375 mM
MgCl <sub>2</sub>	15 mM
DTT	50 mM

**Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Reaktionspuffers.**

### 3.1.7 Medien

#### 3.1.7.1 Medienkomponenten für die Bakterien-Zellkultur

- LB-Medium (pro Liter H<sub>2</sub>O):  
 (Fertigpulver Gibco BRL Karlsruhe)
  - 10 g Pepton aus Fleisch
  - 5 g Hefeextrakt
  - 10 g NaCl
- LB-Agar (pro Liter H<sub>2</sub>O):  
 (Fertigpulver Gibco BRL Karlsruhe)
  - 10 g Pepton aus Fleisch
  - 5 g Hefeextrakt
  - 10 g NaCl
  - 12 g Agar
- SOC-Medium (pro Liter H<sub>2</sub>O)  
 (Fertigpulver Invitrogen, Groningen)
  - 20 g Pepton aus Fleisch
  - 5 g Hefeextrakt
  - 0,5 g NaCl
  - 0,186 g KCl
  - 2,4 g MgSO<sub>4</sub> Heptahydrat
  - 20 mM Glucose

Die aufgeführten Medien wurden in deionisiertem Wasser angesetzt. In sterilem Zustand benötigte Medien wurden für 20 min bei 1,3 bar autoklaviert.

### **3.1.8 Tumorproben**

#### **3.1.8.1 Tumorbank zur Analyse von genomischer DNA**

Die untersuchten Proben wurden anonymisiert verwendet worden und stammten von Patienten, die sich im Zeitraum von 2002 bis 2005 in der gastroenterologischen Abteilung der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar einer Koloskopie unterzogen hatten und bei denen ein klinisch als auch histologisch gesichertes kolorektales Karzinom diagnostiziert worden war. Die Patienten hatten der genetischen Untersuchung ihres Tumormaterials, über die sie schriftlich in Kenntnis gesetzt worden waren, durch Unterschrift zugestimmt.

Im Rahmen der koloskopischen Untersuchung wurden kleine Gewebeprobe entnommen und hieraus DNA mittels des QIAmp DNA Mini Kit gewonnen. Von allen Proben war des weiteren der MSI-Status (Mikrosatelliteninstabilität) bekannt.

#### **3.1.8.2 Tumorbank zur Analyse von mRNA**

Die Gewinnung der mRNA für diese Doktorarbeit erfolgte aus den Gewebeprobe einer Tumorbank des Instituts für Humangenetik und war freundlicherweise von Herrn Professor Cornelius Welter zur Verfügung gestellt worden. Die Tumorbank umfasste Gewebeprobe 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 waren teils endoskopisch und teils operativ gewonnen worden, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und seitdem bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert worden. Die Genehmigung der Untersuchungen erfolgte durch das persönliche Einverständnis der Patienten.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von Mullis und Saiki (Mullis *et al.*, 1987; Saiki *et al.*, 1988) entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur spezifischen Vermehrung von DNA-Fragmenten *in vitro*. Sie basiert auf der Hybridisierung zweier Primer, die den zu untersuchenden DNA-Abschnitt flankieren, mit der denaturierten Ausgangs-DNA. Diese doppelsträngigen Bereiche dienen nun als Initiationsstellen der Replikation für die hitzestabile *Thermus aquaticus*-Polymerase (Taq-Polymerase) bzw. die von dieser Polymerase abgeleiteten Polymerasen. Nach Aktivierung der in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen *AmpliTaq Gold*-Polymerase durch eine Vorinkubation von 10-12 min bei 95°C folgen eine Reihe sich wiederholender Zyklen, bestehend aus der Denaturierung der synthetisierten DNA-Stränge, der Hybridisierung der Oligonukleotide und der Elongation durch die Polymerase. Dies führt zur exponentiellen Akkumulation der spezifischen DNA-Fragmente.

Die Fehlerquote der Taq-Polymerase ist mit 1 zu 10.000 sehr gering. Dies garantiert eine hohe Spezifität bei großer Ausbeute der Reaktion. In dieser Arbeit wurde zur Amplifikation der Exons 1 bis 14 des *PDK1*-Gens folgendes Standard-PCR-Pipettierschema (Tabelle 5 und 6) angewendet:

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

Tabelle 3.5: Standard-PCR-Pipettierschema 50 µl Ansatz (Angaben in µl).

Zusammensetzung	Einzeln	Mastermix	
Wasser		4,7	42,3
Puffer	A/B/C/D	6	54
Nucleotide Mix	10 $\mu$ M (2,5 $\mu$ M each)	3	27
Primer Forward 10 $\mu$ M		3	27
Primer Revers 10 $\mu$ M		3	27
Ampli-Taq-Gold-Polymerase		0,3	2,7
DNA	1:50 oder 1:100	5	aliquotieren auf 20
Gesamtvolumen		30	

**Tabelle 3.6: Standard-PCR-Pipetierschema 30  $\mu$ l Ansatz (Angaben in  $\mu$ l).**

Alle PCR-Reaktionen wurden in ABI9600- oder 9700-Cyclern durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurden als Standard-PCR-Bedingungen folgende Parameter verwendet:

	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	infinity	4° C

**Tabelle 3.7: Standard-PCR-Programm.**

Die erhaltenen PCR-Produkte konnten anschließend gelelektrophoretisch analysiert und zur weiteren Anwendung aufgereinigt werden.

### 3.2.2 Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihren Molekulargewichten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Zur Auftrennung wurden 2%-ige Agarosegele, die sich vor allem zur Auftrennung kleinerer PCR-Produkte (ca. 200 bis 600 bp) eignen, eingesetzt.

Zur Herstellung eines 2%-igen Agarosegels wurden 2 g Agarose in 100ml 0,5x TBE -Puffer in einem Mikrowellengerät geschmolzen, Ethidiumbromid (230  $\mu$ g/ml) zugegeben und nach

dem Abkühlen auf ca. 60°C in eine Gießkammer eingefüllt. Anschließend wurden ein bis zwei Probekämme mit 14 bzw. 20 Zähnen eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine mit 0,5x TBE-Puffer befüllte Horizontal-Gelapparatur gelegt und die mit DNA-Puffer versetzten Proben (2µl Probenpuffer + 10µl Probe) in die Geltaschen gegeben. Die DNA-Fragmente wurden ca. 20min mit einer Feldstärke von etwa 1-5 V/cm<sup>2</sup> getrennt. Anschließend wurden die Banden mit UV-Licht (305 nm) sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera durch orange-rot Filter fotografiert. Die Fragmentgrößen wurden durch gleichzeitiges Auftrennen eines DNA-Längenstandards bekannter Größe bestimmt.

### **3.2.3 Aufreinigung der DNA-Fragmente**

Die spezifischen DNA-Fragmente wurden nun mittels *HighPure PCR product purification kit* der Firma Roche Applied Science von den PCR-Primern, der DNA-Polymerase, Salzen und den freien dNTPs getrennt. Die Grundlage dieser Aufreinigung bildet das spezielle Glas-Fiber-Vlies, welches nur DNA-Fragmente mit einer Mindestlänge von 100 bp bindet, wodurch die Oligonukleotid-Primer sowie freie Nukleotide aus dem PCR-Produkt selektiv entfernt werden.

Die Volumenmenge der Probe wurde dabei mit dem fünffachen Volumen des Bindungspuffers versetzt und auf eine Säule aufgetragen. Nach einminütigem Zentrifugieren bei 13000 U/min wurden 500µl Wasch-Puffer auf die Säule hinzugegeben und bei 11100 U/min nochmals zentrifugiert. Hiernach erfolgte eine weitere Zentrifugation mit 200µl Wasch-Puffer. Dieser Durchfluss wurde wiederum verworfen. Um die gereinigte DNA von der Membran zu eluieren, wurde nach Zugabe von 50µl Eluations-Puffer erneut zentrifugiert (11100 U/min, 1min). Es wurden jeweils 8 Proben gleichzeitig aufgereinigt.

### **3.2.4 Sequenzierungs-PCR**

#### **3.2.4.1 Prinzip der Kettenabbruchmethode**

Die Sequenzierung diente zur Analyse der untersuchten Proteine *PDK1* sowie *PKBβ* im Hinblick auf Mutationen und Polymorphismen.

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem *AbiPrism BigDye*-System durchgeführt. Das System beruht auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977; Maxam, 1977). Hierbei werden zu den Desoxy-Nukleotid-Triphosphaten (dNTPs) fluoreszenzmarkierte 2-,3-Didesoxy-Nukleotidtriphosphate (ddNTPs) in die

Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Der Einbau dieser ddNTPs in den Zweitstrang bewirkt den Abbruch der Synthese, so dass man an jeder Base farbmarkierte Abbrüche des PCR-Produktes enthält, die man dann elektrophoretisch auftrennen kann.

Um die nicht eingebauten fluoreszenten Nukleotide aus der Reaktion zu entfernen, wurde die Sequenzierungsreaktion mittels weiter unten beschriebener Größenausschluss-Chromatographie gereinigt. Die durchgeführte Reinigung entspricht einer Gelfiltration. Hierbei bleiben die kleinen Moleküle in der Matrix hängen und die großen eluieren im Ausschlussvolumen.

Die aufgereinigte Sequenzierungsreaktion wurde mit einem ABI3100 Sequenziergerät durch Kapillarelektrophorese und Detektion der Fluoreszenzsignale analysiert. Die erhaltenen Fluoreszenzsignalkurven wurden anschließend auf Mutationen und Polymorphismen untersucht.

### 3.2.4.2 Ansatz der Sequenzierungs-PCR

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

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

**Tabelle 3.8:** Sequenzierungs-PCR-Pipettierschema (Angaben in  $\mu$ l).

### 3.2.4.3 Sequenzierungs-PCR-Programm

Nach dem Ansetzen der Proben wurden diese kurz abzentrifugiert und für 35 Zyklen im Thermocycler belassen. Die Bedingungen der als Sequenzierungs-PCR bezeichneten Polymerasekettenreaktion gehen aus der Tabelle 9 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	infinity	4° C

**Tabelle 3.9: Sequenzierungs-PCR-Programm.**

### 3.2.5 Größenausschlusschromatographie

Für diese Doktorarbeit erfolgte die Größenausschluss-Chromatographie mit Hilfe des *Sephadex G-50 dry bead diameter 20-50µl*. Dabei wurde eine konstante Menge des Sephadex-Pulvers mit 300µl 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. Nach fünfminütiges Zentrifugieren bei 910g (2500 Umdrehungen/min) wurden die Bestandteile des Big Dye (dNTP, Polymerase, Puffer) von dem Produkt der Sequenzierungs-PCR getrennt. Unter die Säule wurde eine Rack-Platte platziert, die auch als Probentransport- und Untersuchungsplattform für den Sequenzierer verwendet wurde; in diese eluierte entsprechend seines hydrodynamischen Volumens das Sequenzierungs-PCR-Produkt.

### 3.2.6 Polyacrylamid Gelelektrophorese (Sequenzierung)

Im Anschluss an die Größenausschluss-Chromatographie wurden die Proben mittels Kapillar-Polyacrylamid Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt. Der Fluoreszenznachweis erfolgte mit einem DNA-Sequenzierer (*AbiPrism 3100 Genetic Analyzer*), der die Signale digital umwandelte, so dass sie als Chromatogramme mit Hilfe der Sequenzierungssoftware *DNA Sequencing Analysis 3.7* von Applied Biosystems dargestellt werden konnten.

Die folgenden Angaben beinhalten spezifische Einstellungen dieses Sequenzierautomaten.

**Dye Set:** E

**Mobility File:** DT3100POP6(BD)v2.mob

**Comment:** No comment

**Projectname:** 3100\_Project1

**Run Module1:** • StdSeq50 POP6DefaultModule (standardmäßig)  
• StdSeq50 POP6 InjTime300s (für schwache Proben)

**Analysis mode:** BC-3100POP6SR SeqOffFtOff.saz

### 3.2.7 cDNA Generierung

#### 3.2.7.1 Isolierung der mRNA

Die Isolierung der RNA und speziell der gesuchten mRNA aus den Tumorproben erfolgte mit dem *RNAgents Total RNA Isolation System* der Firma Promega. Die Reinheit und Vollständigkeit von RNA, welche aus dem Gewebe isoliert wurde, sind entscheidend für weiterführende Untersuchungen, wie z. B. Northern-blot-Analyse, *In-vitro*-Translation und die für diese Arbeit durchgeführte Reverse Transkription.

Mit Hilfe des RNA-Isolations-Systems konnten auch bei geringer Gewebemenge mehrere RNA-Aufreinigungen gleichzeitig durchgeführt werden.

Die erfolgreiche Isolierung intakter RNA besteht aus 4 Schritten.

1. Effektive Spaltung der Zellen
2. Denaturierung der Nukleoproteinkomplexe
3. Inaktivierung der endogenen Ribonuklease (RNasen)
4. Entfernung der DNA und Proteine

Die Tumorproben wurden mit einem Ultra Turrax T25 in 6 ml Denaturierungs-Lösung auf Eis homogenisiert. Es wurden jeweils 500 mg Tumorgewebe verwendet. Die Ausschaltung der endogenen Ribonuklease erfolgte durch die Denaturierungslösung. Das Entpacken der RNA erfolgte durch Guanidin-Thiocyanat mit N-Lauryl-Sarcosin, ebenfalls Bestandteile aus der Denaturierungslösung. Alle durchgeführten Schritte erfolgten auf Eis, was die Rate der RNA-Zerstörung signifikant senkt (Han *et al.*, 1987). Es wurden je 600 µl Natriumacetat und 6ml Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol hinzupipettiert. Die Phenol-Chloroform-Isoamyl-Alkohol-Lösung diente dazu, die chromosomale DNA aus den Proben zu entfernen. Nach 15 Minuten Einwirkzeit auf Eis wurde die Zentrifugation für 20-25 Minuten bei 4° C und 10000 g durchgeführt. Verunreinigungen wurden durch Säure-Extraktion des Phenol-

Chloroform-Isoamyl-Alcohols entfernt (Perry *et al.*, 1972). 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 mindestens 4 ml der anorganischen Phase abpipettiert. Die RNA wurde durch Präzipitation mit Isopropanol aus der anorganischen Phase wiedergewonnen. Nach einem Kühschritt von mindestens 5 Minuten bei -20° C wurde bei den gleichen Zentrifugeneinstellungen 10 Minuten lang zentrifugiert, so dass sich ein RNA-Pellet am Gefäßboden bildete. Der Überstand wurde verworfen und zum RNA-Pellet wiederholt 2,5ml Denaturierungslösung hinzugeben sowie 2,5ml Isopropanol. Das RNA-Pellet wurde dadurch resuspendiert. Es folgten Kühl- und Zentrifugationsschritte. Die RNA wurde in der Kühlzentrifuge nochmals pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit eiskaltem 75%-igen Ethanol präzipitiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das RNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in 400µl nucleasefreiem Wasser gelöst.

Nun wurde mit Hilfe des Spektralphotometers die RNA-Konzentration ermittelt. Die Messung erfolgte zwischen 220 und 320 nm in Quarzküvetten. Entscheidend für die Auswertung sowie für die Reinheitsbestimmung waren die Extinktionen bei 260 und 280 nm wegen des Absorptionsmaximums der Nukleotide bei 260 nm. Zur Vermeidung einer hohen Fehlerquote wurden nur Verdünnungen gemessen, deren Absorption zwischen 0,1 und 1 lag.

### **3.2.7.2 Reverse Transkription**

Da die RNA weitaus anfälliger für Verdau und Zerfall ist, wurde die isolierte reine mRNA in cDNA umgeschrieben. Dadurch wurden weitere PCR-Analysen möglich. Dies wurde mittels Reverse Transkription (RT) durchgeführt.

Die für diese Arbeit verwendete *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase* (M-MLV RT) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die für cDNA-Synthese von mRNA-Abschnitten, die länger als 5kb sind, geeignet ist, da ihre RNase-H-Aktivität schwächer ist als bei der sonst gewöhnlich genutzten *Avian Myeloblastosis Virus Reversen Transkriptase* (AMV-RT) (Roth *et al.*, 1985).

Als Oligonukleotid-Primer fungierte bei der Reversen Transkription Oligo-dT. Dieser Primer lagert sich an den für mRNA typischen Poly-A-Schwanz an und bildet somit eine optimale Start-Stelle für die Reverse Transkriptase. Es wurden jeweils 2µg RNA sowie 1,5 µg Oligo-dT benötigt.

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

Der Rest der mRNA wurde bei -80° C gelagert. Je nach der mit Hilfe des Spektralphotometers ermittelten RNA-Konzentration wurde das Volumen der Reagenzien im Pipettierschema in Tabelle 10 angepasst. Das Ansetzen der Reversen Transkription erfolgte auf Eis.

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

**Tabelle 3.10: Pipettierschema der Reversen Transkription. X entspricht der spektralphotometrisch ermittelten RNA-Konzentration. (Teil 1).**

Danach wurde der Ansatz sofort für 5 Minuten bei 70° C in einem Thermomixer erhitzt. In dieser Zeit löste sich die Sekundärstruktur der mRNA. Die Proben wurden sofort eine Minute auf Eis schockgekühlt, wodurch ein Wiederaufbau der Sekundärstruktur der mRNA verhindert wurde. Dem Ansatz wurden zusätzlich Reagenzien aus der Tabelle 11 hinzugefügt.

Reagenz	Volumen in $\mu\text{l}$
M-MLV 5X Reaktion Buffer	5
dNTP mix 2,5 mM each	5
M-MLV Reverse Transkriptase	1
Gesamtvolumen	25

**Tabelle 3.11: Pipettierschema der Reversen Transkription (Teil 2).**

Der RT-Reaktions-Ansatz wurde für 60 Minuten bei 42° C inkubiert. In dieser Zeit wurden die 2  $\mu\text{g}$  RNA aus den Tumorproben in cDNA revers transkribiert.

### 3.2.7.3 cDNA-PCR

Aus der Gesamtheit der inzwischen in cDNA umgeschriebenen mRNA eines Tumorgewebes wurden die für *PDK1* 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 frei von DNA-Verunreinigungen waren. Auch hier hatte es sich je nach Probe bewährt, neben den 50µl Ansätzen auch 30µl Ansätze für cDNA-PCR anzufertigen. Die Proben wurden in Staffeln von je 8 Proben mit einer Leerprobe angesetzt. Das Ansetzen der cDNA-PCR erfolgte auf Eis. In einem Vorversuch wurde für jeden Abschnitt der passende Puffer ermittelt.

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

**Tabelle 3.12: cDNA-PCR-Pipettierschema 50µl Ansatz (Angaben in µl).**

Zusammensetzung	Einzel	Mastermix für 9 Proben
Wasser	14,2	127,8
Puffer A/B/C/D	6	54
Nucleotide Mix 10µM (2,5µM each)	3	27
Primer Forward 10µM	3	27
Primer Revers 10µM	3	27
Ampli-Taq-Gold-Polymerase	0,5	4,5
DNA	0,5	aliquotieren auf 29,5
Gesamtvolumen	50	

**Tabelle 3.13: cDNA-PCR-Pipettierschema 30µl Ansatz (Angaben in µl).**

Nach dem Ansetzen der Proben wurden diese kurz abzentrifugiert und für 40 Zyklen im Thermocycler belassen. Die Bedingungen der als cDNA-PCR bezeichneten Polymerasekettenreaktion gehen aus der Tabelle 14 hervor. Beim Programmieren des Thermocyclers wurde das jeweilige Probenvolumen berücksichtigt.

	Dauer (in min)	Temperatur
Denaturierung/Aktivierung der HotStart-Polymerase	5	95° C
Denaturierung	0,30	95° C
Annealing	0,30	55° C
Extension	1,5	72° C
Final Extension	10	72° C
Kühle Lagerung	infinity	4° C

**Tabelle 3.14: cDNA-PCR-Programm.**

Die darauf folgenden Schritte entsprechen denselben oben beschriebenen Protokollen für die Tumorproben der genomischen DNA.

### 3.2.8 Transformation der Plasmide

Unter Transformation versteht man in diesem Zusammenhang die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien. Zur Anlagerung der DNA an die Bakterienzellen wurden 50 µl superkompetente *E.coli* zusammen mit 1 µl der PCR-Reaktion in ein bereits vorgekühltes Eppendorf-Gefäß pipettiert und auf Eis für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden, um die Aufnahme der DNA in die Zelle zu erleichtern, für 45 Sekunden einem Hitzschock von 42° C ausgesetzt und anschließend erneut für 3 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl SOC Medium wurde die Zellsuspension für 1 Stunde bei 37° C und 1400 U/min geschüttelt. Dann wurden sie à 200µl auf LB+Ampicillin-Platten ausgestrichen und bei 37° C im Brutschrank kultiviert.

### 3.2.9 Plasmid-Mini-Präparation

Zur Aufreinigung von bis zu 20 µg Plasmid-DNA wurde der Qiagen Spin Miniprep Kit verwendet. Hierfür wurde eine *E.coli*-Übernachtskultur in LB+Ampicillin Medium bei 15000 U/min sedimentiert. Die Pellets wurden anschließend in einem RNase-haltigem Puffer

resuspendiert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Danach wurden die Zellen unter alkalischen Bedingungen und unter Anwesenheit von SDS lysiert. Nach der Neutralisation wurde bei 13000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert, um die lösliche Plasmid-DNA von einem Präzipitat aus chromosomaler DNA, Zellbestandteilen, Proteinen und SDS zu trennen. Der Überstand mit der löslichen Plasmid-DNA wurde auf eine Säule pipettiert und bei 13000 U/min bei 4° C für 1 Minute zentrifugiert. Es folgten ein Waschschrift mit PE-Puffer und die Elution der Plasmid-DNA mit 50 µl Elutionspuffer. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde anschließend bei -20° C gelagert.

### **3.2.10 Qualitativer Nachweis der Spleißvariante 12a**

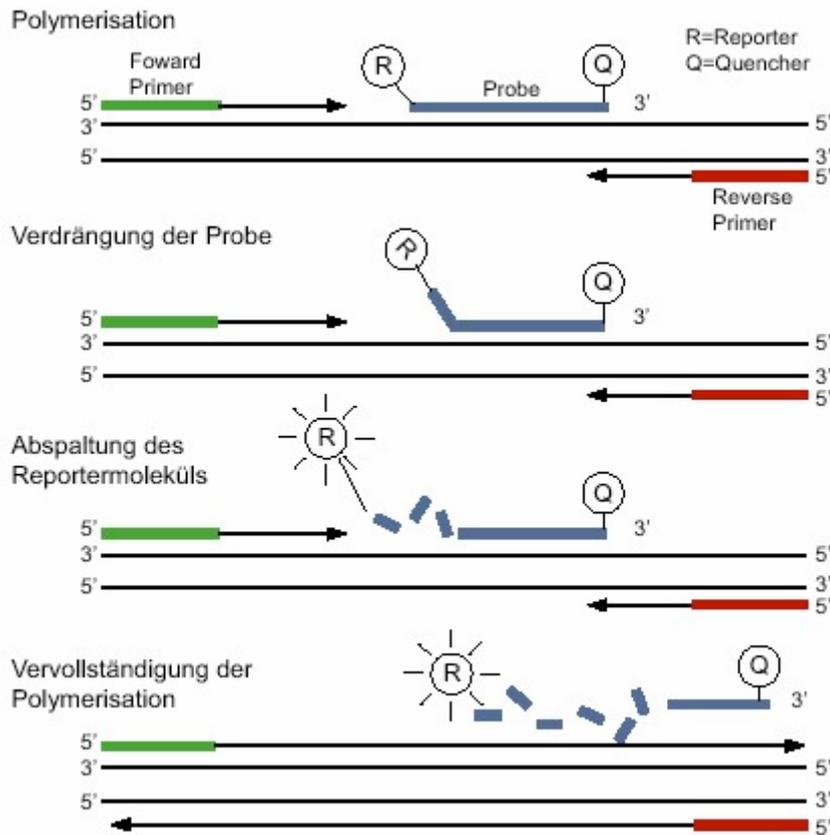
Der qualitative Nachweis der alternativen Spleißvariante 12a des Proteins PKB $\beta$ /AKT2 erfolgte nach den gleichen Protokollen wie die Aufreinigung und Sequenzierung zur Mutationssuche des Proteins PDK1. Die cDNA-Proben wurden zunächst der cDNA-PCR unterzogen, danach folgte die Gelelektrophorese, bei der das Vorhandensein der Spleißvariante 12a verifiziert wurde. Nach der Aufreinigung mit dem *product purification kit* und der Sequenzierungs-PCR folgte die Größenausschluss-Chromatographie und die eigentliche Sequenzierung.

### **3.2.11 Quantitativer Nachweis der Spleißvariante 12a**

#### **3.2.11.1 Prinzip der Real-Time-PCR**

Durch die Real-Time PCR besteht die Möglichkeit, während der Durchführung der PCR konstant das dabei entstehende PCR-Produkt zu messen. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus (Holland *et al.*, 1991).

Die Durchführung erfolgt entweder durch die Messung eines Fluoreszenz-Farbstoffes, der auf die Anlagerung an die DNA mit einer Verstärkung der Fluoreszenz reagiert (SYBR-Green), oder es wird ein drittes, mit einem Farbstoff und einem Quencher markiertes Oligonukleotid als Sonde (Taqman-Sonde) verwendet.



**Abbildung 3.2: Grundprinzip der Taqman Real-Time-PCR**

Die Taqman-Sonde, die an die Zielsequenz zwischen den beiden PCR-Primern hybridisiert, enthält einen Reporter-Farbstoff am 5'-Ende und einen Quencher-Farbstoff am 3'-Ende. Die Fluoreszenz wird durch die räumliche Nähe von Reporter und Quencher supprimiert.

Abkürzungen: 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 fluoreszenten 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. Diesen Vorgang bezeichnet man als Fluoreszenz- (oder Förster-) Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Bei Spaltung der Sonde wird die Nähe von Quencher und Reporter aufgehoben. Hierdurch kann nun kein FRET mehr stattfinden. Dadurch wird das Reporter-Signal stärker und das Quencher-Signal schwächer. Das Reporter-Signal stellt ein Maß für den Fortschritt der PCR dar (Holland *et al.*, 1991; Heid *et al.*, 1996). Die dabei gemessene Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Produktmenge.

Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines jeden PCR-Zyklus 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 (Tyagi, 1996).

### 3.2.11.2 Ansatz der Real-Time-PCR

Das Pipettieren wurde durch den Pipettier-Roboter *Liquid Workstation epMotion 5070* durchgeführt. Dadurch konnte eine sehr große Anzahl an Proben in kürzester Zeit in die MikroAmp optical 96 Well Reaction Plate übertragen werden. Die cDNA wurde zuvor 1:1 mit Wasser verdünnt. In Tabelle 15 ist der hierfür genutzte Pipettieransatz dargestellt.

Substanz	Volumen (Angaben in $\mu$ l)
Wasser	8
Taqman PCR Mastermix	10
Custom Taq Man Assay (Fluorogene Sonden)	1
cDNA	1
Gesamtvolumen:	20

Tabelle 3.15: Real-Time-PCR-Pipettierschema.

### 3.2.11.3 Real-Time-PCR-Programm

Nach dem Pipettieren wurden die Ansätze mit einer speziellen Folie (Optical Adhesive Cover) überklebt und kurz abzentrifugiert. Die Bedingungen der Polymerasekettenreaktion gehen aus der Tabelle 16 hervor. Die Reaktionen wurden in einem Real-Time-PCR-Gerät ABI-Prism 7000 durchgeführt. Es folgte eine Messung über 50 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	infinity	4° C

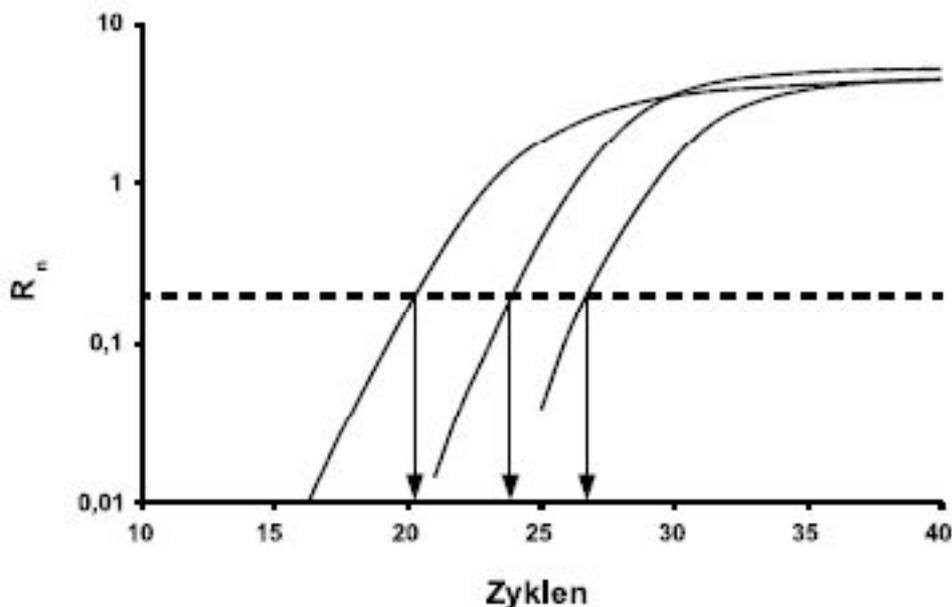
Tabelle 3.16: Real-Time-PCR-Programm.

### 3.2.11.4 Auswertung der Real-Time-PCR

Im folgenden Abschnitt werden die Details der Quantifizierungsstrategien der Real-Time-PCR ausgehend von den mathematischen Grundlagen erläutert. Hierbei sollen auch die Möglichkeiten und Grenzen aufgezeigt werden.

Während der PCR werden kontinuierlich Fluoreszenzen über ein Spektrum von 500 bis 660 nm aufgezeichnet. Danach erfolgt eine automatische Analyse der Rohdaten mit Hilfe der SDS-Software.

Jeder Reaktion ist die passive Referenz ROX in konstanter Konzentration beigelegt. Es wird für jeden Zeitpunkt ein Quotient gebildet aus dem Signal des verwendeten Reporter-Farbstoffes (R) und dem Signal von ROX. Der hieraus gebildete Quotient wird als normiertes Reporter-Signal ( $R_n$ ) bezeichnet. Aus dem Verlauf von  $R_n$  über die Zeit ergibt sich der Amplifikations-Plot. Die hieraus entstehende Normierung dient dem Ausgleich von etwaigen Fluoreszenzschwankungen innerhalb der verwendeten Reaktionsgefäße.



**Abbildung 15: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse einer Real-Time-PCR.**

*Produktamplifizierung bei der Real-Time-RT-PCR. Dargestellt sind die Kurvenverläufe bei von links nach rechts abnehmender ursprünglicher Kopienzahl der gemessenen Sequenz.  $R_n$  (normiertes Reportersignal) gibt die Fluoreszenz an, die gegen die Zyklenzahl aufgetragen wird.*

Im ersten Teil der PCR schwankt  $R_n$  um einen konstanten Wert. Dieser Wert entspricht dem Fluoreszenzsignal der verwendeten Sonde. Ein Anstieg von  $R_n$  ist erst sichtbar nach einer bestimmten Anzahl an gespaltenen Sondenmolekülen. Der weitere Verlauf zeigt eine exponentielle Phase und eine Plateauphase. Die Quantifizierung erfolgt in der exponentiellen Phase.

Es wird ein spezifischer Wert für  $\Delta R_n$  als sogenannter Threshold festgelegt. Als eine der zentralen Größen in der Real-Time-PCR gilt der Ct. Dieser Ct-Wert (Threshold Cycle, ausgedrückt in Zyklen) ist der Zeitpunkt, an dem die gemessene Intensität im Amplifikation Plot den Threshold überschreitet. Er ist ein relatives Maß für die Quantität an Ausgangskopien in dem untersuchten Reaktionsgefäß.

Der Ct-Wert beschreibt also den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Mathematisch lässt sich der Ct mit Hilfe der folgenden Formel ermitteln:

$$Ct = \Delta R_n / \Delta \text{Zyklen}$$

Der Ct-Wert markiert somit den Anfang der exponentiellen Phase und entspricht der Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Nun muss ein externer Standard verwendet werden, um die quantitative Aussage der verschiedenen Versuche miteinander vergleichen zu können. In der Real-Time-PCR gibt es dazu generell zwei Quantifizierungsstrategien (Pfaffl, 2004).

### **Relative Quantifizierung:**

Durch die Relative Quantifizierung mittels  $\Delta\Delta Ct$ -Methode kann eine Aussage über das Verhältnis von Zielgen zu einem Housekeeping-Gen getroffen werden. Für die Relative Quantifizierung wird eine interne Kontrolle benötigt. Dabei wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes Housekeeping-Gen (HKG) bezogen. Dieser relative Mengenvergleich wird Normalisierung der Expressionsergebnisse genannt (Rasmussen, 2001). 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 (Pfaffl, 2004).

### **Absolute Quantifizierung:**

Das Ziel der absoluten Quantifizierung ist es, dem Ct-Wert einer Reaktion eine Startkopienzahl zuzuordnen. Diese Methode der Quantifizierung wird anhand einer gegebenen Kalibrierkurve durchgeführt, die auf einer Verdünnungsreihe eines geeigneten Standards bekannter Quantität basiert (Pfaffl *et al.*, 2001).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden beide Quantifizierungsstrategien gleichzeitig angewandt. Bei jedem Analyselauf wurden sowohl das Housekeeping-Gen GAPDH als auch eine Verdünnungsreihe von DNA-Plasmiden mit den zu untersuchenden Sequenzen mit zuvor ermittelten bekannten Konzentrationen eingesetzt. Bei dieser Quantifizierung erfolgte die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) über die sog.  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Dabei wurde im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des GAPDH vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct GAPDH}$$

Nach dieser Normierung wurde vom  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der experimentell behandelten Proben der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert einer bekannten Kontrollprobe abgezogen. Dieses Berechnungsmodell wird  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode 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  $2^{\exp[-\Delta\Delta\text{Ct}]}$  (Livak *et al.*, 2001). Bei diesem Berechnungsschema wird eine Verdoppelung der DNA-Menge in jedem Zyklus vorausgesetzt (Pfaffl, 2004).

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Sequenzanalyse des Proteins PDK1 in Tumorproben

#### 4.1.1 Ergebnisse der Sequenzanalyse der genomischen DNA

##### 4.1.1.1 Patientendaten der gDNA

In der vorliegenden Arbeit wurde das *PDK1*-Gen hinsichtlich seiner Bedeutung für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms analysiert. Die Exons dieses Gens wurden auf Sequenz-Abweichungen hin untersucht.

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 Gastroenterologischen Forschungslabors der Universitätsklinik des Saarlandes wurde bereits im Kapitel 3 eingegangen. Das Patientenkollektiv setzte sich zusammen aus n=40 Patienten, von denen 17 weiblich und 23 männlich waren.

Nr.	Patient	Geschlecht	Diagnose	Alter bei Diagnosestellung	MSI
1.	H004	m	Rektumkarzinom	67	neg.
2.	H006	w	Kolonkarzinom prox. desc.	83	neg.
3.	H009	m	Kolon asc./trans.-Karzinom	78	pos.
4.	H010	w	Kolon asc.- Karzinom	77	neg.
5.	H011	w	Kolon asc.- Karzinom	42	pos.
6.	H012	m	Sigma-Karzinom dist.	67	neg.
7.	H021	m	Kolon Adenom	72	neg.
8.	H023	m	Sigma-Karzinom dist.	76	neg.
9.	H035	m	Zoekum-Karzinom	77	neg.
10.	H045	m	Kolon desc.- Karzinom	70	pos.

11.	H047	m	Kolon asc.- Karzinom	81	pos.
12.	H050	m	Zoekum-Karzinom	56	neg.
13.	H061	m	Rektumkarzinom	76	neg.
14.	H062	w	Kolon asc.- Karzinom	69	neg.
15.	H071	w	Kolon asc.- Karzinom	88	neg.
16.	H085	m	Kolon desc.- Karzinom	78	neg.
17.	H086	w	Kolon asc.- Karzinom	41	neg.
18.	H087	w	Rektumkarzinom	74	neg.
19.	H095	m	Rektumkarzinom	40	neg.
20.	H107	w	Kolon trans.- Karzinom	81	neg.
21.	H108	m	Sigma-Karzinom	66	neg.
22.	H116	m	Sigma-Karzinom	72	neg.
23.	H123	m	Kolon desc.- Karzinom	67	neg.
24.	H124	m	Rektumkarzinom	54	neg.
25.	H128	m	Sigma/Kolon desc.- Karzinom	67	neg.
26.	H137	m	Kolon asc.- Karzinom	68	neg.
27.	H141	w	Sigma-Karzinom	79	neg.
28.	H154	w	Kolon desc.- Karzinom	74	neg.
29.	H158	w	Kolon asc.- Karzinom	52	neg.
30.	H186	w	Rektumkarzinom	33	neg.
31.	H195	w	Sigma-Karzinom	64	neg.
32.	H197	w	Kolon desc.- Karzinom	81	neg.
33.	H237	m	Kolon asc.- Karzinom	76	neg.
34.	H239	m	Sigma-Karzinom	79	neg.
35.	H250	m	Zoekum-Karzinom	66	neg.
36.	H304	w	Rektumkarzinom	55	neg.
37.	H408	w	Kolon asc.- Karzinom	67	neg.
38.	H414	w	Rektumkarzinom	69	neg.
39.	H427	m	Kolon asc.- Karzinom	71	neg.
40.	H469	m	Rektumkarzinom	49	neg.

**Tabelle 4.1: Patientendaten der genomischen DNA-Bank**

Die Tabellen 4.2 und 4.3 fassen die Patientendaten aus der Tabelle 4.1 zusammen. Aus ihnen gehen Geschlecht, Alter, Diagnose sowie das Ergebnis der MSI-Untersuchung hervor.

Geschlecht	Jüngste/r	Älteste/r	Altersdurchschnitt	Altersmedian
Weiblich	33	88	66,4	69
Männlich	40	81	61,7	71

Tabelle 4.2: Patientenalter bei der Diagnose (in Jahren)

Geschlecht	Rektumkarzinom.	Kolonkarzinom.	Adenom	MSI-pos.	MSI-neg.
Weiblich	4	12	1	1	16
Männlich	5	16	1	3	20
gesamt	9	28	2	4	36

Tabelle 4.3: Diagnosen des Patientenkollektivs aus der Datenbank der genomischen DNA

*Zoekum-Karzinom, Kolon ascendens-Karzinom, Kolon transversum-Karzinom, Kolon descendens-Karzinom und Sigma-Karzinom wurden unter dem Oberbegriff Kolonkarzinom zusammengefasst.*

#### 4.1.1.2 Überblick über die Sequenz des *PDK1*-Gens in der genomischen DNA

Das *PDK1*-Gen besteht aus 14 Exons, diese sind unterschiedlich lang. Ebenso unterschiedlich ist 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. Für diese Arbeit wurden alle 14 Exons in 40 Tumorproben nach standardisierten Methoden auf Polymorphismen in der DNA-Sequenz untersucht.

<b>E1</b>	gcggggggg
7981	ggggggggggc gggcgacggg gggggcgag gatgagggcg gccattgctg gggctcgcct
8041	tgggggagga ggaagctgag gagggcgga ggcgcgagc gctggggggg agggcgccgc
8101	gcgagcggg ggcctatggc caggaccacc agccagctg
<b>E2</b>	tatga cgcctgccc
27721	atccagtcga gctggtgtt atgttcctgc ccatccccat caatggtgag gaccagact
27781	gagtcacgca cgcctcctgg cttcctctgtt ggcagcaggc agggccccgc catggacggc
27841	actgcagccg agcctcggcc cggcgcggc tccttgacg atgcccagcc tcgcgcgag
27901	cctcggaaga agcggcctga ggacttcaag tttgggaaaa tccttgggga aggctctttt
27961	tccacg
<b>E3</b>	gttgcctt gctcgagaa
31501	ctggcaacct ccagagaata tgcga
<b>E4</b>	ttaaaat tctggagaag cgacatatca
31801	taaaagagaa caaggtcccc tatgtaacca gagagcggga tgtcatgtcg cgcctggatc
31861	acctcttctt tgtaagctt tacttcacat ttcaggacga cgagaagctg t
<b>E5</b>	atttc ggccttagtt atgccccaaa
35581	tggagaacta cttaaatata ttgcgaaaat cggttcattc gatgagacct gtaccgcatt
35641	ttacacggct gagattgtgt ctgctttaga gtacttgccac ggcaagggca tcattccacg
<b>E6</b>	gg
36361	accttaaacg gaaaacatt ttgttaaatg agatatgca catccagatc acagattttg
36421	gaacagcaaa agtcttatcc ccagagagca aacaag
<b>E7</b>	cca gggccaactc attcgtggga acagcgcagt
47461	acgtttctcc agagctgctc acggagaagt ccgctgtca gag
<b>E8</b>	ttc
51301	agacctttgg gctcttggat gcataatata ccagcttctg gcaggactcc caccattccg
51361	agctgg
<b>E9</b>	a acaggtatc ttatatttca gaagatcatt aagttggaa atgactttcc
51661	agaaaaatcc ttcctaagg caagagacct cgtggagaaa cttttg
<b>E10</b>	gtttta gatgccacaa agcgggttagg ctgtgaggaa atggaaggat
53461	acggacctct taaagcacac ccgttctctg agtccgtcac gtgggagaa ctcaccacgc
53521	agacgcctcc gaagctcacc gttacctgc cggctatgtc ggaagacgac gaggactgct
53581	atggcaat
<b>E11</b>	ta tgacaatctc ctgagccagt
56701	ttggctgcat gcaggtgtct tctctctctt cctcacactc cctgtcagcc tcggacacgg
56761	gctgcctccc gaggtcagcc agcaacatag agcagtacat tcaagatctg gactcgaaat
56821	ccctttgaact ggacttacag ttttcogaag atgagaagag gttgttgttg gagaagcagg
56881	ctggcggaaa cctttg
<b>E12</b>	gcacc agtttctaga aaataattta
65821	atactaaaga tgggccctg ggataagcgg aag
<b>E13</b>	ggttt atttgcaga
67141	cgacgacagc tcttgcctac agaaggacca cttttatatt atgtggatcc tctcaacaaa
67201	gttctgaag gtgaatttcc ttggtcacaa gaacttcgac cagaggccaa gaattttaaa
67261	actttctttg tccacag
<b>E14</b>	cctaaca ggacgtatta tctgatggc
67681	cccagcggga acgacacaaa gtgggtcagg aagatccagg aggtttggag gcagcgatac
67741	cagagccacc cggacgcgc tctgcaatga cgtggcctgc ggcgggctg cccttcgctg

Abbildung 4.1: Codierende Sequenz von PDK1 (cRNA) nach den Exons strukturiert.

Abbildung 4.1 zeigt einen Überblick der Exon-Struktur auf cDNA-Ebene und ermöglicht so den Vergleich der einzelnen Exonlängen. Die Tabelle 4.4 gibt die Länge der Fragmente der genomischen DNA in Basenpaaren an. Dank der Tatsache, dass einige Introns von PDK1 sehr

kurz sind, konnten teilweise zwei Exons gleichzeitig durch ein Primer-Paar abgedeckt werden. Dies war bei den Exonpaaren 3+4, 8+9 sowie 13+14 möglich.

Abschnitt	Länge des Fragments (in bp)	Länge nur Exon (in bp)
Exon 1	221	24
Exon 2	423	261
Exon 3+4	568	180
Exon 5	284	144
Exon 6	255	96
Exon 7	266	75
Exon 8+9	537	165
Exon 10	343	174
Exon 11	362	216
Exon 12	194	57
Exon 13+14	805	270

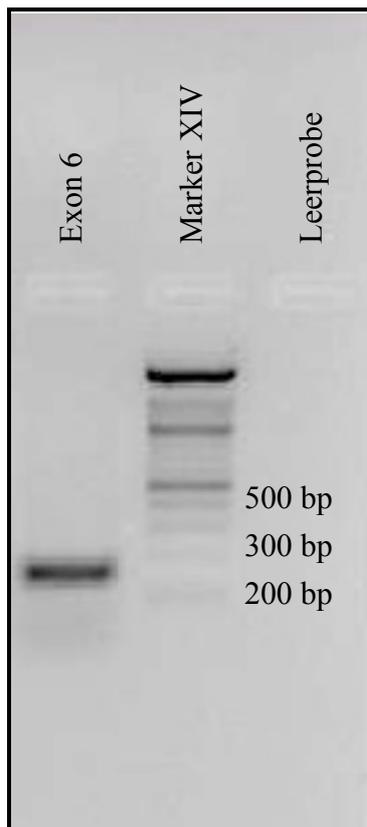
**Tabelle 4.4: Exonlängen.**

Die Ermittlung der Fragmentlänge basiert auf den Angaben des Primer3-Programms. Die angegebenen Fragmente beinhalten auch die Längen der Primer, die zwischen 18 und 22 bp lang sind.

Stellvertretend für die Bearbeitung der einzelnen Exons wird am Beispiel von Exon 6 auf die durchgeführten Untersuchungen eingegangen.

#### **4.1.1.3 Ergebnisse der Gelelektrophorese von Exon 6**

Nach Angaben der Tabelle 4.4 beträgt die Länge des Exon 6 enthaltenden DNA-Fragments 255 bp. In der Abbildung 4.2 wird exemplarisch das Ergebnis der Gelelektrophorese des Exons 6 der Probe 108 und der Leerprobe dargestellt. Mit Hilfe der Markerbanden erkennt man, dass das gebildete DNA-Fragment die zu erwartende Laufstrecke zwischen 200 bp und 300 bp erreichte.



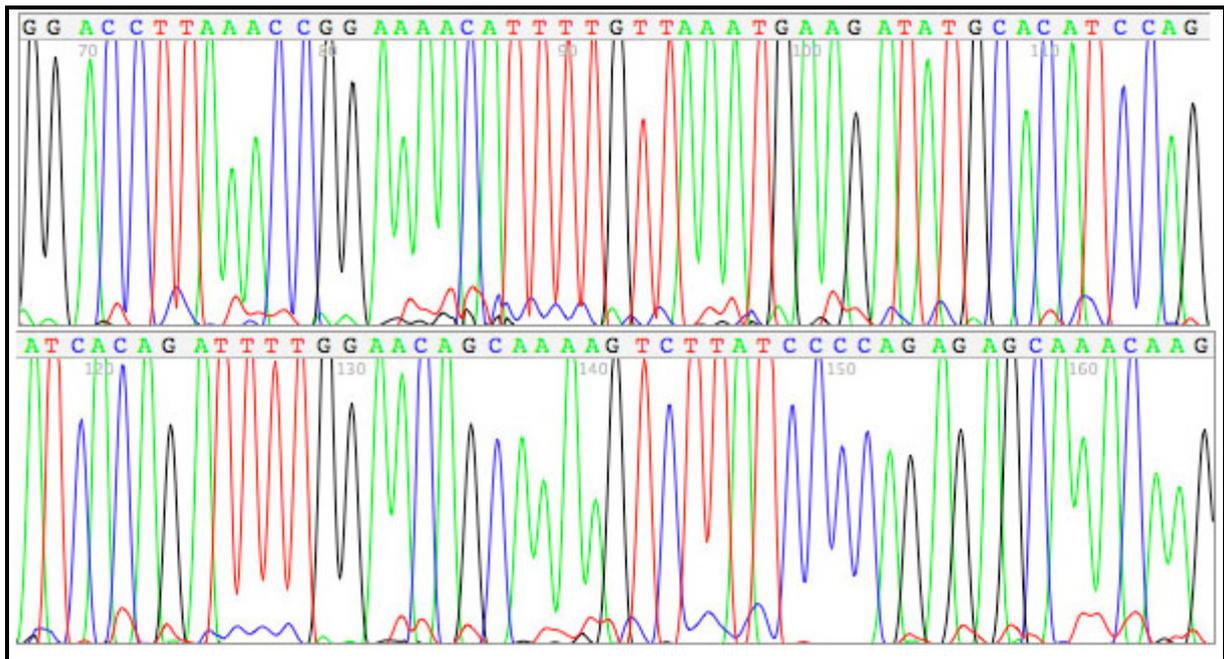
**Abbildung 4.2: Gelelektrophoretische Darstellung des Exon 6 des Proteins PDK1**

*Die Banden des Markers ermöglichen eine annähernde Abschätzung der Länge des in der PCR gebildeten DNA-Fragments. In diesem Fall ist das gebildete Fragment zwischen 200 bp und 300 bp lang. Abkürzungen: bp: Basenpaare*

Das dargestellte Gelelektrophorese-Ergebnis entspricht auch den übrigen 39 Proben der untersuchten genomischen DNA, die im Rahmen dieser Doktorarbeit bearbeitet wurden.

#### **4.1.1.4 Ergebnisse der Sequenzierung des Exon 6**

Die Abbildung 4.3 stellt exemplarisch das Ergebnis der Sequenzierung des DNA-Fragments von Exon 6 der Probe H108 dar. Keines der 96 Basenpaare des Exon 6 weist eine Mutation oder einen Polymorphismus auf. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Untersuchung des Elektropherogramms gelegt, da heterozygote Veränderungen, wie sie bei Onkogenen zu erwarten wären, hier Doppel-Peaks erzeugen würden, die in der automatischen Sequenzzuordnung (über dem Elektropherogramm) eventuell nicht erkennbar wären. Bei dieser Untersuchung wurden keine Doppel-Peaks festgestellt.



**Abbildung 4.3: Sequenzierungsergebnis für Exon 6.**

Das Bild stellt das Ergebnis/Basenabfolge der Sequenzierung des DNA-Fragments von Exon 6 dar. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz.

#### 4.1.1.5 Resumé der gDNA-Sequenzanalyse

Jedes der 14 Exons des *PDK1*-Gens der untersuchten 40 Tumorproben wurde mehrfach aufgereinigt und sequenziert mit dem Ergebnis, dass keines eine genomische Mutation oder einen Polymorphismus enthielt.

### 4.1.2 Ergebnisse der Sequenzanalyse der cDNA

#### 4.1.2.1 Patientendaten der cDNA

Um das Screening nach onkogenen Veränderungen in *PDK1* zu beschleunigen, wurde im Anschluss an die gDNA-Analyse eine cDNA-Analyse etabliert. Die Tabelle 4.5 gibt 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 gastroenterologischen Forschungslabors der Uniklinik des Saarlandes wurde bereits im Kapitel 3 (Abschnitt: 3.1.8-“Tumorproben”) eingegangen. Die Tabelle 4.6 fasst die Patientendaten aus der Tabelle 4.5 nach Diagnosen zusammen.

<b>Patient</b>	<b>Code-Nummer</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Diagnosedatum</b>
1.	H10528/90	Sigmakarzinom	09.07.1990
2.	H6335/91	Nierenkarzinom	17.04.1991
3.	H6335/91	Nierenkarzinom	17.04.1991
4.	H92669/90	Tumor I	
5.	H92669/90	Tumor II	
6.	H12669/90	Kolonkarzinom	21.08.1990
7.	H10583/90	Nierenkarzinom	10.07.1990
8.	H10888/90	Sigmakarzinom	16.07.1990
9.	H7951/88	Magenkarzinom	11.07.1988
10.	H14294	Kolonkarzinom	
11.	H12597/90	Rektumkarzinom	20.08.1990
12.	H10489/90	Nierenkarzinom	09.07.1990
13.	H4120/89	Magenkarzinom	22.03.1989
14.	H636/89	Magenkarzinom	16.01.1989
15.	H15980	Nierenkarzinom	15.10.1990
16.	H9481449	Kolonkarzinom	
17.	H3303/89	Magenkarzinom	07.03.1989
18.	H4230/89	Magenkarzinom	28.03.1989
19.	H2705/90	Nierenkarzinom	16.02.1990
20.	H14957/89	Kolonkarzinom	23.10.1989
21.	H4454/89	Sigmakarzinom	03.04.1989
22.	H4454/89	Sigmakarzinom	03.06.1989
23.	H8314/90	Nierenkarzinom	30.09.1990
24.	H10489/90	Nierenkarzinom	09.03.1990
25.	H93/64277	Kolonkarzinom	
26.	H14007/89	Sigmakarzinom	11.10.1989
27.	H4632/90	Kolonkarzinom	31.03.1990
28.	H69875/92	Kolonkarzinom	
29.	H7971/89	Rektumkarzinom	14.06.1989
30.	H17863/89	Kolonkarzinom	18.12.1989
31.	H5433/89	Kolonkarzinom	20.04.1989

32.	H91/85370	Kolonkarzinom	
33.	H12906/89	Rektumkarzinom	21.09.1989
34.	H12082/89	Rektumkarzinom	06.09.1989
35.	H12390/89	Rektumkarzinom	12.09.1989
36.	H9985/90	Kolonkarzinom	28.06.1990
37.	H10801/90	Sigmakarzinom	13.07.1990
38.	H18912/89	Sigmakarzinom	21.12.1989
39.	H11505/90	Kolonkarzinom	27.07.1990
40.	H12835/90	Kolonkarzinom	23.08.1990

Tabelle 4.5: Patientendaten der cDNA-Bank

	Kolon	Niere	Magen	Rektum	unbekannt	gesamt
Anzahl	19	9	5	5	2	40

Tabelle 4.6: Karzinomlokalisierung des Patientenkollektivs aus der cDNA-Datenbank

#### 4.1.2.2 Überblick über die Sequenz der cDNA

Die Abbildung 4.4 gibt einen Überblick über die cDNA-Sequenz des *PDK1*-Gens. Die Oligonukleotid-Primer werden mit dargestellt, wobei auch die Position der Forward-Primer zur besseren Übersicht farbig markiert ist. Zur Optimierung der Amplifikation der drei Fragmente wurden nötigenfalls verschiedene Primer getestet.

	1	ccgcttcggg	gaggaggacg	ctgaggaggc	gccgagccgc	gcagcgcctgc	gggggaggcg
		<b>PDPK1 - cDNA - F</b>					
	61	ccccgcgccga	cgcgggggccc	atggcccagga	ccaccagcca	gctgtatgac	gccgtgccca
	121	tccagtccag	cgtgggtgta	tgttcctgcc	catccccatc	aatgggtgagg	accagactg
	181	agtcacagcac	gccccctggc	attcctgggtg	gcagcaggca	gggccccgcc	atggacggca
620bp	241	ctgcagccga	gctcggccc	ggcgccggct	cctgcagca	tgcccagcct	ccgccgcagc
	301	ctcggaagaa	gcgccctgag	gacttcaagt	ttgggaaaat	ccttggggaa	ggctctttt
	361	ccacggttgt	cctggctcga	gaactggcaa	cctccagaga	atatgcgatt	aaaattctgg
	421	agaagcgaca	tatcataaaa	gagaacaagg	tccccatgt	aaccagagag	cgggatgtca
	481	tgtcgcgct	ggatcacccc	ttctttgta	agctttactt	cacatttcag	gacgacgaga
	541	agctgtattt	cggccttagt	taigccaaaa	atggagaact	acttaaatat	attcgcaaaa
		<b>PDK1 - 3BF</b>					
	601	tcggttcatt	cgatgagacc	tgtaccggat	tttacacggc	tgagatcgtg	tctgctttag
		<b>PDK1 - 3AR</b>					
	661	agtacttgca	cggcaagggc	atcattcaca	gggaccttaa	accgaaaaac	attttgtaaa
	721	atgaagatat	gcacatccag	atcacagatt	ttggaacagc	aaaagtctta	tccccagaga
	781	gcaaacaaagc	cagggccaac	tcattcgtgg	gaacagcgca	gtacgtttct	ccagagctgc
627bp	841	tcacggagaa	gtccgctgt	aagagttcag	acctttgggc	tcttgggatgc	ataatatacc
	901	agcttgtggc	aggactccca	ccattccgag	ctggaaacga	gtatcttata	tttcagaaga
	961	tcattaagtt	ggaatatgac	tttccagaaa	aattcttccc	taaggcaaga	gacctcgtgg
	1021	agaaactttt	ggttttagat	gccacaaagc	ggttaggctg	tgaggaaatg	gaaggatacg
	1081	gacctcttaa	agcacacccg	ttcttcgagt	ccgtcacgtg	ggagaacctg	caccagcaga
		<b>PDK1 - 3CF</b>					
	1141	cgctcggaa	gctcacggct	tacctgcccg	ctaigtccga	agacgacgag	gactgctatg
		<b>PDK1 - 3BR</b>					
	1201	gcaattatga	caatctcctg	agccagtttg	gctgcatgca	gggtgtcttcg	tcctctctct
	1261	cacactcctt	gtcagcctcc	gacacgggcc	tgccccagag	gtcaggcagc	aacatagagc
	1321	agtacattca	cgatctggac	tcgaactcct	ttgaaactgga	cttacagttt	tccgaagatg
	1381	agaagaggtt	gttgttggag	aagcaggctg	gcggaaaccc	ttggcaccag	ttttagaaaa
	1441	ataatttaat	actaaagatg	ggcccagtg	ataagcggaa	gggtttatct	gcaagacgac
721bp	1501	gacagctgtt	gctcacagaa	ggaccacatt	tatattatgt	ggatcctgtc	aacaaaagttc
	1561	tgaaagggtga	aattccttgg	tcacaagaac	ttcgaccaga	ggccaagaat	tttaaaactt
	1621	tctttgtcca	cacgcctaac	aggacgtatt	atctgatgga	ccccagcggg	aacgcacaca
	1681	agtgggtgcag	gaagatccag	gaggtttgga	ggcagcgata	ccagagccac	ccggacgcgg
	1741	ctgtgcagtg	acgtggcctg	cgcccgggct	gcccttcgct	gccaggacac	ctgccccagc
	1801	gcggcttggc	cgccatccgg	gacgttccca	gaccacctgc	cagccatcac	aaggggaacg
		<b>PDK1 - cDNA - R</b>					
	1861	cagaggcgga	aaccttgacg	catttttatt	t		

Abbildung 4.4 cDNA-Sequenz.

Farbcodierung: blau: **PDPK1-cDNA-F/PDK1-3BF/PDK1-3CF**, violett: **PDK1-3AR/PDK1-3BR/PDK1-cDNA-R**, fett geschrieben: **atg/tga** (Start- und Stopcodons der cDNA = zu untersuchender Bereich)

Abschnitt	Länge des Abschnitts (in bp)
A	620
B	627
C	721

Tabelle 4.7: Abschnitt-Längen

Die Ermittlung der Fragmentlänge basiert auf den Angaben des Primer3-Programms. Die angegebenen Fragmente beinhalten auch die Längen der Primer, die zwischen 18 und 22 bp lang sind.

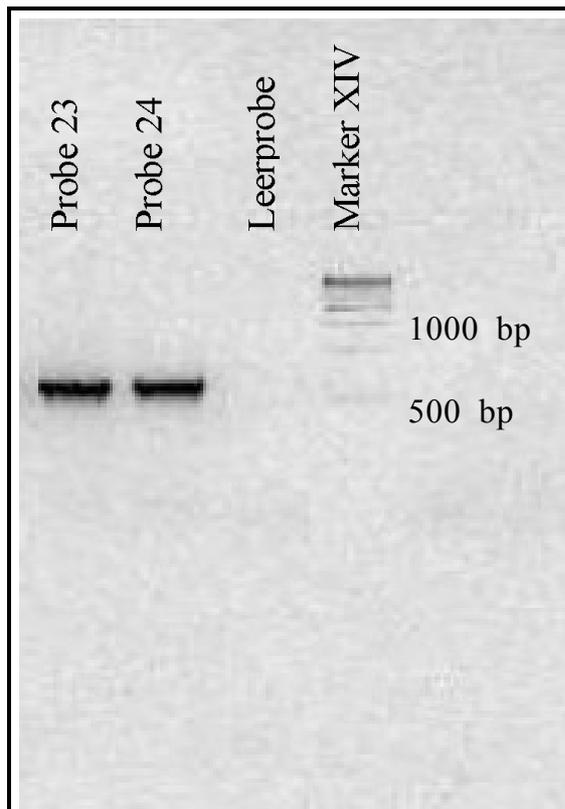
Beim Vergleich der Angaben aus den Tabellen 4.4 und 4.7 stellt man fest, dass die DNA-Fragmente bei der cDNA-Sequenzierung wesentlich länger sind als diejenigen der gDNA-Sequenzierung. Der in dieser Arbeit verwendete Sequenzierautomat lieferte nur bis ca. 500 bp auswertbare Ergebnisse. Dies führte dazu, dass die Abschnitte sowohl mit den Vorwärts- als auch mit den Rückwärts-Primern sequenziert wurden, um ein Gesamtergebnis zu bekommen.

Da das Prozedere für die Ergebnisgewinnung an allen untersuchten Abschnitten gleich war, erfolgt am Beispiel des Abschnitts B eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse der Gelelektrophorese sowie der Sequenzanalyse.

#### **4.1.2.3 Ergebnisse der Gelelektrophorese von Fragment B:**

Die Amplifikation von Abschnitt B sollte ein Produkt mit 627 bp ergeben (Tabelle 4.7). In der Abbildung 4.5 wird exemplarisch das Ergebnis der Gelelektrophorese des Abschnitts B der Probe 23, der Probe 24 sowie der Leerprobe dargestellt.

Mit Hilfe der Markerbanden erkennt man, dass das gebildete DNA-Fragment etwas länger als 500 bp ist. Es handelt sich somit mit großer Wahrscheinlichkeit um das gesuchte DNA-Fragment.



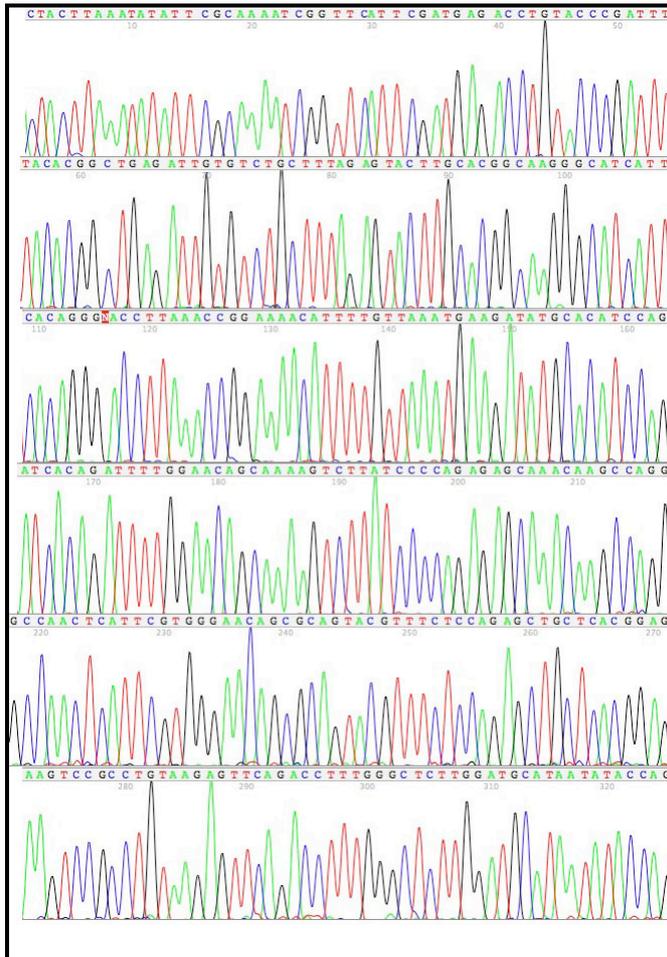
**Abbildung 4.5: Die gelelektrophoretische Darstellung des Abschnitts B des Proteins PDK1**

*Die Banden des Marker-XIV ermöglichen eine annähernde Abschätzung der Länge des in der cDNA-PCR gebildeten DNA-Fragments. In diesem Fall ist das gebildete Fragment etwas länger als 500 bp. Abkürzungen: bp: Basenpaare*

Das dargestellte Gelelektrophorese-Ergebnis entspricht auch den anderen 39 Proben der cDNA, die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht wurden.

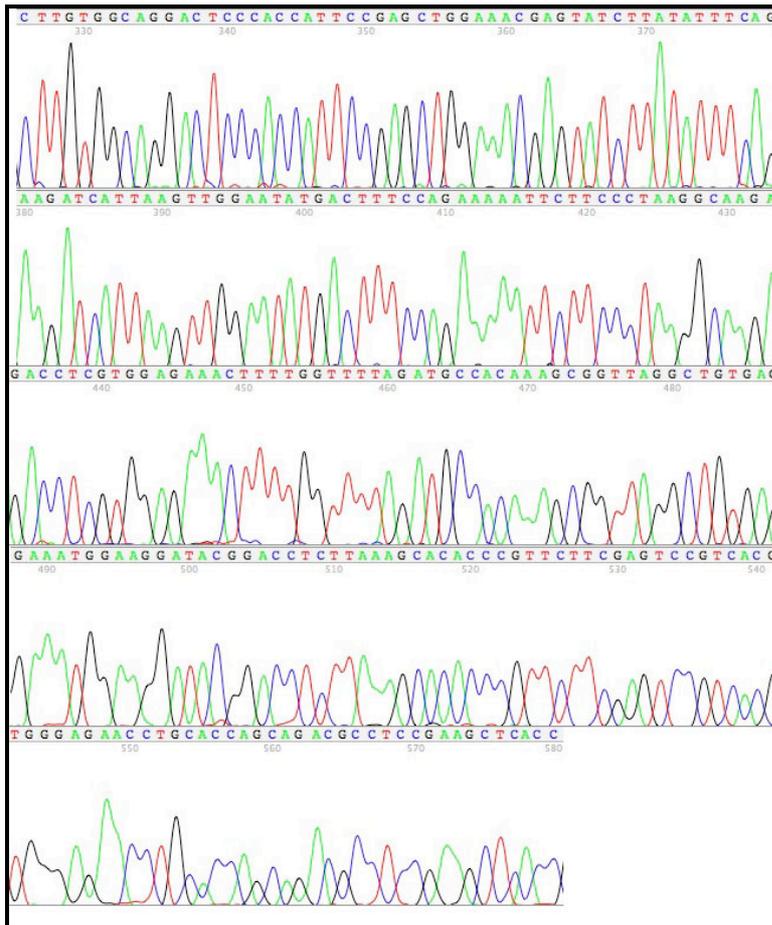
#### **4.1.2.4 Ergebnisse der Sequenzierung von Fragment B**

In den beiden Abbildungen 4.6 und 4.7 wird exemplarisch das Ergebnis der Sequenzierung des Abschnitts B der Probe 3 dargestellt. Da der Abschnitt B mit einer Länge von 627 bp verhältnismäßig groß ist, handelt es sich um dieselbe durchgehende Sequenz, was auch aus der Basenpaar-Nummerierung ersichtlich ist.



**Abbildung 4.6: Sequenzierungsergebnis für Abschnitt B (Teil 1)**

*Das Ergebnis der Sequenzierung des Abschnitts B in Sense-Richtung. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz*



**Abbildung 4.7: Sequenzierungsergebnis für Abschnitt B (Teil 2)**

*Das Ergebnis der Sequenzierung des Abschnitts B vorwärts. Der Signalabfall und die Verbreiterung der Signalhügel nehmen mit zunehmender Sequenzlänge zu. Farbmarkierung: Adenin: grün, Thymin: rot, Cytosin: blau, Guanin: schwarz*

Auch bei dieser Analyse wurde ein besonderes Augenmerk auf die Untersuchung des Elektropherogramms gelegt. Es wurden keine Doppel-Peaks, die auf eine heterozygote Mutation hinweisen könnten, festgestellt. Keines der Basenpaare des Abschnitts B der Probe 3 ist infolge einer Punktmutation homo- oder heterozygot verändert, ebenso gab es keine Hinweise auf Polymorphismen.

Da nicht jede Probe im Vorwärts-Durchlauf ein entsprechend sauberes Ergebnis lieferte, mussten diejenigen Proben, bei denen die Rohdaten doppeldeutig waren, wiederholt und mit Hilfe des Rückwärts-Primers erneut sequenziert werden. Durch Änderungen der DNA- und Primer-Menge sowie der Injektionszeit des Sequenziers konnte der Abschnitt B in allen 40 Proben erfolgreich untersucht werden.

#### 4.1.2.5 Resumé der cDNA-Sequenzanalyse

Jeder Abschnitt der cDNA des *PDK1*-Gens der 40 Tumorproben wurde mehrfach aufgereinigt und sequenziert mit dem Ergebnis, dass keine Veränderungen nachweisbar waren.

#### 4.2 Alternative Spleiß-Variante von AKT2/PKB $\beta$

Das alternative Spleißen erlaubt es den Organismen nicht nur eine Version eines Proteins, sondern viele ähnliche, jedoch funktionell unterschiedliche Proteine aus einem einzigen Gen zu erzeugen. Die Bestimmung dieser Gen-Isoformen sowie deren funktionelle Charakterisierung ist eine wichtige aktuelle Aufgabe der Forschung.

Die Proteinkinase AKT2/PKB $\beta$  reguliert eine Fülle von untergeordneten Signalkaskaden, die den *second messenger* PIP3 nutzen. Im Rahmen von Klonierungsarbeiten wurde eine alternative Spleiß-Variante von AKT2/PKB $\beta$  entdeckt. In dieser Spleiß-Variante ist ein zwischen Exon 12 und Exon 13 liegender Bereich des regulären Introns als Exon eingespleißt. Diese neue mRNA-Sequenz wird im weiteren Verlauf Spleiß-Variante 12a genannt.

Die Abbildung 4.8 zeigt einen Ausschnitt der genomischen DNA-Sequenz des *AKT2/PKB $\beta$* -Gens welches sich zwischen Exon 12 und Exon 13 befindet. Die dazwischen eingespleißte DNA-Sequenz ist 123 bp lang. Da in dieser Spleiß-Version die C-terminale Sequenz und damit eine wichtige regulatorische Domäne des Proteins verändert wird, ist die Untersuchung dieser Spleiß-Variante von besonderem Interesse.

```

50041 cttgccccag caggaccctc agggacctgg cccactcgtg gtgaccttgg ttgaggcctc
50101 ctggcctcag ggtccctgag cctgagctcc tctcctccgt Agctcctgcc acccttcaaa
50161 cctcagggtca cgtccgaggt cgacacaagg tacttctgatg atgaatttac cgcccagctc 12
50221 atcacaatca cccccctga ccgctgtgag tgcctggggc ccccgcgctg gtgtgcctgc
50281 cccaggggtg gagggatggg atctgctctt aactcacttc tcaaggaggg cctcgaagg
50341 cccccgcttc atgtctggga gatttccccca agtctgctct caggcccttt tgctgttgg
50401 cctctttgga cctggtgagg ccaccaggag ccattgactg cagcacgttc tggagctcag
50461 tcggggggct cagggcagga ggcagcccgg tccctgagcc tggctgggtt cactgcttta
50521 cagctgtttg ggttcttact ctgaactcag cccagggctg ggctatgctg gggacacagc
50581 actgattgag ccagccctgg gccctgccct ggaaagctcc cagcccaggt aggggtggcg
50641 gcctggagtg gtcagggcta gggcgtggga ggccagggac tggggaatcc cagaggaaat
50701 atccgacctg gcctgcagtt agggagggct ttctagagga ggaagcaaac gtgtcagctg
50761 gccggaggaa tgactgttgg gatgccagca atgggagaag catggcatag ctaaggaccg
50821 gcagcagcca gggagatggt ggtgagaaga gagggcatgg ggctggagtg caagggtctg
50881 ggggcccactg ggaggggtgg ggactgcttg catggcggga gccagccatg gaagggtttc
50941 atacagagag ggacaggggt aaagcaggcc tttagaaagc ccccctggct gccctggag
51001 aatggatggg aggggtgcgag aggcaggcca ggacagggct ctgggctgga ctctggcatg
51061 gtggtgtgtg gggcagagag aaggtgggag gctcagaagg ccttgccagc tgtggggcgc
51121 atgggcaagg gcacaggaaa ctcccagagg aggccgcccg gggctcaggt ttggggagtg
51181 ggtccgtggc tgagggcctc cattgcccag ggatgggctt ttctgtctt gtctgtggg
51241 cagccccgcg cagctggggc cgtttccccca gggagtctgg gcaggtgtcc cagccctct
51301 cctgactggt cctccccatc cacctctgcc gccacagat gacagcctgg gcttactgga
51361 gctggaccag cggaccact tccccagtt ctctactctg gccagcatcc gcgagtggc 13
51421 agtctgcccc cgcagaggac gcacgctcgc tgccatcacc gctgggtggt tttttcccc
51481 t

```

Abbildung 4.8: Überblick über die Sequenz der Spleiß-Variante 12a in der genomischen DNA

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

#### 4.2.1 Ergebnisse der qualitativen Bestimmung der alternativen Spleiß-Variante von PKB $\beta$

Zur qualitativen Bestimmung der alternativen Spleiß-Variante 12a wurden zunächst die zu untersuchenden Abschnitte der cDNA in einer PCR, wie in der Tabelle 3.13 beschrieben, amplifiziert. Als Oligonukleotid-Primer wurden dabei in einem Ansatz die Primer 12F und 13R verwendet, welche ein Fragment des Standard-Transkriptes zwischen den Exons 12 und 13 amplifizieren, und in einem gesonderten Ansatz die für das neue alternative Exon 12a spezifischen Primer *AKT2splice-12F* und *AKT2splice-12aR*, die in der Tabelle 3.1 beschrieben sind. Eine Leerprobe wurde ebenfalls stets angefertigt.

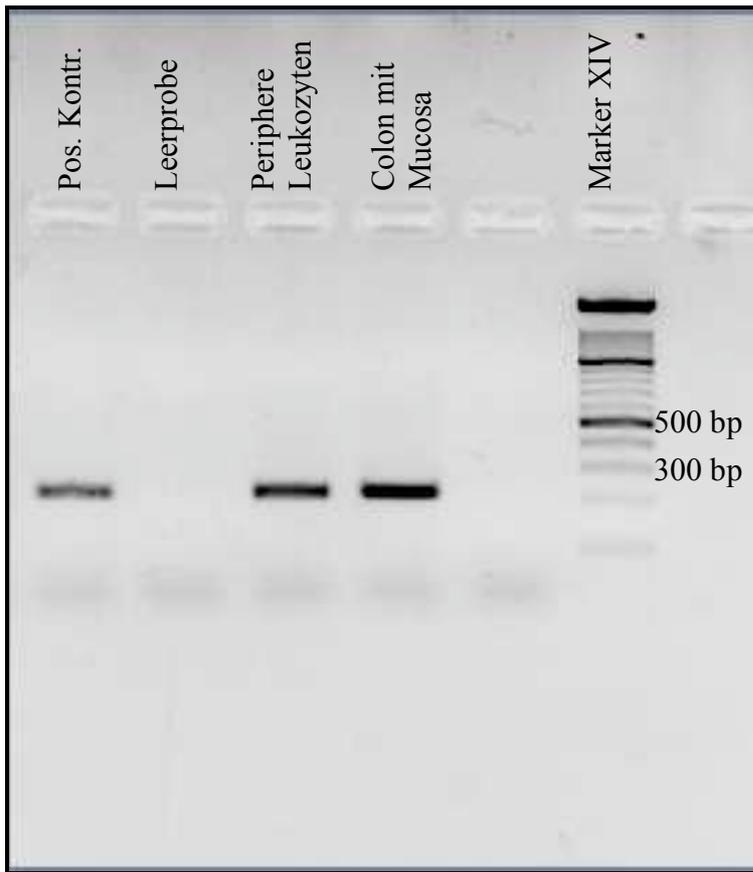
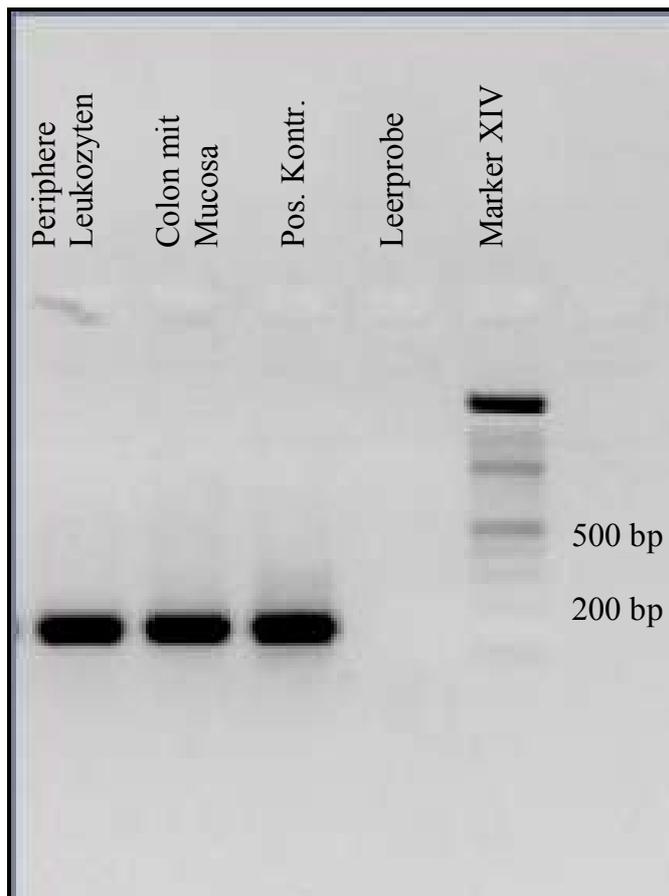


Abbildung 4.9: Die gelelektrophoretische Darstellung der alternativen Spleiß-Variante 12a



**Abbildung 4.10: Die gelelektrophoretische Darstellung des Wildtyps 12-13**

Die untersuchten DNA-Abschnitte hatten folgende Länge in Basenpaaren:

**162 bp:** cDNA Wildtyp 12-13

**218 bp:** Alternative Spleiß-Variante 12a

Die Tabelle 4.8 gibt die Ergebnisse der gelelektrophoretischen Untersuchung auf das Vorhandensein der alternativen Spleiß-Variante 12a aller untersuchten 24 cDNA-Proben wieder. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass sowohl die Wildtyp-Variante 12-13 als auch die alternative Spleiß-Variante 12a in allen untersuchten Gewebeproben vorhanden war.

Nr.	Gewebe/Zelllinie	Ursprung	Wildtyp	Spleiß-Variante 12a
1.	Herz	3 männliche Kaukasier	+	+
2.	Gehirn	2 männliche Kaukasier	+	+
3.	Plazenta	17 Kaukasierinnen	+	+
4.	Lunge	4 Kaukasier (männlich/weiblich)	+	+

5.	Leber	35 Jahre alter Kaukasier	+	+
6.	Skelettmuskulatur	8 Kaukasier (männlich/weiblich)	+	+
7.	Niere	5 Kaukasier (männlich/weiblich)	+	+
8.	Pankreas	15 Kaukasier (männlich/weiblich)	+	+
9.	Milz	3 Kaukasier (männlich/weiblich)	+	+
10.	Thymus	18 Kaukasier (männlich/weiblich)	+	+
11.	Prostata	32 Kaukasier	+	+
12.	Hoden	45 Kaukasier	+	+
13.	Ovar	14 Kaukasierinnen	+	+
14.	Dünndarm ohne Mucosa	32 Kaukasier (männlich/weiblich)	+	+
15.	Kolon mit Mucosa	20 Kaukasier (männlich/weiblich)	+	+
16.	Periphere Leukozyten	Kaukasier (männlich/weiblich)	+	+
17.	Fetales Gehirn	10 kaukasische Spontanaborte	+	+
18.	Fetale Lunge	38 kaukasische Spontanaborte	+	+
19.	Fetale Leber	32 kaukasische Spontanaborte	+	+
20.	Fetale Niere	17 kaukasische Spontanaborte	+	+
21.	Fetales Herz	13 kaukasische Spontanaborte	+	+
22.	Fetale Milz	17 kaukasische Spontanaborte	+	+
23.	Fetaler Thymus	17 kaukasische Spontanaborte	+	+
24.	Fetale Skelettmuskulatur	13 kaukasische Spontanaborte	+	+

**Tabelle 4.8: Alternative Spleiß-Variante 12a: Untersuchtes Gewebe sowie Ergebnisse der Gelelektrophorese**

#### **4.2.2 Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der alternativen Spleiß-Variante von PKB $\beta$**

Es wurden insgesamt 24 Proben mit Hilfe der Real-Time-PCR quantitativ untersucht. Zunächst wurde die Kopienzahl der cDNA des gesamten Abschnittes zwischen Exon 12 und 13 bestimmt und somit das Standardtranskript erfasst.

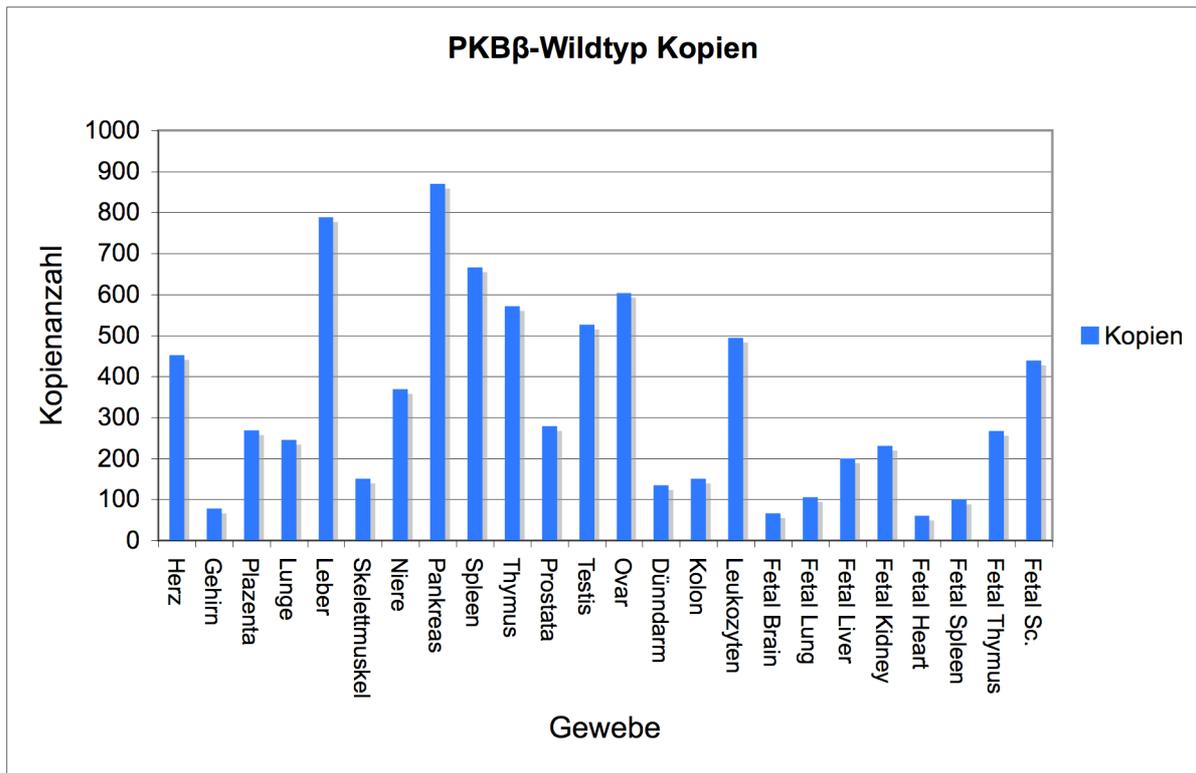


Abbildung 4.11: Ergebnis der Kopienzahl-Bestimmung des PKB $\beta$ -Standard-Transkriptes.

In einem gesonderten PCR-Ansatz wurde exakt nur die cDNA-Menge der alternativen Spleiß-Variante bestimmt (Abbildung 4.12).

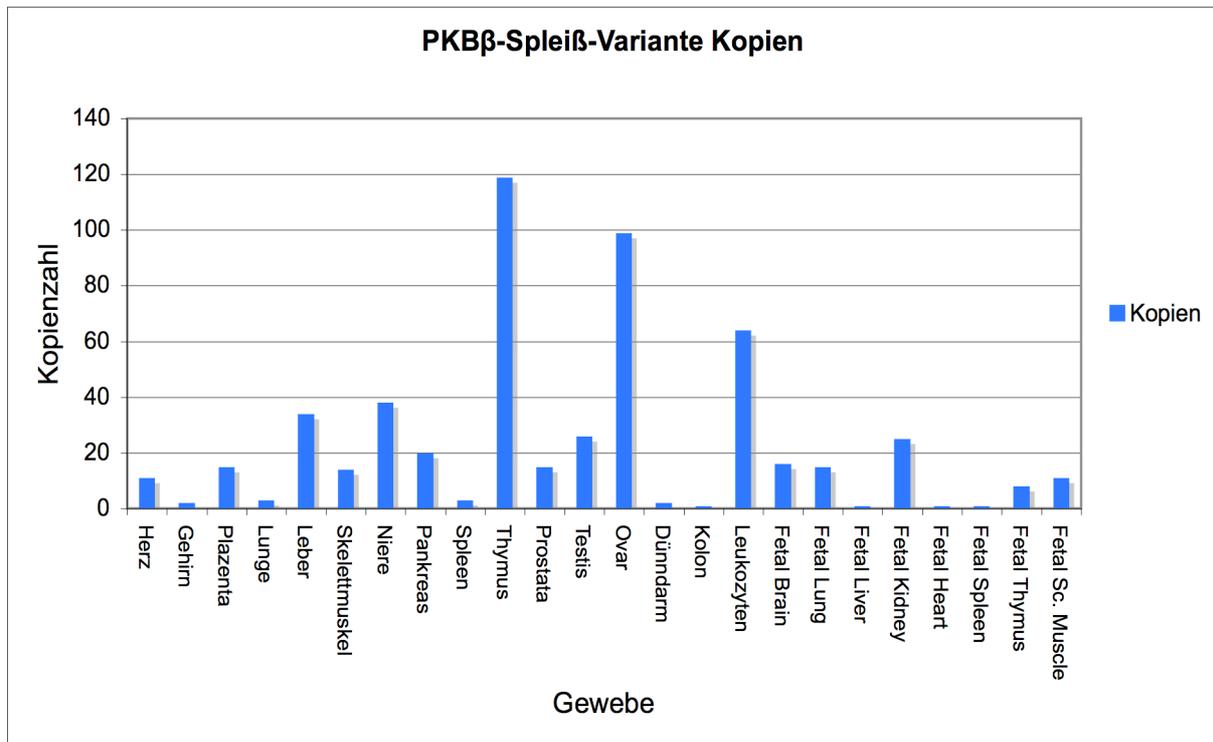


Abbildung 4.12: Ergebnis der 12a-Kopienzahl-Bestimmung

Da verschiedene Gewebe mit unterschiedlichen Gesamtexpressions-Niveaus von PKB $\beta$  verwendet wurden, wurde zur besseren Aussagekraft das Verhältnis der alternativen Spleiß-Variante 12a zur Gesamtheit der AKT2/PKB $\beta$  bestimmt, was durch die Balkendiagramme in der Abbildung 4.13 veranschaulicht wird.

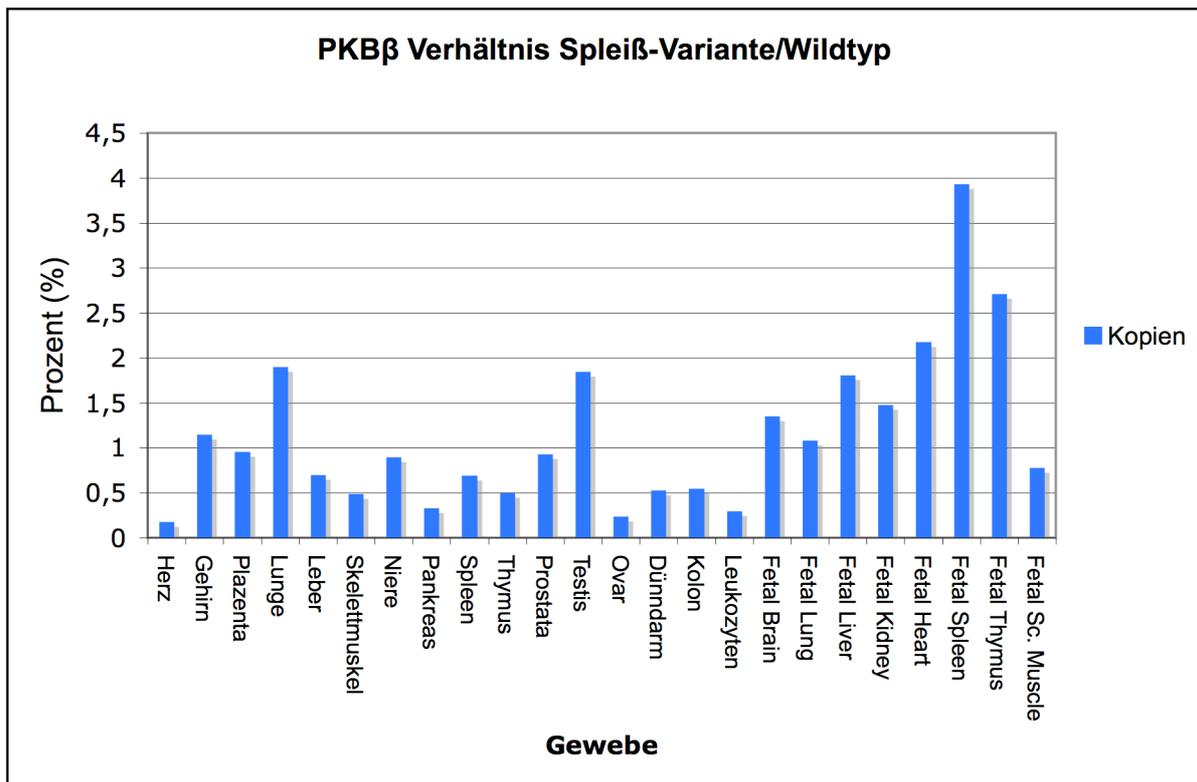


Abbildung 4.13: Verhältnis der Isoform-Kopienzahl zur Gesamt-AKT2/PKB $\beta$ -Kopienzahl

In der Abbildung 4.13 ist das Expressionsverhältnis in den verschiedenen Gewebearten dargestellt. Es wurde festgestellt, dass die Spleiß-Variante in allen Geweben in einem prozentualen Anteil von 0,2 % bis 3,9 % (im Schnitt 1,2 %) gebildet wird.

## 5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von Veränderungen im PIP3-Signalweg in der Karzinogenese zu untersuchen, insbesondere die Bedeutung der Proteinkinasen PDK1 und PKB $\beta$  (AKT2). Die physiologische Funktion (Aktivierung der Proteinkinasen AKT/PKB/PKC/S6K/SGK sowie Wachstumsfaktoren, vor allem Insulin) von PDK1 und die Identifizierung von Veränderungen in *PDK1* in Kolonkarzinomen (Parsons *et al.*, 2005) legen eine Beteiligung dieser Proteinkinase an der Entstehung des kolorektalen Karzinoms nahe. Aus diesem Grund wurde die gesamte codierende Region des *PDK1*-Gens in 80 humanen Tumorproben analysiert. Darüber hinaus wurde die potentielle physiologische Rolle einer neu entdeckten Spleißvariante von PKB $\beta$  (AKT2) untersucht, indem sie in gesunden humanen Geweben relativ zum Standardtranskript von PKB $\beta$  quantifiziert wurde.

### 5.1 Diskussion der Sequenzanalyse des *PDK1*-Gens in Tumorproben

Die Erforschung der Signaltransduktionswege, die das Zellwachstum, den Zellzyklus sowie die Apoptose regulieren, hat dazu geführt, dass die Entstehung zahlreicher Krankheiten auf molekulargenetischer Ebene besser verstanden werden kann; dies gilt in besonderem Maße für die Karzinogenese. Die Karzinogenese ist gekennzeichnet durch eine Abfolge von Mutationsereignissen. Liegen die Mutationen in einem Genbereich vor, welcher für das Zellwachstum oder den Zellzyklus verantwortlich ist, kann dies zur Tumorinitiation oder -progression beitragen. Insgesamt wird die Entstehung von Krebs heute als ein multifaktorieller Prozess mit einer Akkumulation von genetischen Veränderungen bzw. Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen angesehen („*multi-hit*-Theorie“).

Häufig sind die Zielgene, deren Mutation die Karzinogenese antreibt, Proteinkinasen: die Deregulierung von Proteinkinasen, die an der Regulierung von Zellproliferation und Wachstum beteiligt sind, ist oftmals assoziiert mit maligner Transformation (Gschwind *et al.*, 2004). Auch das Gen der im PIP3-Signaltransduktionsweg aktiven Kinase PDK1 ist somit ein

potentielles Ziel von Mutationsereignissen im Rahmen der Karzinogenese. In der kürzlich erschienenen Arbeit von *Parsons et al.* wurden 204 kolorektale Tumorproben auf das Vorhandensein von Mutationen im *PDK1*-Gen untersucht. In drei (1,5%) dieser Tumorproben wurden Mutationen im *PDK1*-Gen entdeckt. Zwei dieser Mutationen wurden in der DNA-Sequenz ermittelt, die für die Kinase-Aktivität von PDK1 codierend ist.

Es gibt darüber hinaus zahlreiche weitere Hinweise darauf, dass PDK1 in der Karzinogenese eine Rolle spielen kann. Die nachgeschalteten Proteine von PDK1 sind in Tumorgewebe oftmals überaktiviert (Harris, 2003), so dass es plausibel ist, dass PDK1 durch eine Überaktivierung ebenfalls als onkogenes Protein wirken könnte. Des Weiteren ist PDK1 in vielen menschlichen Tumorzelllinien überexprimiert (Maurer *et al.*, 2009). Die retrovirale Überexpression von PDK1 in menschlichen Epithelzellen bewirkt darüber hinaus eine maligne Transformation dieser Zellen (Zeng *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2003). Eine der Hauptkomponenten des onkogenen Signalwegs von PDK1 ist hierbei die nachgeschaltete *PKC $\alpha$* -Signalkaskade.

In der Arbeit von *Lin et al.* konnte gezeigt werden, dass *PDK1* eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des Mammakarzinoms spielt. Erhöhte Phosphorylierungsraten von PDK1 und dadurch erhöhte Aktivierung des nachgeschalteten Proteins AKT scheinen hierbei eine wichtige Rolle zu spielen. Dabei wiesen 81% der untersuchten invasiven Tumore erhöhte Phosphorylierungsraten auf. Des Weiteren wurden in bis zu 86% der hochgradigen und metastasierten Tumore hohe Phosphorylierungsraten in PDK1 festgestellt. Eine Mutationsanalyse für das *PDK1*-Gen erfolgte nicht im Rahmen der Arbeit.

Aus diesen Gründen ist es von hohem Interesse nachzuweisen, ob die gefundenen erhöhten Expressions- und Phosphorylierungsraten mit Mutationen im *PDK1*-Gen einhergehen bzw. ob diese ursächlich sind. In diesem Fall würde sich PDK1 als Zielstruktur für die Entwicklung von Inhibitoren eignen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur molekularbiologischen Charakterisierung des *PDK1*-Gens 80 Tumorproben untersucht. Mittels PCR wurden alle 14 Exons amplifiziert und einer nachfolgenden Sequenzanalyse unterzogen. Die Sequenzierung der PCR-Produkte führte nicht zum Nachweis von Veränderungen in *PDK1*.

Damit scheint die Rolle von *PDK1*-Mutationen in Tumoren eher klein zu sein. Größere Probenmengen könnten möglicherweise zu positiven Resultaten führen.

Das Auftreten von *PDK1*-Mutationen in Kolonkarzinomen scheint somit prozentual nicht sehr relevant zu sein, dennoch würde sich die Entwicklung von Inhibitoren trotzdem lohnen,

da der vorgeschaltete Signalweg von PDK1 oftmals überaktiviert ist (Samuels *et al.*, 2004), was konsekutiv zu einer erhöhten Aktivität von PDK1 führt.

## **5.2 Diskussion der alternativen Spleiß-Variante PKB $\beta$ 12a**

Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit war die Analyse einer kürzlich entdeckten Spleiß-Variante des Proteins PKB $\beta$ . Um die potentielle physiologische Bedeutung dieser Variante zu ermitteln, wurden an 24 unterschiedlichen Gewebeproben standardisierte qualitative sowie quantitative Bestimmungen durchgeführt. Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Gewebeproben im Hinblick auf die Expressionsrate der Spleiß-Variante im Vergleich zur Wildtyp.

Die alternative Spleiß-Variante PKB $\beta$  12a konnte in allen 24 untersuchten Gewebeproben mit Hilfe der Gelelektrophorese qualitativ nachgewiesen werden. Eine quantitative Aussage konnte mit der nachfolgenden Real-Time-PCR erbracht werden. Unabhängig vom untersuchten Gewebe kommt die alternative Spleiß-Variante 12a in 0,2 bis 3,9 % der Gesamt-PKB $\beta$ -Konzentration vor. Dies lässt den Schluss zu, dass das Vorkommen dieser Spleiß-Variante nicht spezifisch für ein Gewebe ist, sondern ubiquitär.

Ausgehend von dieser Ergebnislage lässt sich die Frage stellen, inwieweit das Spleißosom bei der Bildung der mRNA korrekt arbeitet. Im vorliegenden Fall entsteht in allen untersuchten Geweben mit einem Anteil von bis zu 3,9 % die alternative Spleiß-Variante PKB $\beta$  12a. Ist die Spleiß-Variante zufällig fehlerhaft entstanden oder hat sie eine biologische Funktion in der Zelle?

Durch alternatives Spleißen (Brett *et al.*, 2002) können aus derselben Gensequenz verschiedene mRNA-Moleküle und dadurch unterschiedliche Proteine entstehen. Daraus ist ersichtlich, dass aus einem gering erscheinenden Genpool eine hohe Variabilität an Proteinen entstehen kann. Die Wahrscheinlichkeit, dass die entstandene Spleiß-Variante zu einem funktionsfähigen Protein führt, ist hoch, da es mehrere funktionierende Aminosäure-Sequenzen aus anderen Proteinen enthält. Alternatives Spleißen ist assoziiert mit einem Zuwachs an evolutionärer Veränderung (Kornbliht *et al.*, 2004).

Offen bleibt die Frage, ob die Expressionsrate der Spleiß-Variante von 0,2 bis 3,9 % eine signifikante Rolle im Signalmechanismus der Zelle spielt. Nach Aussage von Alberto Kornblihtt, einem führenden Forscher im Bereich des alternativen Spleißens, wird beim Auftreten einer Spleiß-Variante von über einem Prozent davon ausgegangen, dass diese absichtlich von der Zelle gebildet wird. Im vorliegenden Fall liegt der Prozentsatz über dieser Erfahrungsgrenze.

Eine weitere mögliche Erklärung für das Entstehen der Spleiß-Variante PKB $\beta$  12a kann mit Hilfe des sog. *Nonsense-mediated mRNA decay*-Systems (Lewis *et al.*, 2003) erklärt werden. Mit diesem System sorgt die Zelle dafür, dass fehlerhafte oder mutierte mRNA nicht in Proteine übersetzt werden, indem diese abgebaut werden. Bei Vorhandensein von Genmutationen dient dieses System der Elimination von mRNA-Transkripten, die ansonsten veränderte Proteine kodieren würden. Werden die veränderten Proteine nicht auf mRNA-Ebene abgefangen, können Störungen von Signalwegen in der Zelle entstehen.

Der Mechanismus des *Nonsense-mediated mRNA decay*-Systems findet nicht statt wenn sich das vorzeitige Stopcodon im letzten Exon befindet oder aber die premature mRNA ohne Intron ist (Frischmeyer *et al.*, 1999).

Da im Falle der alternativen Spleiß-Variante PKB $\beta$  12a das Stopcodon am Ende des Proteins ist, ist es fraglich ob das *Nonsense-mediated mRNA decay*-System die beiden Transkripte (Wildtyp/Spleiß-Variante) unterscheiden kann.

Die funktionelle Charakterisierung der alternativen Spleiß-Variante PKB $\beta$  12a des Proteins PKB $\beta$  stellt den nächsten Schritt zur Untersuchung ihrer potentiellen biologischen Rolle dar.

### **5.3 Ausblick**

Die Ursache für die Entstehung eines malignen Tumors ist sehr variabel. Ein Zusammenspiel vieler Faktoren ist notwendig, die auf genetischer Ebene das Zellwachstum sowie die Zelldifferenzierung steuern. Die Identifikation der genetischen Faktoren, die für die Karzinogenese verantwortlich sind, führen zu einem tiefgreifenderen Verständnis für die Pathogenese. Ist der kausale genetische Zusammenhang besser verstanden, lassen sich neue und wirkungsvollere Therapiestrategien für Krankheiten entwickeln.

Wie bereits beschrieben, können PDK1-Mutationen bzw. die Überexpression von PDK1 (Maurer *et al.*, 2009) in Tumoren eine wichtige Rolle spielen. Dieser Umstand sollte weiter untersucht werden. Ferner sollte die Entwicklung eines Inhibitors für PDK1 vorangetrieben werden, da PDK1 durch vorgeschaltete Proteine (PTEN, PIK3CA etc.) überaktiviert sein kann.

Die Zukunft der Tumorthherapie liegt in individualisierten Behandlungsmethoden. Mittels gezielter (targeted therapy) Krebstherapie werden nach einer Genotypisierung erfolgenden Arzneimittelintervention nur die genetisch veränderten Tumorzellen angegriffen. Dadurch werden zell- und molekularbiologische Mechanismen gehemmt, die für das Tumorstadium verantwortlich sind. Auch aus diesem Grund sollten Inhibitoren für PDK1 entwickelt werden, da bei Tumoren mit einer Überaktivierung des PIP3-Weges hierdurch eine Behandlungsoption besteht, auch wenn die Zahl der PDK1-Mutationen sich sehr in Grenzen zu halten scheint.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ahlquist D.A., Boynton K.A. Harrington J.J. Mahoney D.W. Pierceall W.E. et a.: *Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay system. Gastroenterology* 119: 1219-1227 (2000)
2. Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M.: *3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. Curr Biol.* 1997 Oct 1;7(10):776-89.
3. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P: *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. Curr Biol.* 1997 Apr 1;7(4):261-9.
4. Aoki K, Taketo MM: *Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. J Cell Sci.* 2007 Oct 1;120(Pt 19):3327-35.
5. Azimuddin K, Khubchandani IT, Stasik JJ, Rosen L, Riether RD: *Neoplasia after ureterosigmoidostomy. Dis Colon Rectum.* 1999 Dec;42(12):1632-8.
6. Bayascas JR, Leslie NR, Parsons R, Fleming S, Alessi DR: *Hypomorphic mutation of PDK1 suppresses tumorigenesis in PTEN(+/-) mice. Curr Biol.* 2005 Oct 25;15(20):1839-46.
7. Becker, J.: *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland. Springer-Verlag, Heidelberg* (1998)
8. Benjamin P. Lewis, Richard E. Green, and Steven E. Brenner: *Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jan 7;100(1):189-92. Epub 2002 Dec 26.
9. Bergsma-Kadijk, van 't Veer P. Kampman E. Burema J.: *Calcium does not protect against colorectal neoplasia. Epidemiology* 7(6): 590-597 (1996);
10. Bertz, Giersiepen K. et a.: *Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI.* Saarbrücken (2006)

11. Bingham SA: *Mechanisms and experimental and epidemiological evidence relating dietary fibre (non-starch polysaccharides) and starch to protection against large bowel cancer.* **Proc Nutr Soc.** 1990 Jul;49(2):153-71.
12. Biondi RM: *Phosphoinositide-dependent protein kinase 1, a sensor of protein conformation.* **Trends Biochem Sci.** 2004 Mar;29(3):136-42.
13. Blume-Jensen, Hunter T.: *Oncogenic kinase signalling.* **Nature** 411, 355–365 (2001);
14. Bo Zhang, Jian-Ying Chen, Dao-Da Chen, Guo-Bin Wang, Ping Shen: *Tumor type M2 pyruvate kinase expression in gastric cancer, colorectal cancer and controls.* **World J Gastroenterol** 2004;10(11):1643-1646
15. Bosman FT: *Molecular pathology of colorectal cancer.* **Cytogenet Cell Genet.** 1999;86(2):112-7.
16. Buc E, Kwiatkowski F, Alves A, Panis Y, Manton G, Slim K: *Tobacco smoking: a factor of early onset of colorectal cancer.* **Dis Colon Rectum.** 2006 Dec;49(12):1893-6.
17. Cantley L.C., Carpenter C. Duckworth B. Graziani A. Kapeller R. Soltoff S.: *Oncogenes and signal transduction.* **Cell** 64: 281–302 (1991);
18. Cantley, L.C. (2002). *The phosphoinositide 3-kinase pathway.* **Science.** 2002 May 31;296(5573):1655-7
19. Cappell MS: *Pathophysiology, clinical presentation, and management of colon cancer.* **Gastroenterol Clin North Am.** 2008 Mar;37(1):1-24,
20. Casamayor A, Morrice NA, Alessi DR: *Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo.* **Biochem J.** 1999 Sep 1;342 ( Pt 2):287-92.
21. Currie RA, Walker KS, Gray A, Deak M, Casamayor A, Downes CP, Cohen P, Alessi DR, Lucocq J: *Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1.* **Biochem J.** 1999 Feb 1;337 ( Pt 3):575-83.
22. David Brett, Heike Pospisil, Juan Valcárcel, Jens Reich & Peer Bork: *Alternative splicing and genome complexity.* **Nat Genet.** 2002 Jan;30(1):29-30. Epub 2001 Dec 17.
23. Davies, H. et al.: *Mutations of the BRAF gene in human cancer.* **Nature** 417, 949–954 (2002);
24. Downward J: *PI 3-kinase, Akt and cell survival.* **Semin Cell Dev Biol.** 2004 Apr;15(2):177-82.
25. Eastwood, M. A.: *The physiological effect of dietary fiber: an update.* **Annu Rev Nutr,** 12, 19-35 (1992)

26. Ellmerich S, Scholler M, Duranton B, Gosse F, Galluser M, Klein JP, Raul F: *Promotion of intestinal carcinogenesis by Streptococcus bovis*. **Carcinogenesis**. 2000 Apr;21(4):753-6.
27. Fearon E. R. and Vogelstein B.: *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. **Cell** 61: 759–767 (1990)
28. Fielding, Arsenault P.A. Chapuis P.H. et a.: *Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT)*. **J Gastroenterol Hepatol**, 6(4): 325-344. (1991)
29. Flood, Weiss N.S. Cook L.S. Emerson J.C. Schwartz S.M. Potter J.: *Colorectal cancer incidence in Asian migrants to the United States and their descendants*. **Cancer Causes Control**,11(5): 403-411 (2000);
30. Friedman GD, Flick ED, Udaltsova N, Chan J, Quesenberry CP Jr, Habel LA: *Screening statins for possible carcinogenic risk: up to 9 years of follow-up of 361,859 recipients*. **Pharmacoepidemiol Drug Saf**. 2008 Jul;17(7):751.
31. Frischmeyer, P.A. & Dietz, H.C.: *Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease*. **Hum. Mol. Genet**. 8(10):1893-900. 1999
32. Futreal, P. A. et a.: *Somatic mutations in human cancer: insights from resequencing the protein kinase gene family*. **Nature Rev. Cancer** 4, 177–183 (2004)
33. Gaglia P., Atkin W.S., Whitelaw S: *Variables associated with the risk of colorectal adenomas in asymptomatic patients with a family history of colorectal cancer*. **Gut**. 1995 Mar;36(3):385-90.
34. Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE, Menounos PG: *DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent*. **Hum Genet**. 2002 Aug;111(2):115-27. Epub 2002 Jul 16.
35. Giovannucci E.: *Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence*. **J Nutr**. 2001 Nov;131(11 Suppl):3109S-20S.
36. Giovannucci, Rimm E. B. Stampfer M.J. Colditz G.A. Ascherio A. Willett W.: *Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men*. **Cancer Res**, 54(9): 2390-2397 (1994)
37. Giovannucci, Stampfer M.J. Colditz G.A. et al.: *Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the Nurses' Health Study*. **Ann Intern Med**, 129(7): 517-524 (1998);
38. Gold JS, Bayar S, Salem RR: *Association of Streptococcus bovis bacteremia with colonic neoplasia and extracolonic malignancy*. **Arch Surg**. 2004 Jul;139(7):760-5.

39. Greenberg, Baron J.A. Tosteson T.D. et al.: *A clinical trial of antioxidant vitamins to prevent colorectal adenoma. Polyp Prevention Study Group.* **N Engl J Med**, 331(3): 141-147 (1994)
40. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A.: *The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy.* **Nat Rev Cancer**. 2004 May;4(5):361-70.
41. Guillem J.G., Neugut A.I., Forde K.A.: *Colonoscopic screening for neoplasms in asymptomatic first-degree relatives of colon cancer patients—A controlled prospective study.* **Dis Colon Rectum**. 1992 Jun;35(6):523-9.
42. Han, J.H. et al.: *Isolation of full-length putative rat lysophospholipase cDNA using improved methods for mRNA isolation and cDNA cloning.* **Biochemistry** 26, 1617-1625 (1987)
43. Hanada M, Feng J, Hemmings BA: *Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target.* **Biochim Biophys Acta**. 2004 Mar 11;1697(1-2):3-16.
44. Harris TK.: *PDK1 and PKB/Akt: ideal targets for development of new strategies to structure-based drug design.* **IUBMB Life**. 2003 Mar;55(3):117-26.
45. Heid AC, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) *Real Time Quantitative PCR.* **Genome Research**, 6(10): 986-994
46. Heinimann, K.: *Molekulargenetische Diagnostik bei HNPCC (Hereditäres Kolorektal-Karzinom ohne generalisierte Polypose.* **Schweizerische Ärztezeitung** Nr. 36, Seiten 2009–2012 (2000)
47. H-J Lin, F-C Hsieh, H Song and J Lin: *Elevated phosphorylation and activation of PDK-1/AKT pathway in human breast cancer.* **British Journal of Cancer** (2005) 93, 1372 – 1381
48. Hodges, Bernstein S.: *Genetic and biochemical analysis of alternative RNA splicing.* **Adv.Genet.**31, 207-281 (1994)
49. Hogezaand, Eichhorn R.F. Choudry A. Veenendaal R.A. Lamers C.: *Malignancies in inflammatory bowel disease: fact or fiction?* **Scand J Gastroenterol Suppl**, 236: 48-53 (2002)
50. Holland, Abramson R.D. Watson R. Gelfand D.: *Detection of specific polymerase chain reaktion product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase.* **National Academy of Science**, USA 88, 7276-7280 (1991)
51. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: *p53 mutations in human cancers.* **Science**. 1991 Jul 5;253(5015):49-53.

52. Howe, Aronson K.J. Benito E. et a.: *The relationship between dietary fat intake and risk of colorectal cancer: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies.* **Cancer Causes Control**, 8(2): 215-228 (1997);
53. Hsing, McLaughlin J.K. Chow W.H. et a.: *Risk factors for colorectal cancer in a prospective study among U.S. white men.* **Int J Cancer**, 77(4): 549-553 (1998)
54. Huerta S, Srivatsan ES, Venkatasan N, Livingston EH: *Human colon cancer cells deficient in DCC produce abnormal transcripts in progression of carcinogenesis.* **Dig Dis Sci.** 2001 Sep;46(9):1884-91.
55. Hurlstone DP, Wells JM, Bhala N, McAlindon ME: *Ureterosigmoid anastomosis: risk of colorectal cancer and implications for colonoscopists.* **Gastrointest Endosc.** 2004 Feb;59(2):248-54.
56. Hwang D., Rhee S.: *Receptor-mediated signaling pathways: potential targets of modulation by dietary fatty acids.* **Am J Clin Nutr** 70, 545-556 (1999);
57. Jacinto FV, Ballestar E, Ropero S, Esteller M: *Discovery of epigenetically silenced genes by methylated DNA immunoprecipitation in colon cancer cells.* **Cancer Res.** 2007 Dec 15;67(24):11481-6.
58. Jacobs EJ, Thun MJ, Bain EB, Rodriguez C, Henley SJ, Calle EE: *A large cohort study of long-term daily use of adult-strength aspirin and cancer incidence.* **J Natl Cancer Inst.** 2007 Apr 18;99(8):608-15.
59. Jones PA, Baylin SB.: *The fundamental role of epigenetic events in cancer.* **Nat Rev Genet** 2002;3:415–28.
60. Kaczka A, Kumor A, Pietruczuk M, Malecka-Panas E: *Serum concentration of insulin, C-peptide and insulin-like growth factor I in patients with colon adenomas and colorectal cancer.* **Mol Merkur Lekarski.** 2007 May;22(131):373-5.
61. Katso R., Ahmadi K. White S. Timms J. Waterfield M.: *Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, immunity, homeostasis, and cancer.* **Annu Rev Cell Dev Biol** 17: 615–675 (2001);
62. Kikani CK, Dong LQ, Liu F.: *"New"-clear functions of PDK1: beyond a master kinase in the cytosol?* **J Cell Biochem.** 2005 Dec 15;96(6):1157-62.
63. Klein G. *Introduction: genetic and epigenetic contributions to tumor evolution.* **Semin Cancer Biol** 2002;12:327–30.
64. Kliewer EV: *Influence of migrants on regional variations of stomach and colon cancer mortality in the Western United States.* **Int J Epidemiol.** 1992 Jun;21(3):442-9.

65. Knudson, A. G.: *two-hit model, Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma*. **PNAS**, 68, 820-823 (1971)
66. Kornblihtt AR, de la Mata M, Fededa JP, Munoz MJ, Nogues G.: *Multiple links between transcription and splicing*. **RNA**. 2004 Oct;10(10):1489-98
67. Lamond, A.I.: *Nuclear RNA processing*. **Curr. Opin. Cel I Biology** 3, 493-501 (1991)
68. Lawlor MA, Alessi DR: *PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?* **J Cell Sci**. 2001 Aug;114(Pt 16):2903-10.
69. Lawlor MA, Mora A, Ashby PR, Williams MR, Murray-Tait V, Malone L, Prescott AR, Lucocq JM, Alessi DR: *Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice*. **EMBO J**. 2002 Jul 15;21(14):3728-38.
70. LeRoith D, Roberts CT Jr.: *The insulin-like growth factor system and cancer*; **Cancer Lett**. 2003 Jun 10;195(2):127-37.
71. Leslie, N.R., and Downes, C.P.: *PTEN function: how normal cells control it and tumour cells lose it*. **Biochem J**. 2004 Aug 15;382(Pt 1):1-11.
72. Livak, Schmittgen T.: *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2exp-delta delta C(T) Method*. **Methods.**, 25(4): 402-408 (2001)
73. Locke, H. J.: *Cancer mortality risk among Japanese in the United States*. **Natl Cancer Inst**, 65(5): 1149-1156. (1980);
74. Luciani MG, Campregher C, Gasche C: *Aspirin blocks proliferation in colon cells by inducing a G1 arrest and apoptosis through activation of the checkpoint kinase ATM*. **Carcinogenesis**. 2007 Oct;28(10):2207-17. Epub 2007 May 17.
75. 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.: *PIK3CA as an oncogene in cervical cancer*. **Oncogene** 19: 2739–2744 (2000);
76. Maehama, T., and Dixon, J.E. (1998). *The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. **J Biol Chem**. 1998 May 29;273(22):13375-8.
77. Makris C, Voisin L, Giasson E, Tudan C, Kaplan DR, Meloche S: *The Rb-family protein p107 inhibits translation by a PDK1-dependent mechanism*. **Oncogene**. 2002 Nov 7;21(51):7891-6.
78. Marquardt, H.: *multi hit model, Lehrbuch der Toxikologie von H. Marquardt und S. G. Schäfer (Editors)*. **Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft**, Stuttgart (2003)
79. Martin J. P., Clayton S. J., Jacyna M. R., Fox J. C. and Atkin W.S.: *Detection of K-ras mutations in enema washings*. **Gut** 45 (Suppl. V): A337

80. Maurer M, Su T, Saal LH, Koujak S, Hopkins BD, Barkley CR, Wu J, Nandula S, Dutta B, Xie Y, Chin YR, Kim DI, Ferris JS, Gruvberger-Saal SK, Laakso M, Wang X, Memeo L, Rojzman A, Matos T, Yu JS, Cordon-Cardo C, Isola J, Terry MB, Toker A, Mills GB, Zhao JJ, Murty VV, Hibshoosh H, Parsons R.: *3-Phosphoinositide-dependent kinase 1 potentiates upstream lesions on the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in breast carcinoma.* **Cancer Res.** 2009 Aug 1;69(15):6299-306. Epub 2009 Jul 14
81. Maxam, W.: *A new method of sequencing DNA.* **Proceedings of the National Academy of Sciences Bd. 74**, S. 560-564. PMID 265521 PDF (1977)
82. Mead LJ, Jenkins MA, Young J, Royce SG, Smith L, St John DJ, Macrae F, Giles GG, Hopper JL, Southey MC: *Microsatellite instability markers for identifying early-onset colorectal cancers caused by germ-line mutations in DNA mismatch repair genes.* **Clin Cancer Res.** 2007 May 15;13(10):2865-9.
83. Migozuchi M., Mohapatra G. Louis D.: *Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas.* **Brain Pathol** 14: 372–377 (2004)
84. Moghaddam AA, Woodward M, Huxley R: *Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events.* **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2007 Dec;16(12):2533-47.
85. Mora A, Komander D, van Aalten DM, Alessi DR: *PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction.* **Semin Cell Dev Biol.** 2004 Apr;15(2):161-70.
86. Mulcahy H. E. and Farthing M. J.: *K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer.* **Gastroenterology** 112: 1114–1120;
87. Muller, R.: *Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colo-rectal cancer syndrome (HNPCC).* **Cancer Invest.**; 20(1): 102-109 (2002)
88. Mullis, Faloona F.: *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction.* **Methods in Enzymology** 155, 335-350 (1987)
89. Myers, M.P., Pass, I., Batty, I.H., Van der Kaay, J., Stolarov, J.P., Hemmings, B.A., Wigler, M.H., Downes, C.P., and Tonks, N.K. (1998). *The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function.* **Proc Natl Acad Sci USA.** 1998 Nov 10;95(23):13513-8.
90. Nardone G, Compare D, De Colibus P, de Nucci G, Rocco A: *Helicobacter pylori and epigenetic mechanisms underlying gastric carcinogenesis.* **Dig Dis.** 2007;25(3):225-9.
91. Okino ST, Pookot D, Li LC, Zhao H, Urakami S, Shiina H, Igawa M, Dahiya R: *Epigenetic inactivation of the dioxin-responsive cytochrome P4501A1 gene in human prostate cancer.* **Cancer Res.** 2006 Aug 1;66(15):7420-8.

92. Panduro A, Morales L, Santos A, Valdes L, Lima G, Melendez J, Cabrera G, Maldonado V, Villalobos JJ: *New strategies in the clinical evaluation of patients with colon cancer based on molecular studies*. **Rev Gastroenterol Mex**. 1993 Apr-Jun;58(2):119-27.
93. Pariente A., Milan C., Lafon J: *Colonoscopic screening in first-degree relatives of patients with "sporadic" colorectal cancer: A case-control study*. **Gastroenterology**. 1998 Jul;115(1):7-12.
94. 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.: *Colorectal cancer: Mutations in a signalling pathway*. **Nature** 11 August, Vol 436 (2005)
95. Patra SK: *Ras regulation of DNA-methylation and cancer*. **Exp Cell Res**. 2008 Apr 1;314(6):1193-201. Epub 2008 Jan 26.
96. Perera F. P.: *Molecular epidemiology: Insights into cancer susceptibility, risk assessment and prevention*. **J Natl Cancer Institute** 88(8), 496-509 (1996);
97. Perry, R.P. et al.: *On the lability of poly (A) sequences during extraction of messenger RNA from polyribosomes*. **Biochem. Biophys. Acta** 262, 220-226 (1972)
98. Pfaffl, Hageleit M.: *Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT PCR*. **Biotechnology Letters**, 23: 275-282 (2001)
99. Pfaffl, M.W.: *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. **BIOspektrum**, 1/04, 10. Jahrgang (2004)
100. Podsypanina, K., Ellenson, L.H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K.M., Cordon-Cardo, C., Catoretti, G., Fisher, P.E., and Parsons, R.: *Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems*. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1999 Feb 16;96(4):1563-8.
101. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B: *A model for p53-induced apoptosis*. **Nature**. 1997 Sep 18;389(6648):300-5.
102. Potocnik U, Glavac D, Golouh R, Ravnik-Glavac M: *Evaluation of microsatellite markers for efficient assessment of high microsatellite instabile colorectal tumors*. **Pflugers Arch**. 2000;439(3 Suppl):R47-9.
103. Potter, Slattery M.L. Bostick R. ; Gapstur, S.M.: *Colon cancer: a review of the epidemiology*. **Epidemiol Rev**, 15(2): 499-545. (1993)

104. Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almog R, Bonner JD, Rennert HS, Low M, Greenson JK, Rennert G: *Statins and the risk of colorectal cancer*. **N Engl J Med**. 2005 May 26;352(21):2184-92.
105. Rasmussen, R.: Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, Nakagawara, K, eds.: *Rapid Cycle Realtime PCR, Methods and Applications*. **Springer Press**, Heidelberg; ISBN 3-540-66736-9, 21-34 (2001)
106. Reddy BS: *Strategies for colon cancer prevention: combination of chemopreventive agents*. **Subcell Biochem**. 2007;42:213-25.
107. Rigas B: *Novel agents for cancer prevention based on nitric oxide*. **Biochem Soc Trans**. 2007 Nov;35(Pt 5):1364-8.
108. Roth, M.J. et a.: *Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in Escherichia coli*. **J. Biol. Chem**. 260, 9326-9335 (1985)
109. Russo, Franceschi S. La Vecchia C. et a.: *Body size and colorectal- cancer risk*. **Int J Cancer** 78(2): 161-165 (1998);
110. Saiki, Gelfand D.H. Stoffel S.: *Primer- directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. **Science** (1988) Jan 29;239(4839):487-91.
111. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE: *High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers*. **Science**. 2004 Apr 23;304(5670):554. Epub 2004 Mar 11
112. Sanger, Nicklen S. Coulson-A.R.: *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. Bd. 74, S. 5463-5467. PMID 271968 PDF (1977)
113. Schneider J, Schulze G: *Comparison of tumor M2-pyruvate kinase (tumor M2-PK), carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigens CA 19-9 and CA 72-4 in the diagnosis of gastrointestinal cancer*. **Anticancer Res**. 2003 Nov-Dec;23(6D):5089-93
114. Slattery, Sorenson A.W. Ford M.: *Dietary calcium intake as a mitigating factor in colon cancer*. **Am J Epidemiol**, 128(3): 504-514 (1988)
115. Slattery, Sorenson A.W. Mahoney A.W. French T.K. Kritchevsky D. Street J.: *Diet and colon cancer: assessment of risk by fiber type and food source*. **J Natl Cancer Inst**, 80(18): 1474-1480 (1988)
116. Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P., and Mak, T.W.: *Negative regulation of*

- PKB/Akt dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. Cell. 1998 Oct 2;95(1):29-39.*
117. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J, Hawkins PT: *Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. Science. 1998 Jan 30;279(5351):710-4.*
118. Storz P, Toker A: *3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) in PI 3-kinase signaling. Front Biosci. 2002 Apr 1;7:d886-902.*
119. Sulis, M.L., and Parsons, R.: *PTEN: from pathology to biology. Trends Cell Biol. 2003 Sep;13(9):478-83.*
120. Suter CM, Martin DI, Ward RL: *Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. Int J Colorectal Dis. 2004 Mar;19(2):95-101. Epub 2003 Oct 8.*
121. Toribara N.W., Sleisenger M.: *Screening for colorectal cancer. N Engl J Medicine 332(13), 861-867 (1995);*
122. Tran TT, Naigamwalla D, Oprescu AI, Lam L, McKeown-Eyssen G, Bruce WR, Giacca A: *Hyperinsulinemia, but not other factors associated with insulin resistance, acutely enhances colorectal epithelial proliferation in vivo. Endocrinology. 2006 Apr;147(4):1830-7. Epub 2006 Jan 12.*
123. Trock, Lanza E. Greenwald P.: *Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. J Natl Cancer Inst, 82(8): 650-661 (1990)*
124. Tsong WH, Koh WP, Yuan JM, Wang R, Sun CL, Yu MC.: *Cigarettes and alcohol in relation to colorectal cancer: the Singapore Chinese Health Study. Br J Cancer. 2007 Mar 12;96(5):821-7. Epub 2007 Feb 20.*
125. Tung, Shui-Yi & Wu, Cheng-Shyong: *Risk factors for colorectal adenomas among immediate family members of patients with colorectal cancer in Taiwan: a case-control study. Am J Gastroenterol. 2000 Dec;95(12):3624-8.*
126. Tyagi, F. R. K.: *Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nat. Biotechnol. 14: 303-308 (1996)*
127. van Loon AJ, van den Brandt PA, Golbohm RA: *Socioeconomic status and colon cancer incidence: a prospective cohort study. Br J Cancer. 1995 Apr;71(4):882-7.*

128. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD: *Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids*. **Annu Rev Biochem.** 2001;70:535-602.
129. Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J., and Waterfield, M.D.: *Synthesis and Function of 3-Phosphorylated Inositol Lipids*. **Annu Rev Biochem.** 2001;70:535-602. Review.
130. Vivanco, Sawyers C. L.: *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. **Nature Rev. Cancer** 2, 489–501 (2002);
131. Vogelaar I, van Ballegooijen M, Schrag D, Boer R, Winawer SJ, Habbema JD, Zauber AG: *How much can current interventions reduce colorectal cancer mortality in the U.S.? Mortality projections for scenarios of risk-factor modification, screening, and treatment*. **Cancer.** 2006 Oct 1;107(7):1624-33.
132. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. **N Engl J Med.** 1988 Sep 1;319(9):525-32.
133. Walsh JM, Terdiman JP.: *Colorectal cancer screening: scientific review*. **JAMA.** 2003 Mar 12;289(10):1288-96.
134. Wang, T. L. et al.: *Digital karyotyping*. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 99, 16156–16161 (2002)
135. Wells, Abo A. Ridley A. J. J.: *PAK4 is activated via PI3K in HGF-stimulated epithelial cells*. **Cell Sci.** 115, 3947–3956 (2002)
136. Winawer SJ: *Screening of colorectal cancer*. **Surg Oncol Clin N Am.** 2005 Oct;14(4):699-722.
137. Xie Z, Zeng X, Waldman T, Glazer RI.: *Transformation of mammary epithelial cells by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activates beta-catenin and c-Myc, and down-regulates caveolin-1*. **Cancer Res.** 2003 Sep 1;63(17):5370-5.
138. Yasui Y, Suzuki R, Miyamoto S, Tsukamoto T, Sugie S, Kohno H, Tanaka T: *A lipophilic statin, pitavastatin, suppresses inflammation-associated mouse colon carcinogenesis*. **Int J Cancer.** 2007 Nov 15;121(10):2331-9.
139. Zeng X, Xu H, Glazer RI.: *Transformation of mammary epithelial cells by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is associated with the induction of protein kinase Calpha*. **Cancer Res.** 2002 Jun 15;62(12):3538-43.

## **7. Publikationen/ Danksagung**

Die Recherchen, Überlegungen und Experimente für diese Arbeit wurden zwischen September 2005 und März 2007 im Forschungslabor der Gastroenterologie, Innere Medizin II, an der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes gemacht. Herrn Prof. Dr. Stefan Zeuzem danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Klinik durchzuführen.

Ich danke meinen Betreuern Herrn Dr. Guido Plotz und Herrn Dr. Ricardo Biondi für ihr Engagement und ihre stete Hilfsbereitschaft während dieser Arbeit.

Herrn Mark Wormek möchte ich für seine Geduld und Hilfe bei meinen Experimenten danken.

Herrn PD. Dr. Dr. Albrecht Piiper, Herrn Dr. Jörg Hauptenthal, Herrn Thomas Pleli sowie allen anderen wissenschaftlichen Mitarbeitern des Gastro-Labors danke ich für das freundliche Arbeitsklima und die vielfältige Unterstützung, die ich erfahren habe.

Meinen Mitdoktoranden Anna Spina, Anna Nain, Lucas Meyer, Aline Meyer, Marcus Zettler und David Reichard danke ich für die nette freundschaftliche Atmosphäre im Labor und die gemeinsamen Bowlingabende.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## 8. Lebenslauf

Name: Michael Winkfein

Geburtsdatum 19.07.1982

Geburtsort Karlsburg

Familienstand ledig

Staatsangehörigkeit deutsch

Schulische Ausbildung 1989 bis 1993  
Grundschule Aschbach  
1993 bis 2002  
Ludwigsgymnasium Saarbrücken  
Abschluss: Abitur

Zivildienst: 2002 bis 2003

Studium: 2003-2009 Medizinstudium  
an der Universität des Saarlandes  
1.PJ-Tertial: Spital Limattal in Zürich  
2. und 3. PJ-Tertial: Universitätsklinikum  
Homburg

Promotion Beginn September 2005 im  
Forschungslabor der Inneren Medizin II,  
Standort: Universität des Saarlandes,  
Homburg/Saar

Ärztliche Tätigkeit seit Februar 2010 Assistenzarzt  
Herzchirurgie im Herzzentrum Leipzig,  
Prof. Dr. F.-W. Mohr