

**Aus der Klinik für Chirurgie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. H.-P. Bruch**

Mutationen im MKK4-Gen bei kolorektalen Karzinomen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Christina K. Lisk, geb. Behra
aus Mettingen

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med Lutz Mirow
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. med Stefan Peters
- Tag der mündlichen Prüfung: 29.06.2009
- Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 29.06.2009

Gewidmet Anne und Werner Behra

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung und Fragestellung

I.1 MKK4

I.1.1. MKK4 im Zellzyklus

I.1.2. MKK4, aktueller Forschungsstand

I.2. Kolorektales Karzinom

I.2.1. Epidemiologie

I.2.2. Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

I.2.3. Prognose

I.2.4. Therapie, Nachsorge und Früherkennung des kolorektalen Karzinoms

I.3. Aufgabenstellung und Hypothese

II. Material und Methoden

II.1. Material

II.2. Methodenfindung

II.3. Methode

II.3.1. RNA-Extraktion

II.3.2. RT-Ansatz

II.3.3. Half Nested PCR

II.3.4. Gel-Elektrophorese

II.3.5. Ligation und Klonierung

II.3.6. MiniPrep

II.3.7. DNA Kontrolle

II.3.8. Sequenzierung

II.3.9. MaxiPrep

III. Darstellung der Ergebnisse

III.1. Patientenkollektiv

III.2. Nachgewiesene Mutation

III.3. Auswertung der Daten

IV. Diskussion der Ergebnisse unter Berücksichtigung von Prognose und Überlebenszeit

V. Zusammenfassung

VI. Literaturverzeichnis

VII. Anhang

VII.1. Geräte und Chemikalien, Mixturen

VII.2. Primersequenzen

VIII. Danksagung

IX. Lebenslauf

I. Einleitung

I.1. MKK4

I.1.1. MKK4 im Zellzyklus

Humane Zellen reagieren auf externe Reize unter anderem durch Aktivierung der von mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) vermittelten Signalwege. Dies bewirkt eine enzymatische Vervielfältigung des Signals, so dass die Zelle auf den Reiz reagieren kann. [20]

Es gibt mindestens drei MAPK Signalwege: ERK, p38 Kinase und JNK.

Dabei steht ERK für extrazelluläre signalregulierte Kinase und JNK für cJun NH₂ terminierte Kinase. JNK und p38 werden auch als SAPK Familie zusammengefasst, diese Abkürzung steht für stressaktivierte Protein Kinasen. Mitogenaktivierte Proteinkinasen werden durch duale Phosphorylierung von MAPK-Kinasen (MKK) aktiviert. MAPKs können extrazelluläre Wachstums- oder Stresssignale durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren an den Zellkern weitergeben. ERK vermittelt Signale von Wachstumsfaktoren, p38 und JNK Stressoren Signale.

Unter Stressoren werden äußere Einflüsse wie proinflammatorische Zytokine, besonders Interleukin 1 und Tumonekrosefaktor α , UV-Strahlung, Hitzeschock und genotoxische Mittel wie Anisomycin verstanden.

Die Mitogenaktivierte Proteinkinase Kinase 4 (MKK4) ist der Hauptaktivator von JNK, kann aber auch p38 phosphorylieren. Sie ist in der Lage JNK dual an Threonin (THR) und Tyrosin (TYR) zu phosphorylieren. [11; 15] Bei beiden handelt es sich um Aminosäuren mit ungeladenen Seitenketten. Damit nimmt MKK4 eine zentrale regulatorische Position im Signalweg ein und beeinflusst Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose.

MKK4 löst über JNK eine stressaktivierte Apoptose aus. Unter Apoptose versteht man eine aktive Form von Zelltod, in deren Verlauf charakteristische morphologische Zellveränderungen auftreten. Dazu gehört neben

Zellschrumpfung und Chromatinkondensierung zumeist auch die Fragmentierung genomischer DNA.

MKK4 selbst wird dabei von MEKK2 und 3 durch Phosphorylierung an THR 262 aktiviert und phosphoryliert seinerseits JNK an THR 183 und TYR 185. JNK aktiviert die Transkriptionsfaktoren cJun und AF2, welche im Nukleus die Expression von c-jun bewirken. [13; 14] In Abbildung 1 wird dieser Signalweg noch einmal graphisch dargestellt.

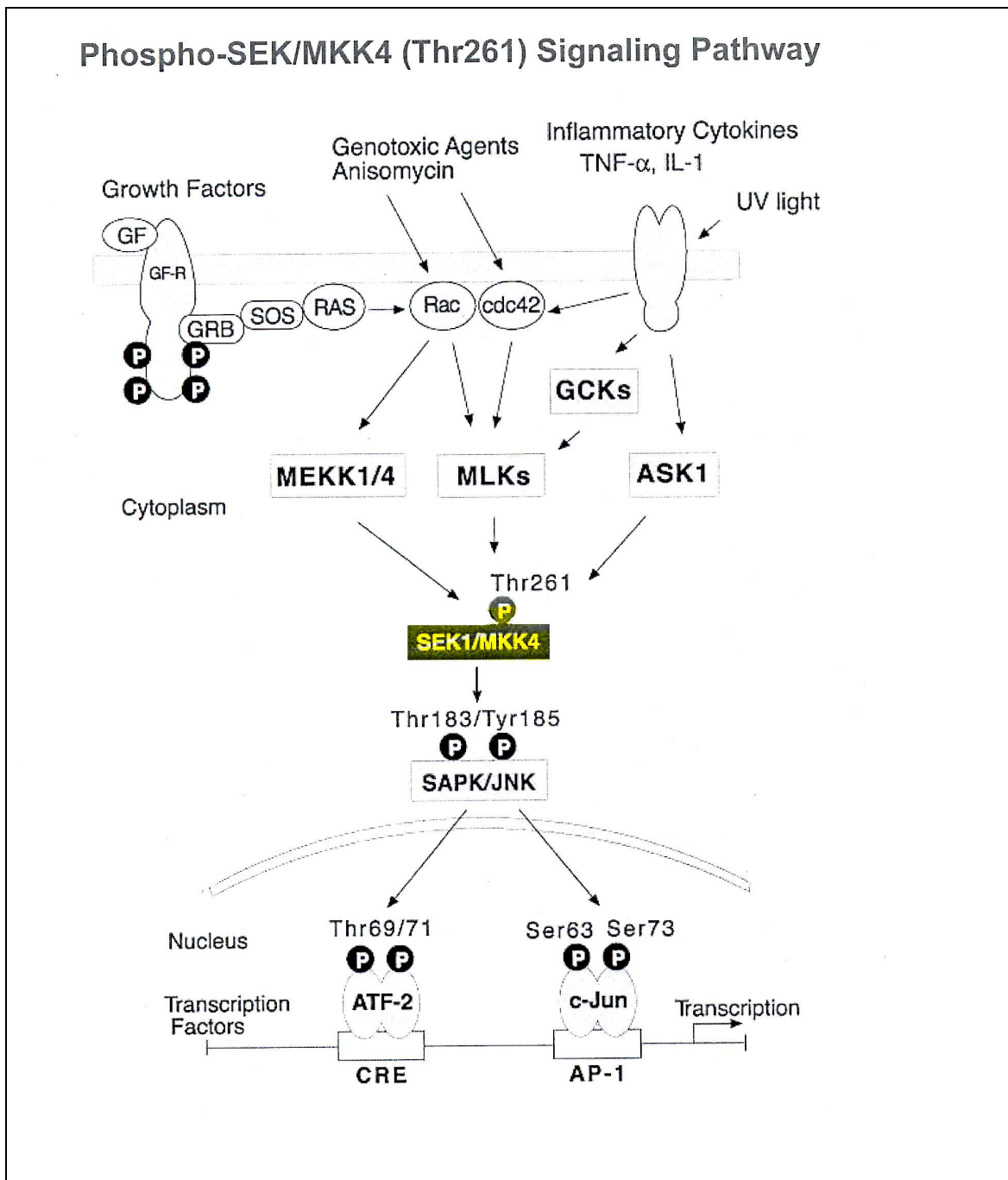


Abbildung 1: Darstellung von MKK4 im MAPK Signalweg (Cuenda, A [11])

In neueren Studien zeigte sich insbesondere ein enger Zusammenhang mit TNF-induzierter Apoptose, welche über das NF Kappa B System vermittelt wird. [42] Mitogen-aktivierte Kinase Kinase vier oder mitogen-activated protein kinase kinase four wird im Schrifttum mit MKK4 abgekürzt und ist Mitglied der MAPK Kinase Familie. Sie wird auf Chromosom 17 des menschlichen Genoms kodiert. Die Lokalisation des Gens wird mit 17p11.2 beschrieben. Dies liegt etwa 10cM zentromer von der p53 kodierenden Region. Das Protein umfasst 399 Aminosäuren, seine katalytische Domäne umfasst elf Subdomänen. MKK4 wurde 1994 erstmals in Mäusen kloniert. Zunächst wurde sie als stressaktivierte Proteinkinase ERK Kinase 1 bezeichnet, die gängige Abbeviriation im Schrifttum lautet SEK1. Ein weiteres Synonym von MKK4 lautet JNK-Kinase. Dabei wird Bezug genommen auf die Wirkung von MKK4 als Hauptaktivator von JNK im zellulären Stresssignalweg. D. Teng gliederte das MKK4 Gen in elf Exons, die mit A bis K bezeichnet werden. Exon A enthält dabei das 5'Ende der cDNA (kodierende DNA), Exon K das Stoppcodon des Gens. [46] Im Gegensatz dazu nummerierte A. Cuenda die Exons in römischen Zahlen von I bis XI. [11] Da sich bei Studienende keine der beiden Einteilungen durchgesetzt hatte, ist die untenstehende kodierende Sequenz des MKK4 Gens ohne Einteilung in die verschiedenen Abschnitte aufgeführt:

```
ctccaacaatggcggctccgagcccgagcggcgggcgggcgggctccggggcggcagcggcagcggcaccggc  
cccgtaggggtcccgggcggcaggccaccggccgtcagcagcatgcagggtaaacgcaaagcactgaagttgaat  
gcaaatccacctttcaaatctacagcaagggttactctgaatcccaatcctacaggagttcaaacccacacatagagag  
tgagaacacacagcattgagtcacaggaactgaagatctcccctgaacaacactgggatttactgcagaggactga  
aagaccttggagaaattggacgaggagcttatggttctgtcaacaaatgggtccacaaaccaagtgaggcaataatgg  
gttaaaagaattcggtaaacagt  
gatgaaaagaacaaacacttcttatggattggatgtagtaatcgggagtagtgattgccatacattgttcagtttat  
gtgactctcagagagggtagtgattgtagtgaactcatgctacctcgttgataagtttacaaatatgtatatagt  
gtattagat  
gatgattattccagaagaaatttaggcaaaatcactttagcaactgtgaaagcactaaaccacttaaagaaactgaaaatt  
attcacagagatatcaaacctccaatattctctggacagaagtggaaatattaagctctgtgacttcggcatcagtgga  
cctgtggactct  
attgccaagacaagagatgctggctgtaggccatacatggcactgaaagaatagaccaagcgatcacgacaaggat  
atgatgctcgtctgatgtctggagttgggatcacattgtatgagtggccacaggccgatttccttatccaaagtgaata
```


gtgtatttgatcaactaacacaagtcgtgaaaggagatcctccgcagctgagtaattctgaggaaaggaattctccccgag
tttcatcaactttgtcaacttgccttacgaaggatgaatccaaaaggccaaagtataaagagcttctgaaacatccctttatt
ttgatgtatgaagaacgtgccgttgaggtcgcagctatgtttgtaaaatcctggatcaaagccagctactcccagctctccc
atgtatgtcgattgatatcgtgctacatcagactctagaaaaagggtgagaggaagcaagacgtaaagaatttcatcc
cgtatcacagtgttttattgctcgcccagacacatgtgcaataagattgggtgttcgtttccatcatgtctgtatactcctgtcac
ctagaacgtgcatccttgaatacctgattgatcacacagtgftagtgctggtcagagagacctcatcctgtcttttggatga
acatattcatgaaatgtggaagtcagtacgatcaagttgtgactgtgattagatcacatctaaattcatttctagactcaaaac
ctggagatgcagctactggaatgggtgtttgtcagacttccaaatcctggaaggacacagtgatgaaatgactatactgaac
atagaaactcgggcttgagtgagaagagctgcacagccaacgagacacattgccttctggagctgggagacaaaggag
gaatttactttctccaaagtgcaatagattactgatgtgatattctgttgctttacagttacagttgatgtttggggatcgtgtg
ctcagccaaatttctgtttgaaatatcatgttaattagaatgaatttatctttacaaaaacatgttgcgttcaaagaggtga
acattaaatatagagacaggacagaatgtgttctttctcctctaccagtcctattttcaatgggaagactcaggagtctgcc
acttgtcaaagaaggtgctgatcctaagaattttcattctcagaattcgggtgtgctgccaactgatgtccacctgccacaaa
ccaccaggactgaaagaagaaaacagtcacagaaggcaaaagttacagatgttttaattctagtattttatctggaacaacttg
tagcagctatatattccccttggtccaagcctgatactttagccatcataactcactaacaggggagaagtagctagtagca
atgtgccttgattgattagataaagatttctagtaggcagcaaaagaccaaactcagttgtttgcttcttccatcactggtcca
ggtcttcagttccgaatcttttcccctcccctgtggcttattgtcgtatgtgacttgcgcttaatccaatattttgcctttttctat
atcaaaaaacctttac
agttagcagggtgttctaccgaggatttttaaccccaatctctcataatcgctagtgtttaaaaggctaagaatagtggtg
gcccaaccgatgtggtaggtgataaaggatcctttctagagacacattggaccagatgaggatccgaaacggcagcc
tttacggtcatcacctgctagaacctctcgtagtcacatcaccatttctggcattggaattctactggaaaaatacaaaaagc
aaaaaaaaacctcagcactgttacaagaggccatttaagtatcttgtgcttctcacttaccattagccagggttctcattagg
tttgcttgggctccctggcactgaaccttaggctttgtatgacagtgaagcagcactgtgagtggttcaagcacactggaa
tataaacagtcattggcctgagatgcaggatgccattacagaaccaaactcgtggcacgtattgctgtgtctcctctcaga
gtgacagtcataaactgtcaacaataaagggagaatgggtgctgtttaaagtcacatccctgtaaattgcagaattcaaaa
gtgattatctttgatctacttgcctcattccctatcttctccccacggatcctaaacttagacttcccactgttctgaaagg
agacattgctctatgtctgcctcgaccacagcaagccatcatcctcattgctcccggggactcaagaggaatctgtttctct
gctgtcaacttccatctggctcagcatagggctacttggcattatgcaaatggagataaaagcaattctggctgtccagga
gctaactgaccgttctattgtgtggatgaccacataagaaggcaatfttagtgattaatcatagattattataactataaactt
aagggaaggagttattacaatgtatctttatataaaacaaaagggtgtatagttcaciaactgtgaaaatagtgtaagaac
tgtacattgtgagctctggttattttcttctgtaccatagaaaaatgataaaaattatcaaaaagctaagtgcagggatattgc
cttatttctgtgaaaaatggagctcagtaacataactgcttctggagctttggaatattttatcctgtattcttgttt

Abbildung 2: MKK4, Auflistung der kodierenden DNA nach der Generierungssoftware Primer Express® (ABI PRISM, Foster City, USA)

I.1.2. MKK4, aktueller Forschungsstand

Zu Beginn unserer Arbeit wurde MKK4 international als neues Protoonkogen vergleichbar ras oder p53 diskutiert. In zahlreichen Publikationen wurde auf seine Stellung im Stressstoffwechsel des Menschen hingewiesen. [33; 47;48;18;51;58] Zudem beschäftigten sich mehrere Forschungsgruppen mit der Bedeutung der Anwesenheit von MKK4 in kanzerös veränderten Geweben und der Möglichkeit einer prognostischen Aussage der Anwesenheit von MKK4. [36] Besonders Cuenda, A. beschäftigte sich intensiv mit den Funktionen von Mitogen-aktivierter Kinase Kinase 4 im MAP-Kinasen-Signalweg sowie dessen Schlüsselfunktion bei der Reaktion des menschlichen Organismus auf äußere Stressoren wie UV-Strahlen oder inflammatorische Zytokine, insbesondere im Rahmen der Apoptose. [11] Ihre Einteilung des MKK4 Genoms in elf Anteile, durchnummeriert in römischen Ziffern, konnte sich jedoch nicht durchsetzen. Ferner führte sie aus, dass MKK4 knock-out Mäuseembryonen an abnormer Hepatogenese erkranken und bereits vor dem 14. embryonalen Tag versterben. In isolierten Zellreihen dieser MKK4-losen Zellen zeigte sich eine verminderte Fähigkeit auf äußere Stressfaktoren angemessen zu reagieren, zudem zeigte sich eine deutlich verminderte Interleukin 2 Produktion. Bereits A. Cuenda schilderte Mutationen von MKK4 in Tumorgeweben und äußerte die Vermutung, MKK4 könnte eine Rolle als Tumorsuppressorgen zukommen. Als Zukunftsaussicht sah sie die Chance, dass eine Kontrolle von MKK4-Aktivität und -Ausbildung neue Ansätze der Krebs- oder Entzündungstherapie liefern könnte.

Eine Darstellung des Tyrosinkinaseprofils wurde von Wu, CW et al. als möglicher Weg zur Entdeckung neuer Therapieansätze beschrieben. [55] Dazu stellte die Forschungsgruppe das Kinaseprofil des menschlichen Magenkarzinoms dar und argumentierte, dass die Kenntnis des gesamten Expressionsmusters der Kinasen sowie der zugehörigen Signalwege zum besseren Verständnis der Tumorprogression sowie der Erkenntnis möglicher Tumormarker führen könnte. Sie stellten über 50 Tyrosinkinasen im Magenkarzinomgewebe dar und entschieden sich zu weiterführenden immunhistochemischen Untersuchungen an MKK4 und gelangten dabei zu dem

Schluss, dass MKK4 aufgrund seiner zentralen regulatorischen Position eine prognostische Signifikanz in Bezug auf rückfallfreie Zeit und Überlebenszeit für diese Tumorform und auch andere Tumore haben könnte. [55]

Auch die Gruppe um D. Robinson erstellte ein Tyrosinkinaseprofil, jedoch von Prostatakarzinomgewebe. Auch hier stellte sich MKK4 als eine der entscheidenden dualen Kinasen dar. Die Gruppe empfahl eine weiterführende Differenzierung der Kinasen zum Verständnis von Wachstum und onkogenen Signalen des Prostatakarzinoms. [35]

In nachfolgenden Untersuchungen stellte B. A. Yoshida mit ihren Kollegen fest, dass bei Prostatakarzinomen gehäuft Krebszellen in die Lunge metastasieren, jedoch wachstumsinhibiert blieben. In aktiven Krebsmetastasen bei Ratten stellten sie ein Fehlen der 70cM Region des Chromosoms 17 fest. Daraus zogen sie die Schlussfolgerung, in dieser Region müsse ein Metastasen-supprimierender Genabschnitt ohne Einfluss auf das Wachstum des eigentlichen Primärtumors liegen. Sie identifizierten MKK4 als möglicherweise in Frage kommendes Enzym und bestätigten diese Vermutung durch Transfektion von Tumorrattenzellen mit MKK4. Diese zeigten in Folge eine signifikante Reduktion der Metastasierungsfähigkeit. [59] In der Folgearbeit übertrug die Forschungsgruppe unter H. L. Kim ihre Ergebnisse auf humanes Prostatakarzinomgewebe. Auch hier zeigte sich eine signifikante, direkte und inverse Beziehung zwischen MKK4-Anwesenheit und Tumorprogressionsrate. Es zeigte sich eine einheitliche Herabregulierung von MKK4 während der Prostatakarzinomprogression. Diese Resultate wurden als Unterstützung der These gewertet. Des Weiteren fand die Gruppe Hinweise auf unregelmäßige Mutationen der MKK4 Gensequenz, welche einen Verlust der Heterozygotie bewirkte. [21]

In diesem Zusammenhang führten Teng, DH et al. eine umfangreiche Aufstellung von Mutationen mit Verlust der Heterozygotie von MKK4 durch. Sie untersuchten dabei Tumorgewebe von Bauchspeicheldrüsen-, Lungen-, kolorektalen -, Brust- und Hodenkarzinomen. Dabei stellten sie einen Verlust der Phosphorylierungsfähigkeit des MKK4 Proteins nach Mutation fest. Insgesamt fanden sie 6 kodierende Mutationen in 231 Gewebeproben, entsprechend ~3%. Die Gruppe um Teng, DH folgerte, dass Veränderungen

des MKK4-Gens von Bedeutung für die Tumorprogression verschiedener Gewebe sein könnten, insbesondere gingen sie von der Möglichkeit einer Suppression von Metastasierung und Tumorgenese aus. [46] Im Gegensatz dazu steht jedoch die Studie von W. Lei, P. Yong und L. D. Jia, die die Anwesenheit von MKK4 in Brust- und Pankreaskarzinomzellen eher als protoonkogenetischen Faktor betrachten. Sie leiten dies aus der erhöhten Anfälligkeit für Stresssignale in MKK4-knock-out Geweben sowie einem verringerten Größenwachstum dieser Zellen ab. [24] Vergleichbar wurde in höhergradigen Prostatakarzinomen eine erhöhte MKK4 Expression festgestellt. [26]

Su, GH et al. konnten in ihren Studien eine durchschnittliche MKK4 Mutationsrate von 2 bis 5% in Tumorgeweben von Lunge, Gallenwegen und Bauchspeicheldrüse nachweisen. Da es sich dabei um somatische Missense-Mutationen handelte, favorisierte die Gruppe MKK4 weiterhin als Angriffspunkt für mutagene Substanzen im Rahmen der Tumorgenese. Durch eine genauere Verständnis der Veränderungen im zellulären Signalweg durch Mutationen im MKK4 Gen erwartete die Forschungsgruppe die Gewinnung neuer Erkenntnisse hinsichtlich der Prognose von betroffenen Patienten. Sie sahen die Möglichkeit, dass es sich bei diesem Tumorsignalweg um einen vom p53 System losgelösten Signalweg handeln könnte. [44] In folgenden Studien bestätigten sie die MKK4 Mutationsrate von 5% auch für Brustkrebsgewebe. [45] Ergänzend führten Xin Wei et al. an, dass MKK4 Verlust in Pankreaskarzinomgeweben aufgrund von homozygoten Veränderungen des MKK4 Gens vorliegen kann und dieser Verlust in enger Relation zum Fortschreiten der Krankheit steht. [54]

Beim Magenkarzinom jedoch konnten Chae, KS et al. hingegen nur unregelmäßige genomische Veränderungen im MKK4 Allel darstellen. Darüber hinaus konnten sie auch im Falle der Mutationen keine somatische Auswirkung feststellen. Daher sprechen sie MKK4 auch eine Rolle in der Tumorgenese des Magenkarzinoms ab. [10] Im direkten Widerspruch dazu steht jedoch die Gruppe um S. C. Cunningham, die in resezierten Magenadenokarzinomen einen Zusammenhang zwischen fehlender Expression von MKK4 und einer deutlich reduzierten Überlebenszeit des Patienten feststellte. Diese Gruppe

erhofft sich, in MKK4 einen zukünftigen nützlichen Prognosefaktor identifiziert zu haben.

In einer Studie der Universität von Chicago wurde der anzunehmende zelluläre Signalweg einer MKK4 bedingten geringeren Metastasenrate in Ovarialkarzinomen identifiziert: MKK4 selbst kann sowohl über JNK als auch über p38 auf Zellstressfaktoren reagieren, MKK7 jedoch nur über JNK, MKK6 ist dagegen spezifischer Aktivator von p38. Die Expression sowohl von MKK4 als auch MKK6, jedoch nicht die Anwesenheit von MKK7, hatten dabei einen supprimierenden Effekt auf die Metastasierung. Somit handelt es sich vermutlich um ein Resultat der Aktivierung des p38 Systems.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Datenlage zu MKK4 zwar mannigfaltig ist, genauso zahlreich sind aber auch die unterschiedlichen Ansichten zur Rolle von MKK4 Expression in der Tumorprogression und Suppression. Insgesamt ist die detaillierte Erforschung der Funktion des MKK4 Signalswegs weiterhin interessant und bedarf differenzierter Untersuchungen. Eine unterschiedliche Auswirkung der MKK4 Expression in den verschiedenen Tumorgeweben scheint möglich. [36;12;19]

I.2. Kolorektales Karzinom

I.2.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist mit 15% aller Krebserkrankungen in Westeuropa und den USA einer der häufigsten Tumore. Bei Männern steht es an zweithäufigster Stelle, nur noch vom Bronchialkarzinom übertroffen. Frauen erkranken lediglich häufiger an Brustkrebs, auch hier steht es an zweithäufigster Stelle.

Der Manifestationsgipfel liegt zwischen dem fünften und siebten Lebensjahrzehnt. Ein Auftreten vor dem vierzigsten Lebensjahr ist eher selten. Es gibt keine geschlechtsspezifische Verteilung.

Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms in der BRD beträgt 24 Personen pro 100.000 Einwohner und Jahr. Jeder 50. Deutsche entwickelt im Laufe seines Lebens ein kolorektales Karzinom.

Leider ist die Häufigkeit in den letzten Jahren stetig steigend. Zudem wird das Karzinom oft erst sehr spät entdeckt, so dass es zu diesem Zeitpunkt bereits zu Metastasenabsiedlung gekommen ist. Der Grund dafür liegt in den recht unspezifischen Symptomen, die das kolorektale Karzinom hervorruft: Obstipation oder Durchfall, Tenesmen, Meteorismus und Flatulenz. Wichtige Warnsymptome sind unklarer Gewichtsverlust, Anämie, Blut im Stuhl und perianale Blutung.

Das kolorektale Karzinom findet sich am häufigsten im Rektum (60%), seltener im Sigma (15 - 20%). Zäkum und Colon ascendens sind zu 10% betroffen, alle übrigen Abschnitte nur selten. [52]

Die hämatogene Metastasierung erfolgt in dreiviertel der Fälle in die Leber, aber auch Lungen- und Knochenmetastasen kommen vor. Die lymphogene Metastasierung hängt von der Lokalisation ab, die häufigen tiefsitzenden Tumoren metastasieren zu den paraaortalen Lymphknoten, lateral in die Beckenlymphknoten sowie zusätzlich in die inguinalen Lymphknoten. Da die weiter oben gelegenen Tumore nicht in dieses große Lymphabflussgebiet streuen, haben die tiefsitzenden Tumore die schlechteste Prognose.

In 2 – 3% liegen multiple Karzinome vor, daher ist bei einem Karzinom immer eine abklärende, komplette Koloskopie indiziert.

Es werden drei Ursachen für das kolorektale Karzinom unterschieden:

Zum einen scheint die Ernährung eine wichtige Rolle zu spielen: Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, hoher Eiweißgehalt, wenig Ballaststoffe, Nitrit-Pökelsalze, Chenodexocholsäure und ein hoher Alkoholgenuss wirken begünstigend auf die Tumorentstehung.

Zum Zweiten gibt es hereditäre kolorektale Karzinome, zum Beispiel das so genannte Lynch-Syndrom. Dies ist eine seltene, autosomal-dominant vererbte Sonderform des Kolonkarzinoms, bei der multiple Karzinome bereits um das 45. Lebensjahr auftreten. Diese finden sich gehäuft proximal im rechten Kolon. Das Lynch-Syndrom betrifft etwa 4 – 6% aller Patienten mit Kolonkarzinomen.

Der dritte Faktor ist durch genetische Veränderungen bedingt, in diesem Rahmen spricht man von Adenom - Karzinom - Sequenz. Darunter versteht man die Veränderung des normalen Darmepithels durch Mutation oder Verlust von zum Teil bereits bekannten Genabschnitten. Aufgrund dieser Alterationen entsteht zunächst ein Adenom, welches durch weitere Veränderungen zum Karzinom wird. Zusätzliche Genveränderungen induzieren die Metastasenbildung. Wohl am besten bekannt sind in diesem Kontext der 17p - Verlust (p53) und die ras-Mutation (12p).

Als Zwischenform zwischen dem zweiten und dritten Faktor kann man die Polyposis-Syndrome ansehen. Hier treten hereditär bedingt gehäuft Hamartome oder Adenome auf, die dann mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit zu Karzinomen entarten. Namentlich erwähnt seien hier nur die familiäre Polyposis coli, die zu 100% entartet. Einzige prophylaktische Möglichkeit ist die komplette Kolektomie. Ferner das Peutz-Jeghers-Syndrom, bei dem das Risiko gastrointestinaler Karzinome insgesamt 50% beträgt.

Makroskopisch können polypöse, manschettenförmig stenosierende, schüsselförmig ulzerierende und diffus infiltrierende Tumoren unterschieden werden. In der histologischen Untersuchung zeigen sich zu 95% Adeno- und Gallertkarzinome, des Weiteren kommen Siegelringzell-, adenosquamöse und nichtklassifizierte Tumore vor. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass besonders die sehr seltenen Plattenepithelkarzinome, Leiomyosarkome,

maligne Karzinoide, maligne Melanome sowie die bei AIDS auftretenden Kaposi-Sarkome sich durch eine sehr schlechte Prognose auszeichnen.

I.2.2 Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

Es gibt verschiedene Einteilungen des kolorektalen Karzinoms, von denen hier nur die drei gängigsten beschrieben werden: Die Dukes Einteilung, das TNM – System sowie die UICC Einteilung. Dabei kann zur Zeit die TNM Einteilung als das klinisch genutzte System verstanden werden. [4;31]

TNM – Klassifikation nach UICC 2002 [43]

Diese entspricht der derzeitigen klinischen Einteilung.

T = Primärtumor

- T_x Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T₀ Kein Anhalt für Primärtumor.
- T_{is} Karzinom *in situ*
- T₁ Tumor infiltriert Submukosa
- T₂ Tumor infiltriert Muscularis propria
- T₃ Tumor infiltriert Serosa und perikolisches Fettgewebe
- T₄ Tumor infiltriert über das viszerale Peritoneum hinaus bis in anliegende Nachbarorgane

N = Regionäre Lymphknoten

- N_x Lymphknotenmetastasen nicht beurteilbar
- N₀ Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N₁ Metastasen in 1 – 3 regionären Lymphknoten
- N₂ Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten

M = Fernmetastasen

- M_x Fernmetastasen nicht beurteilbar
- M₀ Keine Fernmetastasen
- M₁ Fernmetastasen, inklusive nicht regionärer Lymphknoten – Metastasen

Abbildung 3: TNM - Klassifikation

Steht vor der Angabe der Klassifikation der kleingeschriebene Buchstabe p, so bedeutet dies, dass es sich um eine postoperative Bewertung im Rahmen des geschilderten TNM-Systems handelt. Der Großbuchstabe R kennzeichnet ein Tumorrezidiv Stadium.

Ferner kann eine Einteilung nach dem Differenzierungsgrad des Gewebes vorgenommen werden:

Histopathologisches Grading

G₁ Gut differenzierter Tumor

G₂ Mäßig differenzierter Tumor

G₃ Schlecht differenzierter Tumor

G₄ Undifferenzierter Tumor, auch entdifferenzierter oder anaplastischer

Abbildung 4: Einteilung nach histopathologischem Befund [7]

Als dritte Einteilungsmöglichkeit des kolorektalen Karzinoms wird gelegentlich die Stadieneinteilung nach Dukes und Turnbull genutzt:

Einteilung nach Dukes und Turnbull

- Dukes A: Tumorwachstum auf die Darmwand beschränkt.
- Dukes B: Tumor infiltriert alle Darmwandschichten, aber keine Lymphknoten
- Dukes C: lokale Lymphknotenmetastasen,
- Dukes D: Fernmetastasen

Dukes C und D sind unabhängig von der Ausbreitung des Primärtumors.

5-Jahres Überlebensrate nach Dukes und Turnbull

Dukes A: 90%

Dukes B: 60-80%

Dukes C: 20 – 50%

Dukes D: 3%

Abbildung 5: Einteilung nach Dukes und Turnbull

Klinische Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms

Zusammenfassend kann man die Einteilungen des kolorektalen Karzinoms in folgender Tabelle darstellen:

UICC Stadium	T - Stadium	N – Stadium	M - Stadium	Dukes / Turnbull
UICC 0	Tis	N0	M0	A
UICC I	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	A
UICC II	T3	N0	M0	B
	T4	N0	M0	B
UICC III	jedes T	N1	M0	C
	jedes T	N2	M0	C
UICC IV	jedes T	jedes N	M1	D

Tabelle 1: Klinische Stadien des kolorektalen Karzinoms (UICC 2002)

I.2.3. Prognose

Die 5-Jahres-Überlebensrate aller kolorektalen Karzinome wird mit 50% beziffert. Unter Ausschöpfung der gegenwärtig verfügbaren maximalen kurativen Therapie wird die Prognose für das Stadium UICC I mit 80% Fünf-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) bezeichnet, für UICC II beträgt die 5-JÜR noch 60 - 70%, für UICCIII nur 30 - 40%. Mit 5 - 20% hat das UICC Stadium IV die schlechteste Prognose. [43]

I.2.4 Therapie, Nachsorge und Früherkennung des kolorektalen Karzinoms

Die Therapie des kolorektalen Karzinoms richtet sich nach der Tumorlokalisation. Prinzipiell sollte jeder operable Tumor reseziert werden. Dabei ist nach onkologischem Standard zu operieren, also mit radikulärem Absetzen der Gefäße, no-touch Technik und En-bloc-Lymphadenektomie. Bei ausgedehntem Tumor kann eine Kolektomie notwendig sein. Bei vollständiger R₀-Resektion kann von einer Heilung des Patienten ausgegangen werden.

Bei Inoperabilität mit Ileus kann palliativ eine Umgehungsoperation oder eine Stomaanlage indiziert sein. [16]

Das Kolonkarzinom wird zunächst operativ versorgt, im Anschluss erfolgt eine adjuvante Chemotherapie, wenn ein Befall von Lymphknoten festgestellt wurde. Dabei gilt die Kombination von 5-Fluorouracil/Folinsäure plus Oxaliplatin (sogenanntes FOLFOX4 Schema) als Erstlinientherapie. Zudem wird der gegen den Rezeptor für epidermalen Wachstumsfaktor gerichtete Antikörper Cetuximab als mögliche Ergänzung erwogen. [34] Beim Rektumkarzinom ist bei hohem Ausgangstumorstadium eine neoadjuvante Strahlentherapie zur Reduktion des Tumolvolumens indiziert, alternativ ist bei großem Volumen auch eine neoadjuvante Radiochemotherapie mit 5-Fluorouracil/Folinsäure möglich. Nach der Operation kann ebenfalls eine adjuvante Strahlentherapie durchgeführt werden. [52] Zusätzlich kann eine adjuvante Chemotherapie, beispielsweise mit Levamisol oder Leukovorin plus 5-FU, im Tumorstadium Dukes C oder T3N0M0 eingesetzt werden. Dies ist bei Fernmetastasen nicht mehr möglich.

Bei Fernmetastasen hat die Chemotherapie nur eine palliative Funktion. Solitäre Metastasen der Leber und Lunge können reseziert werden. Die vollständige Resektion einer Lebermetastase hebt die 5-JÜR auf bis zu 40% an. Abgesehen von der vollständigen operative Entfernung der Metastasen können auch Methoden zur Ausbreitungseinschränkung und Volumenreduktion eingesetzt werden, zum Beispiel die Lasertherapie, die Kryotherapie oder Immuntherapie.

Die Tumornachsorge soll Rezidive und Metastasen zu einem Zeitpunkt entdecken, da diese noch behandelbar sind. Da 70% dieser Ereignisse in den ersten 2 Jahren auftreten, ist in diesem Zeitraum das Nachsorgeintervall mit drei Monaten besonders kurz. Nach 2 Jahren wird das Intervall auf sechs Monate verlängert, nach fünf Jahren findet nur noch jährlich eine Nachsorgeuntersuchung statt. [34]

Prophylaktisch sollte bei jedem Patienten ab 50 Jahren alle 2 Jahre ein Haemoccult® - Test sowie eine digitale rektale Untersuchung durchgeführt werden, um das kolorektale Karzinom vor seiner Metastasierung erkennen zu können. Dabei hat der Test auf okkultes Blut eine Sensitivität von 50-80%, jedoch sind die Ergebnisse in zwei von drei Fällen falsch-positiv, so dass der Test nur eine geringe Spezifität vorweisen kann. [52]

An einem weiteren prophylaktischen Ansatz wird zur Zeit geforscht. Es ist bei Follow-up Studien zur regelmäßigen Einnahme von Acetylsalicylsäure aufgefallen, dass sich das Karzinomrisiko um 30 – 50% zu vermindern scheint. Weitere Studien sind in Arbeit. [41;40;17]

I.3. Aufgabenstellung und Hypothese

Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Erstellung einer optimierten Methode zum Nachweis von Mutationen im MKK4-Gen sowie die Ermittlung der Mutationsrate von MKK4 in kolorektalen Karzinomen, des Weiteren soll der Einfluss von Mutationen im MKK4 Gen auf die Prognose des Patienten und auf das Tumorstadium untersucht werden, sowie ein möglicher Genort hoher Mutationsrate identifiziert werden.

Als Hypothese kann davon ausgegangen werden, dass die Mutationsrate des MKK4 Gens etwa fünf Prozent beträgt.

II. Material und Methoden

II.1. Material

Bei den in dieser Studie verwendeten Proben kolorektaler Karzinome handelt es sich um bereits vorhergehend untersuchte Proben aus einer Studie unserer Arbeitsgruppe zum Thema „Expression von MKK4 in kolorektalen Karzinomen“. Diese ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unpubliziert. [29;30] Es handelte sich um ein Kontingent von 99 Proben, die einer Expressionsanalyse unterzogen wurden.

Für die vorhergehende Studie war aus den auf Stickstoff gelagerten Tumoren RNA isoliert und extrahiert worden sowie die Tumor RNA mittels reverse Transkriptase in DNA umgewandelt worden. Mittels Immunhistochemie und PCR wurde das Vorliegen von MKK4 in den Proben überprüft. Für unsere Folgearbeit wurden lediglich Tumorproben genutzt, die mit beiden Methoden deutlich MKK4 positiv waren.

Dabei handelt es sich um 22 Tumore aus diesem Kontingent, davon jeweils elf weibliche Patienten und elf männliche Patienten. Bei den Frauen waren fünf der Tumore im Rektum lokalisiert und sechs im Kolon, bei den Männern lagen sieben im Rektum vor.

Die anonymisierten Krankheitsdaten der Patienten für diese Studie wurden der prospektiven Tumordatenbank der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein entnommen. In dieser Datenbank wurden alle Daten der Kolonkarzinom Patienten anonymisiert und erfasst. Sämtliche Tumornachsorgewerte gehen ebenfalls in diese Datenbank mit ein. Dieses System erlaubt den schnellen und unkomplizierten Zugriff auf alle nötigen Daten.

Für die Durchführung dieser Studie liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Lübeck mit dem Aktenzeichen 06-039 vor.

II.2. Methodenfindung

Für das unten beschriebene Half Nested PCR Protokoll wurden zunächst mit dem Enzym Taq-Polymerase und Hela RT die Annealing Temperaturen der einzelnen Primer bestimmt.

Dabei traten in der Verwendung des MKK4 CL1 Primers in der Sense Richtung Anlagerungsprobleme auf. Es war nötig, vier verschiedene Primer namens MKK4 CL1 S, Sb, Sc und Sd zu testen, bis schließlich der Sense-d Primer das gewünschte Produkt erbrachte. Das Primerdesign wurde durch Dr. rer. nat. Duchow anhand der bekannten Gensequenz von MKK4 erstellt. Dabei begann er peripher im Genabschnitt mit der Suche nach einer zur sicheren Anlagerung geeigneten DNA-Sequenz. Die entsprechenden Primersequenzen wurden nach diesen Forderungen mit der Generierungssoftware Primer Express[®] (ABI PRISM, Foster City, USA) gefunden und von der Firma MWG BIOTECH (Ebersberg, Deutschland) hergestellt. Die so gewonnenen Primer wurden mit Konzentrationsangabe sowie Annealing Temperatur direkt dem Labor zugestellt. Die Grundlagen der Polymerase Kettenreaktion wurden der Arbeit von J. SantaLucia „Physical principles and visual-OMP software for optimal PCR design“ entnommen [39]. Es handelt sich bei der PCR um eine schnelle Methode zur Amplifikation bekannter Genomabschnitte. Dabei wird der vorhandene DNA-Doppelstrang durch Hitze in zwei Einzelstränge getrennt. Anschließend lagern sich die Primer jeweils am 5' und 3' Ende an, ein hitzestabiles Enzym verbindet im nächsten Schritt die freien Nukleotide anhand der Sequenz in Sense- bzw. Antisense-Richtung zu einem komplementären Strang, so dass erneut Doppelstrang-DNA vorliegt. Diese wird im Anschluß erneut denaturiert. [25;32]

Im nächsten Schritt wurde die Taq-Polymerase von INVITROGEN (Carlsbad, Californien, USA) durch die proof-reading PFU[®] DNA Polymerase der Firma PROMEGA (Madison, Wyoming, USA) ersetzt, um die Fehlerrate in der PCR möglichst gering zu halten und somit scheinbare Mutationen zu vermeiden. Es handelt sich hierbei um eine Polymerase, die neben der Bildung von Doppelstrang-DNA in der Lage ist, den erstellten Strang mit der vorliegenden DNA zu vergleichen und aufgetretene Fehler auszubessern.

Anhand von wiederholt auftretenden Doppelbanden in der Gelelektrophorese der PCR-Produkte zeigte sich, dass die zunächst verwendete einfache PCR nicht spezifisch genug war. Daraufhin entwickelten wir eine Half-Nested PCR, wobei zunächst die Primer MKK4 CL1 Sense-d und MKK4 CL2 Antisense eingesetzt wurden. Erst in der zweiten PCR wurden die ursprünglichen Primerpaare CL1 und CL2 eingesetzt. Es zeigte sich, dass es bei dieser Form der PCR eine Annealing Temperatur von 55°C allen Primern gerecht wurde. Dies führte zur Entwicklung des unten beschriebenen PCR Programms HN MKK4.

Für die Ligation und Topo-Klonierung wurde zunächst das pCR[®] TopoBlunt II Kloning Kit der Firma INVITROGEN (Carlsbad, USA) genutzt, dann erwies sich das Topo pCR[®] 4 Blunt Cloning Kit derselben Firma aufgrund eines höheren Ausschöpfungsgrades als für die Klonierung besser geeignet. Es handelt sich hierbei um Plasmidvektoren, die den E.coli Zellen die Fähigkeit verleihen, auf antibiotisch behandelten Agarböden zu wachsen. Somit wird eine Verunreinigung durch Fremdkeime vermieden.

Die Top 10 One-Shot Escheria coli Bakterien, ebenfalls INVITROGEN (Carlsbad, USA), wurden zunächst auf Ampicillinplatten geimpft, jedoch erbrachten Kanamycinplatten höhere Koloniezahlen, so dass wir im Folgenden mit Kanamycinplatten arbeiteten. Im Blunt-end pCR Produkt der Firma liegt eine Resistenz für beide Antibiotika vor. Die E.coli Zellen produzieren aufgrund ihrer raschen Vermehrung eine große Anzahl des gesuchten Enzyms, in diesem Fall MKK4.

Aus der Vielzahl der MiniPrep Verfahren haben sich insbesondere die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und die Plasmidisolierung an einer DNA-bindenden Matrix in Nukleobond-Säulchen bewährt. [6;5;1] Beide Methoden finden breite Anwendung in der Molekularbiologie. [2;53;28] Da in der Literatur bessere Ergebnisse der Nukleobondmethode für die Extraktion von DNA aus einer reinen Bakterienkultur beschrieben sind, entschieden wir uns für dieses Verfahren. [53]

Das Schema für die Sequenzierung erfolgte von Anfang an nach dem im nachfolgenden Text erläuterten Procedere nach Frederick Sanger.

Bei der Auswertung der Sequenzen ergaben sich zunächst unerwartet viele Mutationen. Die systematische Literaturrecherche ergab aber, dass es sich um Fälle von C-Kompression, bzw. G-Kompression handelte, ein Phänomen, bei dem anstelle zweier Banden für zwei C oder G nur eine, allerdings verbreiterte Bande, zu sehen ist. [3]

III.3. Methode

Bei den unter den Punkten 3.1 bis 3.3 beschriebenen Methoden handelt es sich um Vorarbeiten der Arbeitsgruppe um Lutz Mirow und Lasse Stannek. [29;30]

III.3.1 RNA Extraktion

Bei dieser Methode handelt es sich um eine DNA-Isolierung nach dem Prinzip der sauren Guanidin-Isothiozyant-Phenol-Chloroform-Extraktion.

Die während der Operation gewonnene Probe des kolorektalen Karzinoms wird zunächst bei -20°C bis zur Verarbeitung eingefroren und es wird ihr eine Probennummer anhand der Tumordatenbank zugeordnet.

Auf 100µg (entspricht $5 \cdot 10^6$ Zellen) gefrorene Tumorprobe wird 1ml Trizol der Firma GIBCO® BRL, Div. of INVITROGEN (Carlsbad, USA) gegeben. Dieser Schritt geschieht unter einer Abzugshaube, um sterile Bedingungen zu erreichen. Dann wird mit dem Vortex Genie® 2 der Firma SCIENTIFIC INDUSTRIES INC., Bohemia, NY, USA homogenisiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß werden 0,2ml Chloroform dazugegeben und für 15s vermischt, nochmals für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und danach die Mischung in ein Eppendorf Gefäß überführt. Es erfolgt die Zentrifugation für 15 Minuten bei 10.000g und 4°C. Danach zeigt sich eine Aufteilung in zwei Phasen: Eine obere, wässrige Phase mit RNA und eine untere rotgefärbte. Die wässrige Phase wird vorsichtig abpipettiert und in neue Cups gegeben. Dann wird nach Zugabe von 0,5ml Chloroform für 15 Sekunden geschüttelt und für 5 Minuten bei 12.000g und 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wird dreimal durchgeführt, danach erfolgt die Überführung von 0,5ml Überstand in neue Cups mit Zugabe von 0,5ml Isopropyl Alkohol, die Mischung wird für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird für 10 Minuten mit 12.000g bei 4°C zentrifugiert. Die RNA liegt danach am Boden vor, so dass der Überstand verworfen werden kann. Zum erneuten Lösen der RNA wird mit 1ml 75% Ethanol gewaschen, dabei ist darauf zu achten, dass das Ethanol kalt angesetzt wird. Die Lösung wird gevortext und über Nacht stehen gelassen. Als nächster Schritt wird für 5 Minuten mit 7500g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet angetrocknet, dabei ist es wichtig, dies nicht vollständig austrocknen zu

lassen. Dieser Schritt dauert etwa 10 Minuten. Das Lösen erfolgt mit 20µl autoklavikulierte Wasser. Es erfolgt ein Bad bei 55°C für 10 Minuten, danach werden die Proben sofort auf Eis gelagert. Im Anschluß erfolgt die Konzentrationsmessung im Photometer unter Verwendung des weiter unten beschriebenen Warburg-Christian-Programms. Hierzu werden 5µl Probe mit 95µl TE-Puffer auf 1:20 verdünnt, zur weiteren Verarbeitung sollte der Messwert oberhalb 20µg/µl liegen, dies entspricht einem Verhältnis von E_{260}/E_{280} von 1,8 als Ausdruck der Reinheit der Probe. Im Anschluss wurde die Probe bei -20°C eingefroren beziehungsweise direkt weiter verarbeitet.

III.3.2. RT-Ansatz

Es erfolgt der Einsatz von 1µl RNA-Probe pro Ansatz. Zur Probe werden 24µl autoklaviertes Wasser in Cups gegeben, beides vermischt und die Lösung bei 65°C für 5 Minuten im Wasserbad inkubiert. Durch die Erwärmung erfolgt die Auflösung der Faltstrukturen der RNA um eine Anlagerung der Transkriptionsprimer zu ermöglichen. Im Anschluß werden die Proben sofort auf Eis gelagert und der Inhalt eines Cups auf Ready-To-Go You-Prime-First-Strand-Beads® (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Uppsala, Schweden) gegeben. Dazu wird 1µl Primer Oligo(dt) gegeben, dieser wird bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Zudem werden 7µl Aqua dest. hinzugegeben und die Mischung für 1 Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen. Vermischt wird wiederum mittels des Vortex Genie® sowie einer kurzzeitigen Zentrifugation bis maximal 5.000g bis zur vollständigen Suspension der Beads. Der RT Ansatz wird dann für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit erfolgt die Bildung der komplementären cDNA. Mittels Gabe von 67µl Aqua dest. wird die Probe auf ein Gesamtvolumen von 100 µl gebracht. Die so gewonnenen Proben werden zum einen immunhistochemisch analysiert, zum anderen erfolgt eine PCR zur Expressionskontrolle. Dabei fungiert HeLa-S3-cDNA als Positivkontrolle und β2-Mikroglobulin als sogenanntes „house-keeping-gene“ zur Kontrolle von Verunreinigungen. So wird die Möglichkeit einer falsch negativen oder falsch

positiven Probe minimiert. Die MKK4 positiven RT-Ansätze werden für die folgenden Schritte weiterverwendet.

III.3.3. Half Nested PCR

Bei der Half Nested PCR handelt es sich um zwei konventionelle Polymerasekettenreaktionen in Folge, bei denen ein Primer der gleiche bleibt, der andere sich ändert. Das erste Primerpaar liegt dabei weiter peripher im Gen als das zweite.

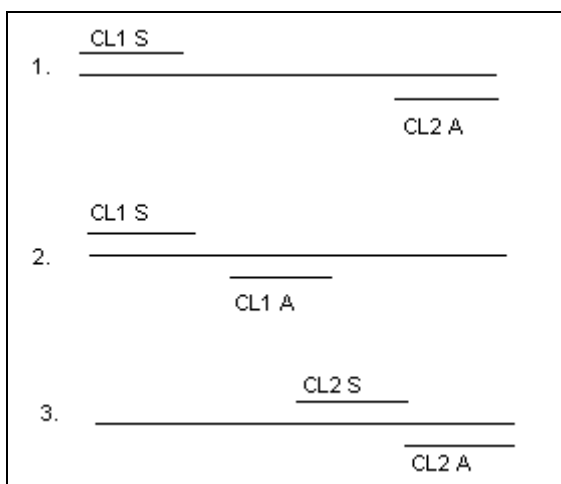


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Half Nested PCR. Im ersten Schritt erfolgt die Multiplikation des gesamten Gens, im zweiten und dritten jeweils die erneute Vervielfältigung der äußeren Anteile des Gens, dabei überlappen sich die inneren DNA-Bereiche.

Als ersten Schritt zur Sequenzierung werden die DNA-Proben durch Half Nested PCR vervielfältigt.

Da sich gezeigt hat, dass nicht jeder Tumor, welcher in der Voruntersuchung eine Expression von MKK4 aufwies, in der ersten PCR positiv ist, werden drei Läufe verwendet. Diese Durchläufe werden mit A-, B- und C-Lauf bezeichnet. Die Überprüfung der Half Nested PCR erfolgt durch die unten beschriebene Gelelektrophorese. Eine Tumorprobe, die bereits im ersten Durchlauf, also im

A-Lauf, ein Resultat zeigt, wird so zur weiteren Untersuchung genutzt. Bleibt der erste Durchlauf in der Gelelektrophorese negativ, so erfolgt ein zweiter Durchlauf der PCR mit erneuter Überprüfung des Ergebnisses. Bleibt dies negativ, wird versucht, die DNA der Probe im C-Lauf ein drittes Mal zu amplifizieren. Bleibt auch der dritte Durchlauf ohne ausreichende DNA-Menge, so wird diese Tumorprobe für die Untersuchung nicht genutzt, es sei denn, eine der PCRs ist aufgrund äußerer bekannter Umstände nicht gültig.

Um beide Seiten des MKK4 Gens überprüfen zu können, ist die Verwendung von zwei Primern nötig. Einmal MKK4 CL1 Sense-d und Antisense, welche ein Produkt von etwa 800bp ergeben und für den Abschnitt zwischen Basenpaar 161 und 891 amplifizieren, zum anderen MKK4 CL2 Sense und Antisense, deren Produkt 714 bp umfasst und von Basenpaar 731 bis 1424 reicht. Die ausführlichen Primersequenzen finden sich in Anhang 2. Durch die Überschneidung der Primerbereiche wird sichergestellt, dass auch der proximal liegende Genbereich überprüft werden kann. Eine Aussage über die peripher der Primersequenzen liegenden Genbereiche ist nicht möglich. Der Hersteller der Primer ist die Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland.

Die Primer werden der beiliegenden Produktbeschreibung entsprechend mit sterilem Wasser auf ein Lösungsvolumen von 1000pmol/µl verdünnt und danach auf eine Verdünnung von 1:20 gebracht, indem zu 38µl sterilem Wasser zwei µl des gewünschten Primers gegeben wird.

Für die erste PCR wird ein Mastermix angesetzt, der sich aus einem Vielfachen der nun folgenden Werte zusammensetzt. Pro Tumor werden 40µl Wasser, 5µl mitgelieferter PFU-Puffer und 0,5µl dNTP in ein 2ml Cup gegeben und durch Fingermischtechnik eine gleichmäßige Verteilung der Komponenten hergestellt. Zusätzlich kommen 1,25µl Primer MKK4 CL1d Sense und 1,25µl MKK4 CL2 Antisense pro Tumor in den Mastermix. Dann erst wird das Enzym PFU-Polymerase aus dem Tiefkühlschrank genommen, da es auf Wärmeeinwirkung sehr empfindlich reagiert, und pro Tumor 0,5µl hinzugefügt. Um das Enzym zu schützen, wird es umgehend wieder eingefroren.

Damit ergibt sich der folgende Mastermix (Tabelle 2).

	Einfach	Für 8 Proben	Für 12 Proben
Wasser	40µl	320µl	480µl
PFU-Puffer	5µl	40µl	60µl
dNTP	0,5µl	4µl	6µl
Primer	Je 1,25µl	Je 10µl	Je 15µl
PFU	0,5µl	4µl	6µl

Tabelle 2: Mastermix für die erste PCR der Half Nested Polymerasekettenreaktion.

Diesen Mastermix verteilt man auf die mit Tumornummer, PCR-Lauf und PCR-Art beschrifteten Cups, pro Cup werden 48,5µl Mastermix benötigt. An dieser Stelle im Protokoll muss die PCR - Maschine Primus 96^{Plus®}, (MWG BIOTECH, Ebersberg, Deutschland) eingeschaltet werden, damit sie ihren Deckelblock vorheizen kann. Danach hält das Programm die Hitze automatisch bis die weitere Fortführung manuell gefordert wird. Hierbei handelt es sich um einen sogenannten Hot Start. Das genaue PCR-Programm namens MKK4 HN wird weiter unten aufgeführt.

Den Cups wird noch die Probe zugefügt, für den A-Lauf handelt es sich dabei um 1,5µl, für den B- und C-Lauf um jeweils 3µl.

Die Cups werden in die PCR Maschine gestellt und das Programm manuell auf Fortführung gestellt. Nach Abschluss der Half Nested PCR hält das Programm vier Grad Celsius bis die Proben entnommen werden.

HN MKK4	1x	Heat Lid	4 Minuten	110°C
		Initial Denaturation	2 Minuten	95°C
		Hot Start	hält 95°C	bis Continue
	23x	Denaturierung	0m30	94°C
		Annealing	0m50	55°C
		Extension	4 Minuten	72°C
	1x	Final Extension	5 Minuten	72°C
	1x	Hold	endlos	4°C

Tabelle 3: Programm HN MKK4.

Die Proben werden entweder bei -20°C eingefroren oder direkt zur zweiten Hälfte der Half Nested PCR eingesetzt. In letzterem Fall wird wieder ein Mastermix benötigt. Dieser setzt sich erneut aus $40\mu\text{l}$ Wasser, $5\mu\text{l}$ Puffer und $0,5\mu\text{l}$ dNTP und $0,5\mu\text{l}$ PFU zusammen. Pro Tumor fand die zweite Hälfte der Half Nested PCR zweimal statt. Einmal mit $2,5\mu\text{l}$ MKK4 CL1 (Sd+A) pro Tumor, ein weiteres Mal mit der gleichen Menge MKK4 CL2 (S+A). Pro gefülltes Cup werden $1,5\mu\text{l}$ oder $3\mu\text{l}$ Probe aus der Half Nested PCR I genutzt. Die Menge richtet sich dabei nach der oben beschriebenen Durchlaufnummerierung, ab dem B-Lauf kommen $3\mu\text{l}$ Probe zum Einsatz. Nach Einsatz der Proben wird erneut das oben beschriebene Programm HN MKK4 durchgeführt.

III.3.4 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des Ergebnisses findet im Anschluss an die zweite PCR eine Gelelektrophorese statt.

Dazu versetzt man $0,5\text{g}$ Agarose-Pulver mit 50ml im Labor vorbereiteten $1\times$ TAE-Puffer. Dies wird in der Mikrowelle zweimal zum Aufkochen gebracht und danach unter Rühren auf dem Magnetrührer abgekühlt. Ist die Flüssigkeit nur noch handwarm, wird sie in ein 50ml Schraubgefäß umgefüllt und ihr $5\mu\text{l}$ Ethidiumbromid - Lösung der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der in den Proben vorhandenen DNA und fluoresziert bei Anwesenheit von Nukleinsäuren unter der UV-Lampe. Beides wird im geschlossenen Gefäß durch mehrmaliges Umdrehen vermischt und dann in die vorbereitete Horizontalelektrophorese - Kammer gegossen. Etwaige Luftblasen müssen entfernt werden. Je nach Tumoranzahl werden ein oder zwei Kämme mit Platz für je 12 Proben genutzt. Als Laufpuffer dient abermals TAE-Puffer.

Als Standard nimmt man $3\mu\text{l}$ Standard VI der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) und mischt diesen mit $1\mu\text{l}$ als Schwerelösung dienender laboreigener Farbe sowie mit $6\mu\text{l}$ sterilem Wasser. Diese Mischung wird in die

erste Tasche des Gels gegeben. In die weiteren Slots kommen je 1µl Farbe mit 9µl Tumorprobe. Das Gel muss bei 80mV und 250mA für eine halbe bis ganze Stunde laufen.

Nach Ablauf dieser Zeit wird das Gel unter dem UV-Schirm mit 302nm beleuchtet, mittels der Photodokumentationsanlage digital fotografiert und, wie in Abbildung 4 gezeigt, festgestellt, welche Proben Banden zeigen und in welcher Höhe. Nur Proben mit starken Banden in der richtigen Höhe, welche oberhalb der 653bp Bande des Standards liegt, und lediglich Proben ohne Doppelbanden oder Schlieren können weiterverarbeitet werden. Diese werden bis zur Topo Klonierung eingefroren, die anderen verworfen.

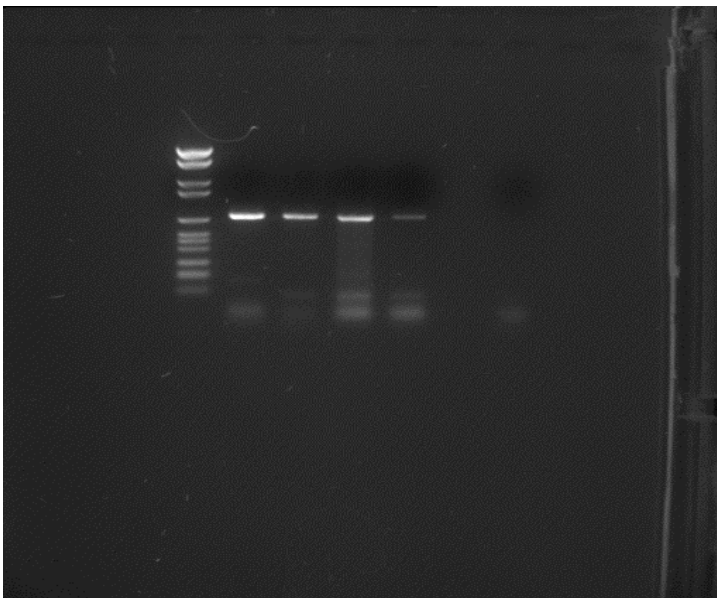


Abbildung 7: Gelelektrophorese.

Die Bande 1 zeigt dabei den Standard, die nächsten zwei Banden wurden auf Grund von Reinheit und Höhe des Ergebnisses verwendet, die Probe an vierter Stelle wurde auf Grund von Verunreinigung erneut durchgeführt, die nächste ebenfalls, da das Signal deutlich schwächer war als zu erwarten.

Danach wurde ein Platz im Gel freigelassen, um Verunreinigungen zu verhindern, die letzte Stelle zeigt die Negativprobe.

III.3.5. Ligation und Klonierung

Der erste Schritt der nun folgenden Topo Klonierung wird auch als Ligation bezeichnet. Das pCR[®]4Blunt Topo Kloning Kit der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) erlaubt die direkte Insertion von blunt-ended PCR Produkten in Plasmidvektoren.

Im Folgenden eine schematische Darstellung des Plasmids [Abbildung 8]. In der Gentechnik spielen Plasmide als Vektoren eine herausragende Rolle für die Klonierung und Expression von Genen.

Plasmide sind kleine, extrachromosomale, ringförmige und sich autonom vermehrende DNA Moleküle, die in vielen Bakterien vorkommen. Sie enthalten Gene, die Antibiotika - Resistenzen verleihen.

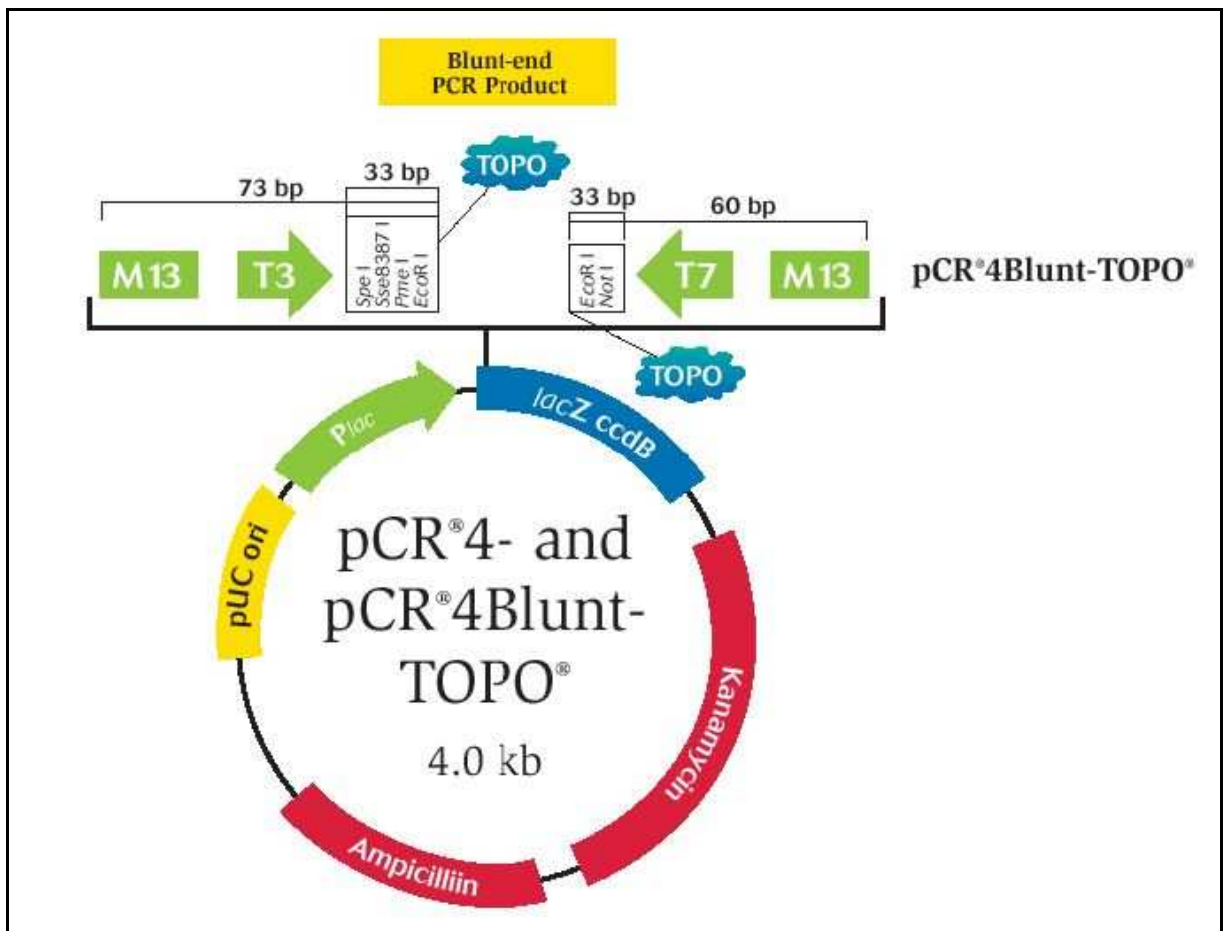


Abbildung 8: pCR[®]4 Blunt Vektor, Invitrogen (Carlsbad, USA)

Pro Tumor wird ein Ansatz im 1,5ml Cup hergestellt. Dieses wird mit der Tumornummer, dem PCR-Lauf und der Primer-Art beschriftet.

Alle benötigten Reagenzien sind im Cloning Kit[®] der Firma Invitrogen(Carlsbad, USA) enthalten.

Zunächst werden 2µl steriles Wasser pro Cup benötigt. Um eine vorzeitige Reaktion zu verhindern muss auf Eis pipettiert werden. Zum Wasser kommen 2µl PCR Produkt, welches vorher vermischt werden muss. Mit der Pipettenspitze werden Wasser und Produkt gut im Cup verrührt, 1µl gut vermischte Salt Solution zugefügt und wieder verrührt. Als letzten Schritt gibt man 1µl PCR4-Blunt Topo Vektor[®] hinzu und verrührt wieder. Die Ansätze müssen bei 22-23°C für 5 Minuten inkubieren. Im direkten Anschluss müssen sie auf Eis gelagert werden.

Pro Transformation wird während der Inkubation ein Gefäß Top10 One Shot[®] E.coli, im Cloning Kit[®], Invitrogen(Carlsbad, USA) enthalten, auf Eis aufgetaut. Diese werden normalerweise bei -80°C gelagert. Zudem muss pro Klon eine Kanamycin - Platte im Brutschrank bei 37°C aufgewärmt werden.

Die nun folgenden Schritte müssen alle unter der vorher gereinigten Sterilbank Class II TYPE A/B 3 der Firma NUAIRE (Plymouth, USA) stattfinden. Dieser Arbeitsplatz, im folgenden SterilBench genannt, verhindert durch kontinuierliche Absaugung eine Verunreinigung der Proben untereinander.

Sind die E.coli Zellen aufgetaut, werden je 2µl des vorbereiteten Ansatzes zu den E.coli Zellen pipettiert, die restlichen 3µl werden bei -20°C eingefroren. Mit der Pipettenspitze wird beides vorsichtig miteinander verrührt und die Zellen für eine halbe Stunde auf Eis gelagert. Anschließend werden die Cups für eine halbe Minute in den auf 42°C aufgewärmten Inkubator Thermomixer Compact[®], EPPENDORF (Hamburg, Deutschland) gestellt, nach diesem Hitzeschock müssen die Cups umgehend auf Eis abgekühlt werden.

Zu den transformierten E.coli Zellen pipettiert man 250µl SOC-Medium und inkubiert bei 37°C und 300rpm für eine Stunde im Thermomixer Compact[®]. Pro Ansatz werden 200µl auf einer Kanamycin Platte ausgestrichen. Hierzu wird der Ansatz mit einer 200µl-Pipette auf den Agar gegeben und dann mit einer gebogenen Pasteur-Glaspipette verstrichen.

Die beschrifteten Platten bleiben über Nacht im Brutschrank Kelvitron[®]t,

HERAEUS (Hanau, Deutschland) bei 37°C. Am nächsten Tag werden willkürlich drei Bakterienkolonien ausgewählt. Pro Klon wird eine halbe Kanamycin Platte für einen Drei-Ösen-Ausstrich benötigt. Dabei ist es wichtig darauf zu achten, dass der Agarboden nicht beschädigt wird, es darf also nicht zu viel Druck zum Ausstreichen verwendet werden. Die Einteilung der Platten ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Es wurde jeweils eine neue Öse pro Linie verwendet, die Ösen wurden über einem Bunsenbrenner sofort nach Nutzung gereinigt und nach dem Abkühlen erneut verwendet. Dieses Verfahren soll sicherstellen, dass wirklich nur ein einzelner Klon zur Weiterverarbeitung genutzt wird.

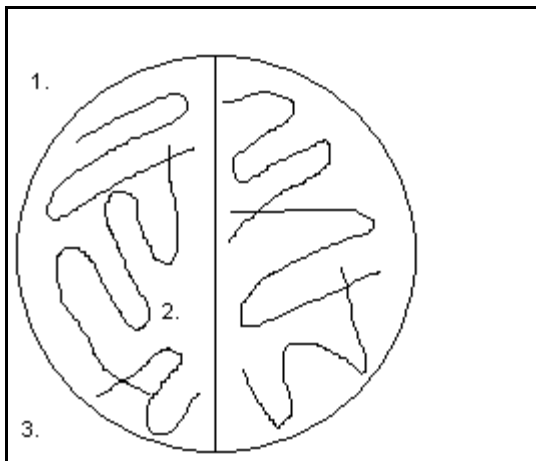


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines 3-Ösen-Ausstriches.

Der 3-Ösen-Ausstrich muss über Nacht bei 37°C inkubieren. Anschließend werden die Kanamycinplatten mit den Ausstrichen bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert.

III.3.6. MiniPrep

Die Isolierung geringer Mengen von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen ist für die Analyse rekombinanter Klone essentiell. Es existieren viele verschiedene Miniprep-Verfahren zur Isolierung. Aus der Vielzahl der Verfahren haben sich insbesondere die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und die Plasmidisolierung an einer DNA-bindenden Matrix in Nukleobond-Säulchen bewährt. [6;5;1] Beide Methoden finden breite Anwendung in der Molekularbiologie. Da in der Literatur bessere Ergebnisse der Nukleobondmethode für die Extraktion von DNA aus einer reinen Bakterienkultur beschrieben sind, entschieden wir uns für dieses Verfahren. [39;2 28] In diesem Verfahren wird der Überstand über kleine Säulen, die eine DNA-bindende Matrix enthalten, gegeben. Nach mehreren Waschschritten wird die Plasmid-DNA eluiert, gefällt und im Agarosegel analysiert. [1]

Es ist folgende Vorbereitung notwendig:

Am Abend müssen einzelne Zellkolonien in LB-Medium angesetzt werden. Dies erfolgt unter der SterilBench. Pro Klon sind 4ml LB Medium und 9µl Kanamycin, SIGMA (Steinheim, Deutschland) notwendig, beides kommt in ein 15ml Greiner Röhrchen. Anschließend wird eine Einzelkolonie pro Ausstrich gewählt und diese mittels einer Öse zu dem Medium gegeben. Dieses muss im Wärmebad bei 37°C für 12 bis maximal 16 Stunden inkubieren. Die Ansätze werden dabei in den Röhrchen geschüttelt und die Deckel der Röhrchen nur locker verschlossen, um den Bakterien Zugang zu Sauerstoff zu ermöglichen.

Unter Nutzung des NukleoSpin[®] Plasmid Kit der Firma MACHERY NAGEL (Düren, Deutschland) erfolgen die weiteren Schritte. Die in diesem Kit enthaltenen Säulen binden die Plasmid DNA an eine Silicia Membran und trennen sie somit von der restlichen Bakteriensuspension.

Nach der Inkubation wird die Reaktion durch Zentrifugieren mit 10.000 rpm für 10 Minuten bei 4°C gestoppt. Zunächst muss der Über stand vom Zentrifugieren abgossen werden und das Pellet mit 250µl Puffer 1 des Kits resuspendiert werden, dieser muss bis zur Nutzung im Kühlschrank stehen. Dabei wird die

Lösung in 2ml Reaktionsgefäße überführt. Nun gibt man 300µl Puffer 2 hinzu, um das Eiweiß zu lysieren und die Bakterienzellwände anzudauen. Die Lösung muss durch sechs- bis achtmaliges Umdrehen gemischt werden und die Proben müssen für 5 Minuten inkubieren. In dieser Zeit muss Puffer 3 auf Eis gekühlt werden. Dann kommt 300µl Puffer 3 hinzu, um das Eiweiß auszufällen. Wieder werden die Cups mehrfach umgedreht und dann für zehn Minuten bei 17.000rpm zentrifugiert. Die mitgelieferten Cups aus dem Kit werden beschriftet und in jedes eine NukleoSpin[®] Plasmid Säule gesetzt. Auf diese kommt der Überstand vom Zentrifugieren und die Flüssigkeit auf der Säule wird für eine Minute bei 17.000rpm erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und auf die Säule wird 600µl Puffer 4 zum Waschen gegeben. Erneut wird für eine Minute bei 17.000rpm zentrifugiert. Wieder muss der Durchfluss verworfen werden und die leere Säule erneut zentrifugiert werden, um die letzten Rückstände zu entfernen. Danach wird die Säule auf ein steriles 2ml Cup gesetzt und vorsichtig 50µl AE-Lösung darauf gegeben. Ein weiteres Mal wird der Ansatz bei 17.000rpm für eine Minute zentrifugiert, die Säule entfernt und der Durchfluss bis zum Messen in den Kühlschrank gestellt.

Die Bestimmung der relativen Nukleotidkonzentration in den Fraktionen der Säulenchromatographien erfolgt bei 260, 280 und 320 nm in einer Quarzküvette (d = 1 cm) an einem UV-Spectrophotometer (FRÖBEL, Wasserburg am Bodensee, Deutschland). Eine Quarzküvette mit Wasser dient als Referenz. In der Auswerteeinheit (MWB-BIOTECH, Ebersberg, Deutschland) ist ein Programm enthalten, welches die Konzentration nach der Formel von Warburg und Christian errechnet. [23;50]

Dieses Programm errechnet nach den Formeln

$$\text{abs ratio} = [\text{abs}(260,0)\text{nm} - \text{abs}(320,0)\text{nm}] / [\text{abs}(280,0)\text{nm} - \text{abs}(320,0)\text{nm}]$$

und

$$\text{Nucleic Acid} = \text{abs}(260,0)\text{nm} * 62.900 + \text{abs}(280)\text{m} * (-36.000)$$

die Menge der vorhandenen Nukleinsäure sowie deren Reinheitsgrad.

Zur weiteren Verwendung sollte der Wert des Reinheitsgrads bei 1,8 liegen, da es ansonsten zu Artefakten in der folgenden DNA-Kontrolle sowie der Sequenzierung kommen kann.

Die Mengenangabe der enthaltenen Nukleinsäure benötigt man zur

Berechnung der für die PCR benötigten Probenmenge. Der Mengenwert sollte $0,09\mu\text{g}/\mu\text{l}$ nicht unterschreiten, hierbei handelt es sich um das minimal einzusetzende Volumen, beim dem eine DNA Konzentration von $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA in dem Reaktionsansatz der Sequenzierung vorliegt.

Ausgehend von der gemessenen DNA-Menge wird das Volumen mit einer Zahl zwischen 1 und 11,5 multipliziert, um die DNA Konzentration von $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ annähernd zu erreichen. Einsetzbar sind daher MiniPrep Proben, deren Extinktionswert über $0,09\mu\text{g}/\mu\text{l}$ liegt. Steriles Wasser und Probe sollen gemeinsam ein Volumen von $11,5\mu\text{l}$ ergeben. Dann kann der beschriftete Ansatz bei -20°C bis zur Weiterverwendung eingefroren werden.

III.3.7. DNA-Kontrolle

Zur Kontrolle der DNA wird eine weitere Gelelektrophorese nötig. Dazu wird wie unter 3.2 ein 1%iges Agarosegel angefertigt.

Als Standard dient diesmal ein Leerplasmid.

Von den Proben werden $9\mu\text{l}$ eingesetzt. Dazu kommt $1\mu\text{l}$ einer Mischung von $2\mu\text{l}$ Enzym *ecoRI* plus $10\mu\text{l}$ auf 1:20 verdünntem 10x Puffer. Diese $10\mu\text{l}$ *EcoRI*-Proben werden dann ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert und danach auf das Gel aufgetragen. Das Gel läuft bei 80V und 250mA für eine halbe Stunde und wird dann unter UV-Licht ausgewertet. Die Vektoren sind nach der Transformation länger als das Leerplasmid und sollten daher eine kürzere Laufstrecke haben.

III.3.8. Sequenzierung

DNA - Sequenzierung ist die Bestimmung der Abfolge der Nukleotide in einem bestimmten DNA-Molekül. Die Möglichkeit der DNA - Sequenzierung hat die biologischen Wissenschaften revolutioniert, sie ist die Grundlage der Genomforschung. Die Didesoxymethode nach Sanger wird auch Kettenabbruchsequenzierung genannt und stellt eine enzymatische Methode dar. [27;37] Sie wurde um 1975 entwickelt. Sanger erhielt für seine Arbeiten zur DNA - Sequenzierung zusammen mit Gilbert 1980 den Nobelpreis für Chemie. Ausgehend von einem kurzen Abschnitt bekannter Sequenz, der so genannte Primer, wird durch das Enzym DNA - Polymerase einer der beiden komplementären DNA-Stränge verlängert. Zunächst wird die DNA - Doppelhelix durch Erwärmung denaturiert, woraufhin Einzelstränge für das weitere Vorgehen zur Verfügung stehen. In vier sonst gleichen Ansätzen (alle beinhalten die vier Nukleotide Adenosin, Cytosin, Guanin und Thymin) wird je eine der vier Basen zum Teil als Didesoxynukleosidtriphosphat (ddNTP) zugegeben. Diese Kettenabbruch - ddNTPs besitzen keine 3'-Hydroxygruppe, werden sie in den neusynthetisierten Strang eingebaut, ist eine Verlängerung der DNA durch die DNA - Polymerase nicht mehr möglich, da die OH-Gruppe am 3'-C-Atom für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids fehlt. Als Folge entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die in jedem Ansatz stets mit dem gleichen ddNTP enden. Es ist möglich, entweder den Primer oder die ddNTPs zu markieren. Nach der Sequenzier - Reaktion werden die markierten Abbruchprodukte aus jedem Ansatz mittels Polyacrylamid - Gelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt. Durch Vergleich der vier Ansätze kann man die Sequenz nach der Entwicklung des Gels auf einem fotografischen Film ablesen. Die dementsprechend komplementäre Sequenz ist die Sequenz der verwendeten einsträngigen DNA-Matrize. Als Sequenzier - Reaktion kommt heutzutage eine Variation der Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Einsatz. [39] Anders als bei der PCR wird nur ein Primer eingesetzt, so dass die DNA nur linear amplifiziert wird. [38;8] Die Sequenzierung der Tumorproben erfolgt nach der Kettenabbruch Methode von Frederick Sanger unter Verwendung Fluoreszenz - markierter Nukleotide.

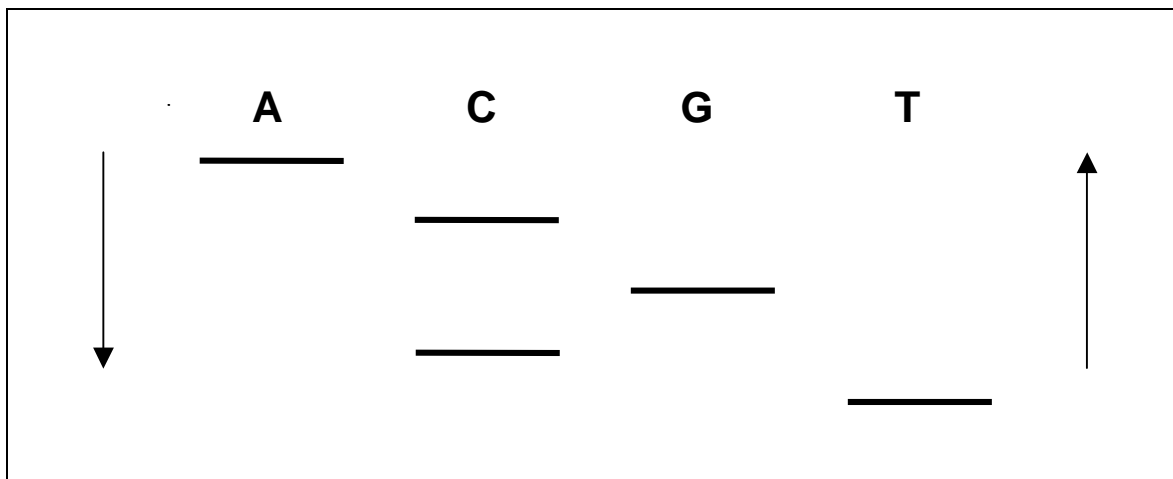


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer Sequenzierung.

Der linke Pfeil stellt in diesem Schema die Laufrichtung der Gelelektrophorese dar, der rechte Pfeil entspricht der Leserichtung der Sequenz, da der kürzeste Abschnitt am Anfang steht. Es handelt sich hier also um die Sequenz TCGCA

Die notwendigen Bestandteile für die PCR finden sich alle im DNA Sequenzierungskit[®] der AMERSHAM PHARMACIA, Uppsala, SW. Die eingefrorenen Proben aus der MiniPrep müssen vor der Weiterwendung auftauen. In dieser Zeit wird das einzusetzende Volumen so berechnet, das eine DNA Konzentration von 1µg/µl DNA in dem Reaktionsansatz vorliegt.

Ausgehend von der gemessenen DNA-Menge wird die Probenmenge so berechnet, dass eine DNA Konzentration von 1µg/µl annähernd erreicht ist. Einsetzbar sind nur MiniPrep Proben, deren Extinktionswert über 0,09µg/µl liegt. Steriles Wasser und Probe sollen gemeinsam ein Volumen von 11,5µl ergeben. Das resultierende Pipettierschema ist in Tabelle drei ersichtlich.

Steriles Wasser wie berechnet
0,5µl DMSO
1,2µl Primer
Probe wie ausgerechnet
=> 13,2µl gesamtes Volumen

Tabelle 3: Pipettierschema für die Sequenzierung

Je nachdem in welche Richtung die Sequenz gelesen werden soll, wird entweder der Primer M13universal(-21) oder der Primer M13reverse(-29) benutzt. Jede Tumorprobe wird in 3 Klonen in beiden Richtungen beurteilt, um Zufallsmutationen der E.coli Bakterien oder Lesefehler minimieren zu können. Waren die ersten beiden Klone in beiden Richtungen von guter Qualität und mutationsfrei, wurde auf die Sequenzierung des dritten Klons verzichtet.

Die Substanzen werden in einem 0,5ml Cup gut gemischt.

In die Cups einer 46-Lochplatte werden Fluoreszens-markierte Basen vorgelegt, das heißt, es wird von Adenosin, Cytosin, Guanin und Thymin jeweils 1µl mit der elektrischen Pipette auf die Böden der Cups gegeben. Dann kommen in vier benachbarte Cups jeweils 2,8µl des Reaktionsansatzes. Um zu verhindern, dass diese geringen Probenmengen in der PCR verdampfen, werden sie mit 20µl Chill-Out Liquid Wax[®], BIOZYM SCIENTIFIC (Hessisch Oldendorf, Deutschland) überschichtet.

Die PCR der Sequenzierung erfolgt in der PCR Maschine Primus 96 plus[®] der Firma MWG-BIOTECH (Ebersberg, Deutschland) mit dem Programm Cycle T1 (Tabelle 4).

1x	Heat Lid	110°C	
1x	95°C		1,45 Minuten
12x	95°C		0,15 Minuten
	55°C		0,15 Minuten
	70°C		0,15 Minuten
13x	95°C		0,2 Minuten
	55°C		0,2 Minuten
	70°C		0,2 Minuten
1x	95°C		0,4 Minuten

Tabelle 4: Ablauf des Sequenzierungsprogramm Cycle T1

Nach Ablauf der PCR werden die Proben mit jeweils 3µl Stop-Solution aus laboreigener Herstellung versetzt und bis zur Auswertung auf Eis gelagert.

Die PCR Produkte werden durch Polyacrylamidgelelektrophorese, kurz PAGE, getrennt. [22] Es wird hierzu eine 6% Rapid Gel XL der Länge 41cm und Dicke 0,25mm verwendet. Auf einem Gel können 64 Bahnen sequenziert werden, also 16 Klone gleichzeitig. Im folgenden das Pipettierschema für ein PAGE Gel:

7,5ml	RapidGel XL [®] Sol 40%
21g	Urea
5ml	10x TBE Long Run
28ml	Bidestilliertes Wasser
500µl	DMSO
50µl	TEMED
350µl	10% APS, frisch zubereitet

Tabelle 5: Zusammensetzung Rapid Gel XL für die PAGE

Diese Reagenzien müssen unter Verwendung des Magnetrührers vermischt werden, damit die Konsistenz möglichst gleichmäßig ist. Danach werden sie in eine 50ml Spritze aufgezogen, ein 0,45µm Filter davor gesetzt um grobe Ureakristalle zu entfernen und die Flüssigkeit zwischen zwei Glasplatten gespritzt. Der Geldicke entsprechend muss der Abstand zwischen den Platten 0,25mm betragen und ein Kamm für die Füllkammern wird nach Herstellerangaben eingespannt. Es ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen die Glasplatten geraten, da diese zu Unleserlichkeit des Abschnittes führen würden. Das Gel muss für zwei bis drei Stunden auspolymerisieren, dann kann es in den Sequenzer eingesetzt werden. Als Laufpuffer wird einfach konzentrierter TBE Puffer genutzt. Der Laser des Gerätes wird kalibriert, das RapidGel XL benötigt 45 Minuten Vorlauf, währenddessen mögliche Verunreinigungen entfernt werden. Nach Ablauf dieser Zeit können die Proben in der Basenreihenfolge A-C-G-T in die Füllkammern gegeben werden. Die Sequenzierung erfolgt bei 1500V, 35mA, 40W und einer Temperatur von 45°C.

Die Laufzeit eines Gels beträgt 12 Stunden.

Die Auswertung des Gels erfolgt mit Hilfe des Auswertungsprogramms der Firma LI-COR (Lincoln, Nebraska, USA). Dies ist in der Lage, die Banden automatisch zu analysieren und die DNA-Sequenz zu ermitteln. Die Lanedefinition, also die Laufbahn der jeweiligen Nukleotide, muss unter Umständen manuell erfolgen. Nach Beendigung der Sequenzierung wird die ermittelte Sequenz durch das Programm SeqTool 8.2 von S.W. Rasmussen mit der MKK4 Sequenz verglichen und Basenveränderungen, Basenverlust oder – addition sowie nicht erkannte Basen markiert.

Mit dem BaselmagelR[®] von LI-COR ist es möglich, die Sequenz als Kurve oder als Photo des Polyacrylamidgels anzusehen.

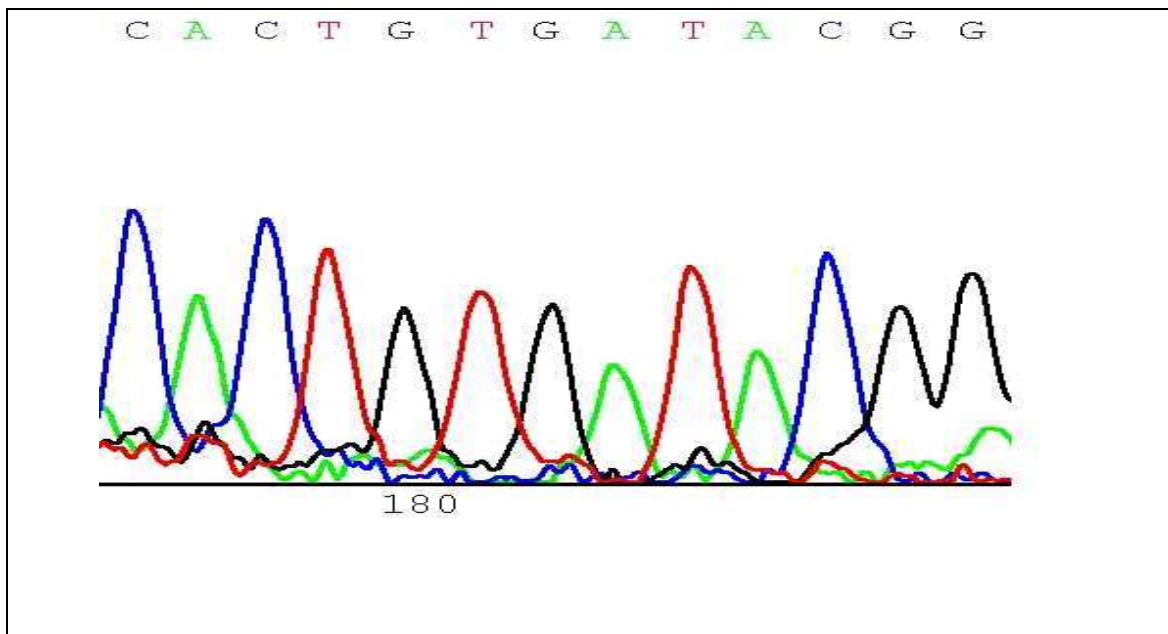


Abbildung 11: Darstellung eines Sequenzierungsergebnisses in Kurvenform durch BaselmagelR[®]. Jede Farbe vertritt dabei eine andere Base.

Die Abweichungen von der MKK4 Sequenz können somit überprüft und ausgebessert werden. Es ist notwendig, markierte Bereiche der Sequenz oder mögliche Mutationen am Rechner Korrektur zu lesen, um nicht falsch positive Daten zu erhalten. [56]

III.3.9. MaxiPrep

Sind DNA-Kontrolle und/oder Sequenzierung negativ oder unzufriedenstellend ausgefallen, wird zur Verbesserung des DNA Ertrages eine MaxiPrep erforderlich. Die nachfolgende Maxipräparation zur Isolierung von Plasmid - DNA wurde mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (100)[®], Hilden, Deutschland vorgenommen. Sie soll dazu dienen, Plasmid - DNA in größerer Menge und hoher Qualität zu gewinnen, welches für eine effiziente Transfektion notwendig ist. Es handelt sich bei der MaxiPrep um eine modifizierte alkalische Lyseprozedur, in derem Anschluß Plasmid - DNA an die Anionenaustauscher-Harze in den enthaltenen Säulen gebunden wird. [56] RNA, Proteine, Farbstoffe und weitere Moleküle werden durch Waschungen entfernt und die gewonnene DNA durch einen Hochsalzpuffer eluiert. Das MaxiPrep Kit ist für die Gewinnung von bis 500µg high- or low - copy Plasmiden geeignet, im Gegensatz zur MiniPrep, die für die Bereitung von bis zu 100µg angewendet wird.

Zur Vorbereitung wird eine Vorkultur hergestellt, indem eine Bakterienkultur nach 3.6 in 10ml LB Medium mit Kanamycin gegeben wird und im Wärmebad bei 37°C für 5 bis 6 Stunden unter Schütteln inkubiert.

In je 5ml dieser Vorkultur werden dann jeweils 100ml LB Medium mit Kanamycin gegeben und als Hauptkultur beimpft. Im Wärmebad muss der Ansatz bei 37°C unter starkem Schütteln für 14 bis maximal 16 Stunden inkubieren. Nach Ablauf der Zeit werden der Kultur 1,7ml entnommen, mit 300µl sterilem Glycerin versetzt und diese Mischung als Stammkultur bei -80°C eingefroren. Der übrige Teil der Hauptkultur wird auf vier 50ml Greiner Reaktionsgefäße aufgeteilt und 15 Minuten lang bei 4000rpm zentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen und das Sediment mit je 2,5ml P1-Puffer resuspendiert. Die vier Suspensionen werden dann wieder zusammengeführt und mit 10ml P2-Puffer versetzt. Die Gefäße werden zum Vermischen sechsmal gewendet und der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun werden 10ml auf 4°C gekühlter P3-Puffer hinzugefügt, abermals sechsmal gewendet und die Suspension für 20 Minuten auf Eis gelagert.

Danach muss die Mischung für 45 Minuten bei 4°C mit 4.000rpm zentrifugiert werden. In dieser Zeit werden die DNA Säulen des Kits mit 10ml QBT - Puffer equilibriert.

Der Überstand der Zentrifugation wird auf die Säule gegeben und zweimal mit 30ml QC - Puffer gewaschen. Dann wird die Säule auf ein 5ml Greiner Reaktionsgefäß gesetzt und die Plasmid - DNA mit 15ml QF-Puffer eluiert. Bei Raumtemperatur wird die DNA durch sofortige Zugabe von 10,5ml 2% - Propanol ausgefällt. Erneut wird die Mischung für 45 Minuten mit 4.000rpm zentrifugiert und im Anschluss der Überstand verworfen. Das Sediment wird mit 5ml 70%igem Ethanol gewaschen.

Bei 4.000rpm wird es dann für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert und die Greiner Reaktionsgefäße für fünf Minuten über Kopf gelagert, damit das Sediment vollständig trocknen kann.

Dann wird die DNA in 100µl TE-Puffer gelöst und muss über Nacht im Kühlschrank inkubieren. Im Anschluss wird der Ansatz in 2ml Reaktionsgefäße überführt.

Die Probe wird 1:100 verdünnt und die DNA - Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm gemessen. Es sollte eine DNA - Konzentration von über 3µl/µl erreicht werden. Die Reinheit der DNA wird über das Verhältnis Extinktion bei 260nm zu 280nm errechnet, dies sollte etwa 1,8 betragen.

Wie nach der MiniPrep wird die DNA durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Dann werden die Proben bis zum Einsatz zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

III. Darstellung der Ergebnisse

III.1. Patientenkollektiv

Bei den ausgewerteten Proben handelt es sich um 22 MKK4 - positive Tumore aus einem Kontingent von 99 Proben kolorektaler Karzinome.

Es handelt sich jeweils um elf weibliche Patienten und elf männliche Patienten. In der Gesamtdarstellung liegt eine ausgeglichene Geschlechter- und Lokalisationsverteilung der auswertbaren Tumore vor.

Frauen: 11	davon Colon 6	davon Rektum 5
Männer: 11	4	7

Tabelle 6: Darstellung der Geschlechter und Lokalisationsverteilung der untersuchten Proben.

Bei den Frauen waren fünf der Tumore im Rektum lokalisiert und sechs im Kolon, bei den Männern lagen sieben im Rektum vor. Die anonymisierten Krankheitsdaten der Patienten für diese Studie wurden der prospektiven Tumordatenbank der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein entnommen.

III.2. Nachgewiesene Mutationen

Es stellte sich in nur einem Fall der 22 untersuchten Tumorgewebeproben eine Mutation in zwei der drei durchgeführten Sequenzierungen in beide Richtungen der Half Nested PCR (sense und antisense) sowie der eigentlichen Sequenzierung (universal und reverse) dar. Es handelt sich dabei um Tumor Nummer 3. Im ersten Klon des Tumors zeigte sich zudem im sense-Durchlauf eine Mutation ebenfalls an Locus 444, die sich aber in der antisense-Kontrolle nicht wieder darstellen ließ. Wir gehen daher im Falle dieses Tumors von einer Mutation aus, bei der Adenosin gegen Guanin ausgetauscht wurde.

C/G- Kompressionen traten nur im von CL2 dargestellten Abschnitt von MKK4 auf, dabei handelt es sich um den Genabschnitt von Basenpaar 731 bis 1424.

Die Ergebnisse für die einzelnen Tumorproben nach Durchführung der oben dargestellten Versuchsanordnung werden in folgender Tabelle zusammengefasst (Tabelle 7):

Tu.Nr.	CL 1 Klon 1	CL1 Klon 2	CL 1 Klon 3	CL 2 Klon 1	CL2 Klon 2	CL2 Klon 3	Geb.datum
1	nein	nein	nein	nein	nein	nein	31.05.1925
2	nein	nein	nein	nein	nein	/	27.09.1940
3	nein	ja, 444	ja, 444	nein	nein	*in u	01.12.1934
4	nein	nein	nein	nein	nein	nein	19.06.1938
5	nein	nein	/	nein	* in r	158 1E u	26.03.1938
6	nein	nein	/	nein *beide	nein	nein, *in u	08.10.1935
7	nein	nein	nein	in u 1209	nein	nein	16.04.1938
8	nein	nein	nein	nein, * beide	nein, *beide	nein, *in u	09.05.1944
9	nein	nein	/	nein, * beide	nein	nein	10.03.1920
10	nein	nein	nein	nein	nein	/	29.08.1936
11	nein	nein	nein	nein	nein	nein	25.04.1934
12	nein	nein	nein	nein, * beide	nein	/	09.02.1931
13	nein	nein	nein	nein, * beide	nein, *in u	nein	21.06.1931
14	nein	nein	nein	nein, *in r	nein, *beide	nein, *beide	21.12.1910
15	nein	nein	nein	nein	nein	nein, *in u	20.08.1931
16	nein	nein	/	nein	nein	/	16.04.1913
17	nein	nein	nein	nein	nein	/	12.02.1914
18	nein	nein	nein	nein	nein	nein, *beide	17.07.1941
19	nein	nein	nein	nein, *in u	nein, *beide	/	24.07.1932
20	nein	nein	/	nein	nein	nein	15.06.1925
21	nein	nein	/	nein, *beide	nein, *in u	/	02.11.1930
22	nein	nein	nein	nein, *beide	nein, *beide	nein, *in r	26.10.1927

Tabelle 7: Mutation in Tumornummer 3, Abschnitt CL1 444, sense und antisense.

Tu.Nr.: Tumornummer

* : C/G Kompression, scheinbare Veränderung der cDNA ohne tatsächliche Mutation.[26]

Richtung der Sequenzierung, u = universal, r = reverse

/ : Kein dritter Klon sequenziert, da Ergebnis eindeutig negativ.

Geb.datum: Geburtsdatum des jeweiligen Patienten

Da lediglich eine Probe der 22 untersuchten Tumorgewebe eine Mutation zeigte, liegt die Mutationsrate bei 4,54 Prozent. Es handelt sich um den Genlocus 444, der sich im Primerbereich MKK4 CL1 befindet. Es handelt sich um eine Mutation, bei der die Purinbase Adenin durch Guanin ersetzt wurde.

III.3. Auswertung der Daten

Zur weiteren Analyse der Daten erhoben wir folgende Tabellen unter Zuhilfenahme der prospektiven Datenbank bezüglich kolorektaler Karzinome der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein.

In Tabelle 8 wird aufgeführt, welcher Tumorprobe welche klinischen Parameter zuzuordnen sind. So kann den Tabellen neben Alter und Geschlecht auch die Überlebenszeit des jeweiligen Patienten sowie die postoperative Progression des Tumors entnommen werden.

Nummer	Mutation	Sex	p tum	p op	p T	p N	p M	Status	ülz	prog
1	0	2	2	2	3	2	1	1	3	0
2	0	1	2	2	4	2	1	1	1	0
3	444	1	2	1	2	0	0	0	112	0
4	0	2	1	1	3	1	0	0	121	0
5	0	2	1	1	3	1	0	0	115	0
6	0	1	2	1	3	1	0	0	91	0
7	0	1	1	2	4	2	1	1	6	0
8	0	1	1	2	3	2	1	1	7	0
9	0	1	2	2	3	2	0	1	12	0
10	0	2	1	2	4	1	1	1	10	0
11	0	1	1	1	4	0	0	0	71	0
12	0	2	1	1	2	0	0	0	85	0
13	0	1	2	1	3	1	0	1	6	0
14	0	2	2	2	4	1	1	1	1	0
15	0	2	1	1	3	1	0	0	68	0
16	0	2	1	1	3	1	0	0	73	0
17	0	2	2	1	3	0	0	1	53	0
18	0	1	2	2	2	1	1	1	4	0
19	0	1	2	1	4	0	0	1	38	1
20	0	1	2	1	3	0	0	0	58	0

21	0	2	2	1	3	1	0	0	55	0
22	0	2	2	1	3	0	0	0	50	0

Tabelle 8: Darstellung der klinischen Daten der analysierten Patienten.

Legende: Nummer: Tumorprobennummer, konsistent mit Tabelle 7

Mutation: Keine Mutation entspricht 0, sonst Angabe des Genlokus

Sex: 1 = männlich, 2 = weiblich

p tum: Lokalisation des Primärtumors, 1 = Colon, 2 = Rektum

p op: Wertigkeit der Operation des Primärtumors, 1 = kurativ, 2 = palliativ

p TNM: Postoperative Angaben zur Klassifikation nach TNM System [13]

Status des Patienten zum Ende der Studie: 0 = lebt, 1 = verstorben

ülz: Postoperative Überlebenszeit des Patienten in Monaten

prog: Tumorprogression nach kurativer Operation, 0 = nein, 1 = Rezidiv

In der Auswertung der Mutationsanalyse sowie der prospektiv erhobenen Patientendaten zum Endpunkt der Studie am 01.07.2006 ergab sich eine mittlere Überlebensrate aller eingeschlossenen Patienten von 47 Monaten, dies entspricht knapp vier Jahren. Die mediane Überlebenszeit betrug dabei 53 Monate. Werden die Patienten, die innerhalb der ersten vier Monate verstarben, ausgeschlossen, ergibt sich ein mittleres Überlebensalter von 57 Monaten, oder 4 $\frac{3}{4}$ Jahren. Der Ausschluss dieser Patienten wird durch den Aspekt postoperativer Komplikationen legitimiert. Bei der Altersverteilung der Patienten ergab sich ein mittleres Alter von 75 Jahren und drei Monaten zum Stichtag 01.07. 2006 (Tabelle 9).

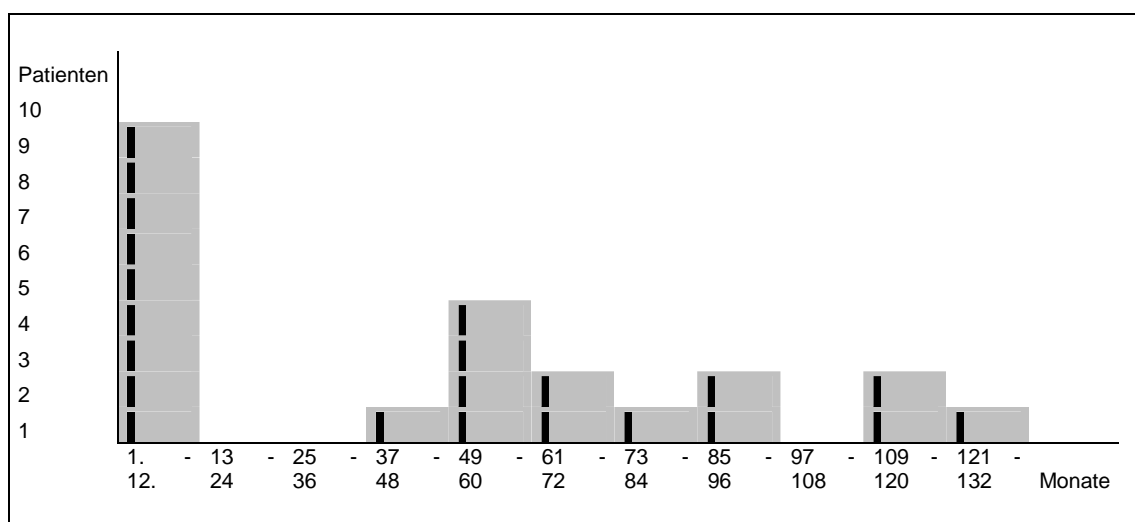


Tabelle 9: Statistische Darstellung der postoperativen Überlebenszeit zum 01.07.2006

Der Patient, bei dem sich die Mutation CL 1 444 fand, ist im letzten Drittel der Tabelle 9 anzusiedeln, er ist einer von drei Patienten, die zum Endpunkt der Studie über 110 Monate nach Operation überlebten. Es handelt sich um einen Mann, der kurativ operiert wurde und auch 112 Monate nach der OP noch rezidivfrei lebt. In Tabelle 8 wird er mit Nummer 3 bezeichnet. Zum 01.07.2006 war er 71 Jahre alt, bei Ersterfassung in der Tumordatenbank betrug sein Lebensalter 61 Jahre.

Unter Zusammenschau der beiden letzten Tabellen fällt auf, dass das Tumorstadium des Patienten Nummer 3 zu Beginn der Studie sowohl in Bezug auf Tumorausdehnung als auch auf lokale Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu den zwei anderen Patienten mit langer Überlebensdauer (Patientennummer 4 und 5) besser war. Es handelte sich um das Tumorstadium T2N0M0 im Vergleich zu T3N1M0. Die Lokalisation des Tumors im Rektum beinhaltet jedoch aufgrund der drei verschiedenen möglichen Metastasierungswege dieser Lokalisation eine theoretische grundsätzlich schlechtere Prognose. Nach UICC lässt sich das Tumorstadium des Patienten mit UICC 1 bezeichnen, die 5-Jahresüberlebensrate beträgt in diesem Stadium 80%.

Bei diesen drei Patienten mit einer Überlebenszeit oberhalb von 110 Monaten handelte es sich um Operationen unter primär kurativen Ansätzen. Alle drei Patienten lebten zum Endpunkt der Studie am 01.07.2006 noch.

Insgesamt wurden vierzehn der 22 Operationen unter kurativen Gesichtspunkten durchgeführt, es verstarben bisher drei der Patienten aus diesem Kollektiv.

Lediglich ein Patient der 22 erlitt ein Rezidiv und verstarb nach 38 Monaten. Obwohl auch bei ihm eine Operation unter primär kurativem Aspekt durchgeführt worden war, hatte er bereits bei Durchführung der Operation das Tumorstadium T4, also mit peritonealer Infiltration, jedoch ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasierung.

Die weiteren neun der zehn verstorbenen Patienten verstarben bereits innerhalb des ersten Jahres des Follow-up, bis auf zwei dieser Patientengruppe waren alle unter palliativen Gesichtspunkten operiert worden. Die beiden kurativ operierten Patienten verstarben nach 6 beziehungsweise 53 Monaten.

Unter Bezug auf den 01.07.2006 als zeitlichen Endpunkt der Studie und den unterschiedlichen Zeitpunkt des Studienbeginns ergibt sich folgende Kaplan-Meier-Kurve der Überlebensrate (Abbildung 12):

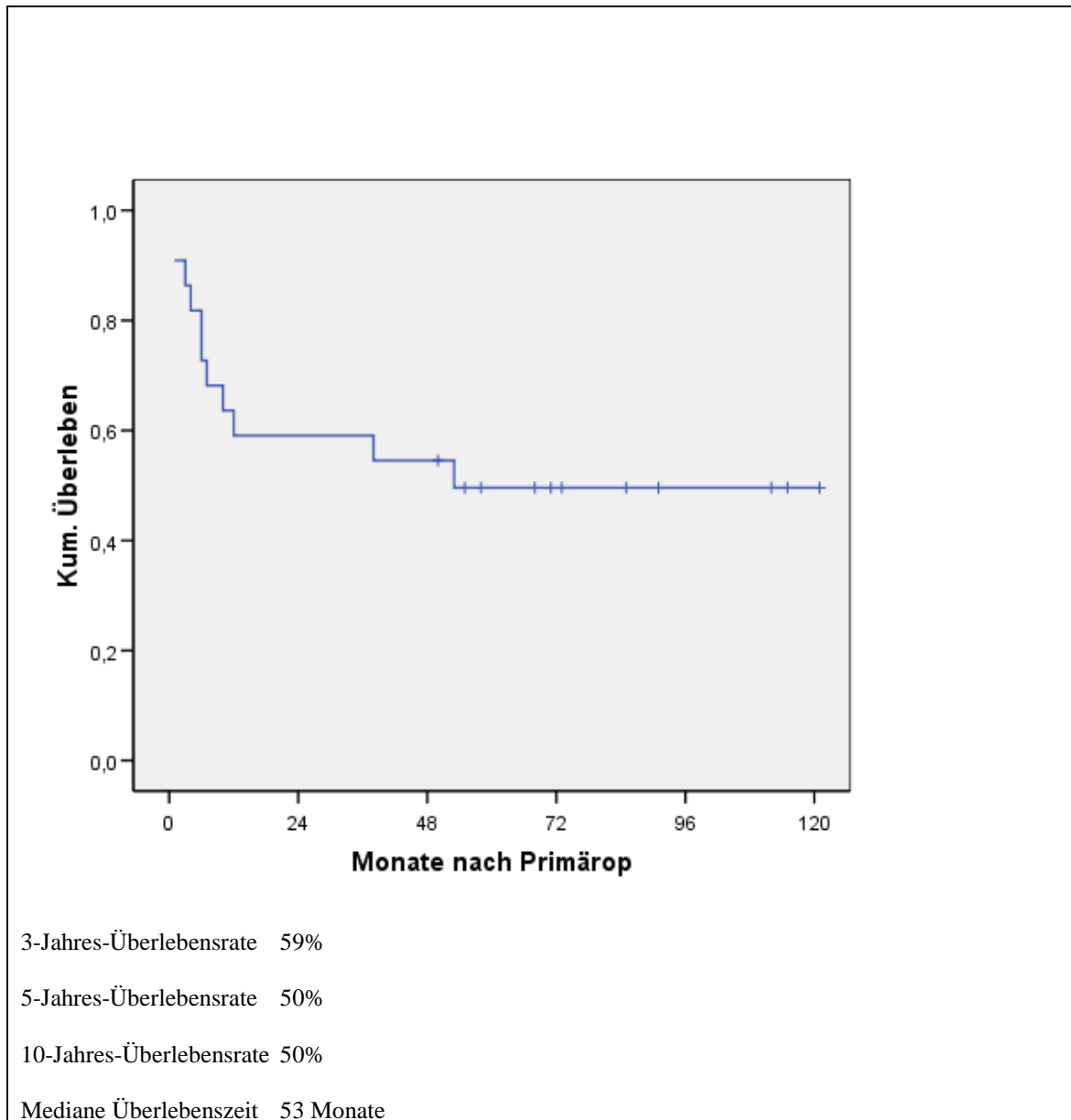


Abbildung 12: Kaplan-Meier Kurve der Überlebensrate nach Primäroperation.

Aus den Mutationsanalysen der untersuchten Tumorproben lässt sich eine Mutationsrate für MKK4 von 4,54% berechnen. Dies entspricht den Erwartungen unserer Hypothese.

IV. Diskussion der Ergebnisse unter Berücksichtigung von Prognose und Überlebenszeit

Die Mutationsrate der untersuchten Proben kolorektaler Karzinome liegt bei 4,54%. Dieses Ergebnis liegt nur unwesentlich unterhalb der in der Literatur für Brustkrebszellen beschriebenen Rate von 5%, wobei in einer weiteren Arbeit von Gh. Su et al. homozygote Deletionen in 2% der untersuchten Adenokarzinome der Bauchspeicheldrüse und in 6% der Gallenblase sowie in 2% heterozygote Deletionen in pankreatischen Karzinomen beschrieben worden sind. [3;6] In einer weiteren groß angelegten Studie an Tumorgewebe von Bauchspeicheldrüsen-, Lungen-, kolorektalen-, Brust- und Hodenkarzinomen fanden sich insgesamt sechs kodierende Mutation bei einer Probenanzahl von 231, also 2,6%. Interessant ist hierbei die Berücksichtigung des Verlusts der Heterozygotie aufgrund der Mutationen. [46] Es wurde ein Verlust der Fähigkeit zur Phosphorylierung MKK4s nach Mutation festgestellt. Sämtliche Studien gehen davon aus, dass diese Mutationen eine wichtige prognostische Bedeutung für das Outcome von Tumorpatienten in Bezug auf Überlebenszeit und damit auch Prognose haben könnten, eine weitere der Arbeitshypothesen dieser Arbeit.

Weiterhin konnte die vorliegende Untersuchung zu Mutationsrate im MKK4 Genom diese nicht nur bestätigen, sondern darüber hinaus auch zeigen, welcher genaue Locus der entdeckten Mutation zu Grunde liegt. Ein entscheidender Vorteil, da eine genaue Identifikation eines Genortes im Allgemeinen und des Locus MKK4 CL1 444 im Besonderen bisher nicht Ziel von Untersuchungen war. Daraus wird der auch in der Literatur beschriebene erhebliche Vorteil der aufwendigen Durchführung einer Sequenzierung zur Mutationsanalyse ersichtlich. Der Aufwand der in dieser Arbeit beschriebenen Methode liegt dabei nicht nur in der Notwendigkeit, mehrmals Arbeitsschritte zwecks Inkubation oder Wachstum für 24 Stunden zu unterbrechen, sondern auch in der Nutzung mehrerer verschiedener Räumlichkeiten, um eine

Kontamination der verschiedenen Ansätze der Methode untereinander zu vermeiden.

Die zahlreichen gefundenen CG – Kompressionen im MKK4 Gen sind nach derzeitigem Forschungsstand ohne Bedeutung für die Funktionalität des Gens. Hierbei handelt es sich um Hairpins oder Loops, die sich bei stark GC - haltigen komplementären Sequenzen bilden. [3] Die DNA – Beweglichkeit ist hierdurch verändert, die Banden erscheinen in der Sequenzierung gestaucht oder die Abstände verkürzt, so dass gängige Computerprogramme wie das für diese Arbeit genutzte Analyseprogramm nicht in der Lage sind, die aufeinanderfolgenden Guanin- bzw. Cytosinbasen als zwei von einander getrennte Banden darzustellen und zu erkennen. Auf den ersten Blick scheint daher eine Deletion vorzuliegen. Bei der visuellen Korrektur anhand der Fotografie des Gels erscheinen die resultierenden Banden jedoch leicht verbreitert, so dass sich die CG - Kompression deutlich von Mutationen unterscheidet. Es wird davon ausgegangen, dass diese Eigenart der DNA keine Konsequenz für das Genprodukt hat. Auffällig war in diesem Zusammenhang lediglich die Häufung von CG - Kompressionen im hinteren Abschnitt des MKK4 Gens, also in dem Bereich, der mittels des Primers CL2 multipliziert wurde, was auf einen erhöhten CG - Gehalt in dieser Region deutet. Da es sich hierbei laut Literatur um rein strukturelle Veränderungen handelt, bedürfen die CG – Kompression keiner weiteren Studien.

Vor dem Hintergrund der in dieser Studie nachgewiesenen Mutation gehen wir im Einklang mit der in der Literatur vorherrschenden Meinung ebenfalls davon aus, dass eine weitere Verfolgung der genauen Wirkweise dieser Mutation sowie ihrer Auswirkung auf die intrazellulären stressinduzierten Signalwege und damit auch der Möglichkeit einer Tumorsuppression erfolgen sollte. Insbesondere erscheint die weitere Erforschung des Vorhandenseins eines tumorsupprimierenden Signalwegs, der unabhängig von DPC4, p16, p53 und BRCA2 abläuft, empfehlenswert. [9]

Unter dieser Fragestellung erfolgte bereits eine Untersuchung des Verhaltens von omnipotenten embryonischen Stammzellen nach Verlust von MKK4, wobei dominant-negative mutierte DN-MKK4 S257A untersucht wurden. [9] Dabei

wurde festgestellt, dass Zellen nach mutationsbedingtem MKK4 Verlust nicht mehr der cell contact inhibition unterlagen sowie gegen stressinduzierte Apoptosis gefeit waren. Dabei wurde cell contact inhibition als die physiologische Antwort einer Zelle auf das Vorhandensein zahlreicher Zellen in der Umgebung verstanden. Vermittelt über interzelluläre Kontakte stellen die Zellen Wachstum und Zellteilung ein oder reagieren sogar mit Apoptose, um eine konstante Zellzahl im Gewebe zu halten. Der Verlust dieser Fähigkeit führt demnach zu überschießendem Zellwachstum. Auch diese Eigenschaft bestätigt die Hypothese, dass MKK4 als Tumor-Suppressor-Gen in Frage kommt.

Insgesamt betrachtet ergibt sich jedoch die Frage nach der Wertigkeit der in dieser Arbeit sowie in den bereits geschilderten Forschungsgruppen festgestellten Mutationen. Es erscheint eine Einteilung in strukturelle und kodierende Mutationen sinnvoll. Dabei sind unter strukturellen Mutationen solche Mutationen zu verstehen, die die resultierende Aminosäuresequenz nicht beeinflussen sowie Mutationen, die zwar die Aminosäuresequenz des Proteins, daher von MKK4, ändern, jedoch keinen Einfluss auf die volle Funktionsfähigkeit des Enzyms haben. Kodierende Mutationen sind demnach Mutationen, die die Eigenschaften des resultierenden Enzyms ändern. Es ergibt sich aus dieser Fragestellung die Notwendigkeit zur weiterführenden Forschung an MKK4 in Bezug auf Genom und Funktion.

In dieser Studie wurde bei einem der 44 Patienten eine Mutation von MKK4 im Tumorgewebe festgestellt. Es handelt sich hierbei um eine Austauschmutation, bei der Adenosin durch Guanin ersetzt wurde. Die statistische 5-Jahres-Überlebensrate dieses Patienten betrug bei einem Tumorstadium UICC 1 80%. Zum Zeitpunkt der letzten Datenerhebung für diese Studie betrug seine postoperative rezidivfreie Überlebenszeit 112 Monate, also etwa 9 ½ Jahre. Interessant ist dabei auch die Tatsache, dass es sich um einen Tumor handelte, welcher im Rektum lokalisiert war. Hierbei liegen aufgrund der verschiedenen venösen Abflussgebiete drei mögliche Metastasierungswege in Abhängigkeit der Lokalisation im oberen, mittlerem oder unterem Rektum vor, so dass gehäuft Metastasen auftreten können. In diesem Fall war es also scheinbar nicht zu einem Verlust der Zellfähigkeit zur cell contact inhibition, wie oben

erläutert, gekommen. Die Mutation des MKK4 Gens führte nicht zu der erwarteten erhöhten Metastasenraten und damit früheren Sterblichkeit.

Die Möglichkeit einer kodierenden Mutation kann aber alleine durch dieses Ergebnis nicht ausgeschlossen werden, im Gegenteil. Es fällt eine deutlich höhere Überlebensrate des Patienten im Vergleich zu anderen Patienten mit vergleichbarem Tumorstadium des untersuchten Kollektivs auf. Dies legt die Vermutung nahe, die Mutation MKK4 CL1 444 könnte zu einer erhöhten Proteinfunktion führen und somit aktiv die Tumormetastasierung und Progression unterdrücken, also eine schützende Wirkung haben.

Die Fähigkeit von MKK4, die Metastasenfähigkeit von Prostatakarzinomen in Mäusen zu unterdrücken, wurde anhand von knock-out Mäusen sowie Progressionsanalysen bereits hinreichend beschrieben. [59;21] Bisher wurde davon ausgegangen, dass Tumore diese Fähigkeit von MKK4 durch Herabregulierung des kodierenden Genomabschnittes umgehen können. Eine ähnliche Wirkung könnte auch der Verlust von Funktionsfähigkeit durch Mutationen von MKK4 bewirken. [57] Andererseits wäre es aber, wie oben beschrieben, nicht nur möglich, dass eine Mutation von MKK4 zu einer verringerten Funktion des Enzyms führt, sondern auch, dass diese eine erhöhte Aktivität von MKK4 bewirken könnte und damit verstärkt präventiv wirken könnte. Im Hinblick auf mögliche hereditäre Prognosefaktoren bei MKK4-Mutationsträgern scheint also nicht nur die Feststellung, dass eine Mutation vorliegt, sondern auch welcher Art diese ist, entscheidend zu sein. Auch hier zeigen sich die Vorteile einer Sequenzanalyse gegenüber der immunhistochemischen Untersuchung. Zudem würde auch eine Untersuchung der ursprünglichen Normalgewebe vor Manifestation des Karzinoms auf ihren MKK4 Status sinnvoll sein, um eine Aussage über die prognostische Bedeutung von MKK4 Mutationen treffen zu können. Hierzu wäre jedoch eine großangelegte Datenbank von kolorektalen Proben, die im Rahmen von Koloskopien einen Normalbefund ergaben, notwendig. Alternativ könnte das umliegende Normalgewebe im tumorfreien Bereich analysiert werden.

Von Vorteil könnte dieses Vorgehen insbesondere für Patienten sein, in deren unmittelbarer Verwandtschaft ein oder mehrere Fälle von Kolonkarzinomen

aufgetreten sind, ohne dass es sich dabei um hereditäre Karzinome, wie zum Beispiel das Lynch-Syndrom oder auch das Peutz-Jeghers-Syndrom, handelt.

Möglicherweise liegt auch eine tumorbegünstigende Wirkung von MKK4 im Falle des kolorektalen Karzinoms vor, die durch Mutation aufgehoben wird. Für Brusttumore wurden Hinweise gefunden, dass MKK4 sogar eine pro-onkogenetische Aktivität besitzen könnte, da in Studien MKK4-knockout Brusttumorlinien geringere Tumorstadiumsraten aufwiesen als unveränderte Zelllinien. [49]

Mehrere Arbeiten kamen zu dem Rückschluss, dass MKK4 ein Marker für rückfallfreie Überlebenszeit sowie Gesamtüberlebenszeit sein könnte. [55;57;29;30] Bereits 1997 konnte nachgewiesen werden, dass die resultierenden Proteine in vier von fünf mutierten MKK4 Loci von menschlichen Krebszellen nicht mehr in der Lage waren, nachstehende Kinasen zu phosphorylieren. Diese Erkenntnisse wurden an menschlichen Tumorzelllinien von Bauchspeicheldrüsen- und Lungentumoren gewonnen und als Hinweis auf eine mögliche Rolle von MKK4 als Tumorsuppressor bei der Tumorgenese in gewissen Zelltypen verstanden. [46]

Die vorliegende Arbeit liefert durch die Sequenzanalyse eine Möglichkeit, diesen Einfluss auch auf molekulargenetischer Ebene zu untersuchen. Die endgültige Klärung der Frage, in wieweit Mutationen von MKK4 einen Einfluss auf Prognose und Überlebenszeit des kolorektalen Karzinoms nimmt, konnte jedoch auch in dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden. Durch die Identifikation des Genlocus MKK4 CL1 444 wurde jedoch ein sogenannter point of high interest gefunden, dem weitergehende Studien folgen sollten und müssen.

Insbesondere muss ergänzt werden, dass die Arbeiten von K.S. Chae et. al keine Hinweise für einen Einfluss der Expression von MKK4 auf die Tumorprogression ergaben. [10] In der Arbeit zur Expression von MKK4 in menschlichen Magenkarzinomen wurde beschrieben, dass in 43 Fällen eine Reduktion von MKK4 in Magenkrebszellen gefunden wurde, die jedoch in keinem Zusammenhang mit der Tumorerkrankung gebracht werden konnten

und die auch keine Korrelation zu Stadium, Grading oder histopathologischem Befund zeigten.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass in der Literatur die Meinung vorherrscht, MKK4 spiele eine Schlüsselrolle in Tumorgenese, Tumorprogression und Tumormetastasierung. Zur Zeit besteht jedoch keine Einigkeit über die Mechanismen, durch die ein Einfluss auf Überlebenszeit und Prognose zu Stande kommt sowie über die Richtung, die dieser Einfluss nimmt. Letztlich deuten die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ebenfalls einen Einfluss der Mutation von MKK4 auf die Überlebenszeit der betroffenen Patienten an. Eine endgültige Klärung, worin dieser Einfluss begründet liegt, konnte jedoch auch durch die Sequenzanalyse und damit Identifikation der genauen Art der Mutation sowie des Mutationsortes nicht erfolgen. Zwei Mechanismen erscheinen in diesem Rahmen möglich: Eine tumorfördernde Wirkung von MKK4, die durch die Mutation an MKK4 CL1 444 unterbunden wurde sowie eine tumorhemmende Wirkung von MKK4, die durch eine verstärkte Phosphorylierungsfähigkeit von MKK4 nach Mutation gesteigert wurde. Zudem bleibt die Möglichkeit, dass es sich bei dem Austausch von Adenosin durch Guanin an dieser Stelle im Genom um eine strukturelle oder auch stille Mutation handelt, die keinerlei Auswirkung auf das Protein hat.

Unter Zusammenschau der vorliegenden Fachliteratur halten wir letzteren Mechanismus und damit die tumor- und metastasensupprimierende Funktion von mitogen-aktivierter Kinase Kinase vier als wahrscheinlicher. In diesem Zusammenhang erscheint es als bemerkenswert, dass es sich bei der gefundenen Mutation um den Austausch der Purinbase Adenosin gegen Guanin handelt, welches ebenfalls eine Purinbase ist. Dadurch entsteht eine geringere Abweichung von der sekundären und tertiären Faltstruktur der resultierenden DNA als bei einer Purin-Pyrimidin-Mutation. [25] Dies scheint die These zu stützen, dass es sich um eine funktionsfähige Mutation handelt.

Die vorliegende Arbeit liefert eine gute Grundlage für weiterreichende Forschung auf diesem Gebiet. Insbesondere die Identifizierung von zuverlässigen Primern und die Konstruktion einer wiederholbaren Methode zur

Aufschlüsselung der vorliegenden MKK4 – Gensequenz erscheinen uns als die wesentlichen Errungenschaften dieser Arbeit.

Des Weiteren erfolgte die Identifizierung des Genortes MKK4 CL1 444 als eine Stelle von erhöhtem Interesse innerhalb des Gens, auf welche weitere Forschungsarbeiten folgen können und sollten. Insbesondere empfiehlt sich die Durchführung von Mutationsanalysen mittels der oben beschriebenen Methode zur Bestätigung einer erhöhten Mutationsrate am Locus MKK4 CL 1 444 sowie möglicherweise zur weiteren Darstellung hochfrequenter Mutationsorte. In diesem Rahmen sollte zudem eine Funktionsanalyse der resultierenden Proteine auf die Fähigkeit zur Phosphorylierung erfolgen, insbesondere unter Vergleich der regulären Aktivität des Enzyms. Erst durch diese nachfolgenden Studien wird eine Klärung des Einflusses von Mutationen im MKK4 Gen wahrscheinlicher.

V. Zusammenfassung

Bei MKK4 handelt es sich um ein Enzym, das eine Schlüsselrolle in der Signalübertragung zellulärer und extrazellulärer Stressfaktoren spielt. Seit langem wird in der Forschung die Möglichkeit diskutiert, dass MKK4 damit auch eine Schlüsselrolle in Bezug auf Tumorprogression und Metastasierungsrate innehaben könnte. Insbesondere die Auswirkung der Expression und Mutation von MKK4 auf die Prognose von Tumorpatienten wird kontrovers diskutiert.

Das kolorektale Karzinom ist mit 15% aller Krebserkrankungen in Westeuropa und den USA einer der häufigsten Tumore. Bei Frauen steht es an erster Stelle der Karzinomerkrankungen, bei Männern an zweiter Stelle nach den Bronchialkarzinomen. Da das kolorektale Karzinome sich lediglich durch unspezifische Symptome wie Meteorismus oder Stuhlunregelmäßigkeiten bemerkbar macht, verzögert sich die Diagnosestellung. Im UICC Stadium 1 beträgt die 5-Jahresüberlebensrate nach gegenwärtiger maximaler kurativer Therapie 80%. Metastasen kommen aufgrund des venösen Abflusses über die Pfortader besonders häufig in der Leber vor, aber auch Metastasen in Lunge und Gehirn sowie allen weiteren Organen sind beschrieben.

In dieser Arbeit wurde mittels Half Nested PCR, Ligation mit anschließender Klonierung, MiniPrep und Sequenzierung eine genaue Analyse der Basenabfolge des MKK4 Gens in Proben kolorektaler Tumore erhoben.

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Methode bestätigen die in der Literatur benannte Mutationsrate von etwa fünf Prozent des MKK4 Gens mit 4,54% auch für kolorektale Karzinome. Es wurde eine Mutation bei 44 untersuchten Gewebeproben kolorektaler Tumore festgestellt, es handelt sich dabei um den Genlokus MKK4 CL1 444. An dieser Stelle wurde Adenosin gegen Guanin ausgetauscht.

In dieser Studie fand sich bei dem Träger der Mutation eine mit 112 Monaten im Vergleich zu den weiteren Patienten des Untersuchungskollektivs sehr lange Überlebenszeit des Patienten. Damit gibt es Grund zu der Überlegung, dass MKK4 auch im Falle des kolorektalen Karzinoms die Überlebenszeit beeinflussen könnte. Zudem stellt sich die Frage, welchen Einfluss die

vorliegende Mutation tatsächlich auf Prognose und damit Überlebenszeit hat. Dabei treten zwei grundsätzliche Fragen in den Vordergrund:

1. Handelt es sich um eine strukturelle oder kodierende Mutation? Anders formuliert, hat die gefundene Mutation überhaupt Einfluss auf das resultierende Protein?

2. Wenn die Mutation Einfluss hat, handelt es sich dabei um Inhibierung der Tumorprogression durch Hemmung einer pro-onkogenen Fähigkeit von MKK4 oder um direkte Inhibition der Tumorprogression durch Aktivitätserhöhung des Enzyms?

Zur Überprüfung dieser Fragestellung ist es nötig, eine Struktur- und Funktionsanalyse des veränderten Genprodukts vorzunehmen, um zu überprüfen, ob die gefundene Mutation auch tatsächlich die Wirkung von MKK4 beeinflusst.

Ferner legt das Ergebnis nahe, dass der Genort MKK4 CL1 444 ein sogenannter „point of high interest“, ein Ort erhöhten Interesses innerhalb des MKK4 Gens sein könnte, also ein Abschnitt im Genom mit erhöhter Mutationsrate. Um diese Annahme einer erhöhten Mutationsrate an diesem Genort zu bestätigen, ist eine großangelegte Studie mit Schwerpunkt auf MKK4 CL1 444 erforderlich. So lässt sich untersuchen, ob der als Mutationsort identifizierte Genlokus 444 auch bei großen Fallzahlen gehäuft vorkommt und ob er einen tatsächlichen Einfluss auf die Überlebenszeit von Patienten mit kolorektalem Karzinom nimmt oder ob es sich um einen einmaligen Zufallsbefund handelt.

Als Vorarbeit für diese Folgestudien gelang es, eine präzise Methode zur Sequenzanalyse von MKK4 zu entwickeln.

Dazu wurden im Rahmen mehrerer Versuchsreihen das Enzym PFU sowie die Primer MKK4 CL1 und CL2 für die Nutzung in einer Half-nested PCR als die mit der geringsten Störanfälligkeit herauskristallisiert. Zudem wurde durch Klonierung der in E.coli Zellen eingebrachten Plasmide die Möglichkeit gewonnen, drei verschiedene Klone desselben Genabschnittes zu analysieren und damit bakteriell bedingte Fehlergebnisse zu eliminieren. Die Übereinstimmung mit den bekannten Mutationsraten in der Literatur bestätigt dabei die Reliabilität unserer Methode.

Gerade im Hinblick auf die doch recht widersprüchlichen Meinungen in der Literatur bezüglich des Einflusses von MKK4 erscheint es uns von entscheidender Bedeutung, die Mechanismen der Tumorgenese, der Tumorprogression sowie der Metastasierung genauer zu erforschen, insbesondere unter Berücksichtigung der Rolle, die MKK4 im Signalweg der Zellen spielt.

Perspektivisch lässt sich erhoffen, dass diese Ergebnisse die Wege zu neuen prognostischen Faktoren und darüber hinaus auch zu neuen Therapieansätzen mit resultierender längerer Überlebenszeit für die betroffenen Patienten öffnen werden.

VI. Literaturverzeichnis

1. **Ausubel, F. M. et al.**
Current Protocols in Molecular Biology
Massachusetts General Hospital, Harvard Med. School, Wiley
Interscience 1, 1.5.1 - 1.6.10. Nukleobond – Handbuch

2. **Barns SM, Grow CC, Okinaka RT, Keim P, Kuske CR**
Detection of diverse new Francisella-like bacteria in environmental samples
Applied Environmental Microbiolgy 2005

3. **Beck KF, Stathoulos I, Berninger MG, Schweizer M**
Overcomng GC compression in nucleotide sequencing
Biotechniques.
1993 Mar; 14(3) : 375

4. **Berchthold:**
Chirurgie, 4. Auflage;
Bruch HP,
Urban & Fischer, 2001

5. **Birnboim, H. C. and J. Doly**
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
NAR 7, 1513 - 1523. (1979)

6. **Birnboim, H. C.**
A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA.
Meth. Enzymol. 100, 243 - 255. (1983)

7. **Böcker W, Benk H, Heitz P**
Pathologie, 2. Auflage
Urban & Fischer, 2001

8. **Laura Bonetta**
Genome sequencing in the fast lane.
Nature Methods. Bd. 3, S. 141-147. (2006)

9. **Cazillis M, Binguier AF, Delautier D, Buisine M, Bernuau D, Gespach C, Groyer A:**
Disruption of MKK4 signaling reveals its tumor-suppressor role in embryonic stem cells.
Oncogene 2004 Jun 10;23(27): 4735-44

10. **Chae K.S., Ryu BK, Lee MG, Byun DS, Chi SG**
Expression and Mutation Analysis of MKK4, a candidate tumor suppressor gene encoded by chromosome 17p, in human gastric adenocarcinoma.
Eur J Cancer 2002 Oct; 38(15): 2048-57

11. **Cuenda, A.**
Mitogen-activated protein kinase kinase 4
Int. J. Biochem Cell Biol 2000 Jun; 32(6): 581-7

12. **Steven C. Cunningham, Farin Kamangar, Min P. Kim, Sommer Hammoud, Raqeeb Haque, Christine Iacobuzio-Donahue, Raheela Ashfaq, Scott E. Kern, Anirban Maitra, Richard E. Heitmiller, Michael A. Choti, Keith D. Lillemoe, John L. Cameron, Charles J. Yeo, Elizabeth Montgomery, Richard D. Schulick**
MKK4 Status Predicts Survival After Resection Of
Gastric Adenocarcinoma
Arch. Surg. 2006, 141

13. **Deacon K., Blank C.**
Characterization of the mitogen-activated protein kinase kinase 4(MKK4)/c-JunNH2-terminal kinase 1 and MKK3/p38 pathways regulated by MEK kinases 2 and 3. MEK kinase 3 activates MKK3 but does not cause activation of p38 kinase in vivo.
J Biol Chem (1997), May 30
272(22): 14489-96

14. **Derijard B, Raingeaud J, Barrett T, Wu IH, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ:**
Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms
Science (1995) Feb 3; 267(5198): 682-5

15. **Di Yang, Cathy Tournier, Mark Wysk, Hong-Tao Lu, Jie Xu, Roger J. Davis, Richard A. Flavell**
Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH₂-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity
Cell Biology, Vol. 94, pp 3004 – 3009, April 1997

16. **Flieger D, Keller R, Fischbach W:**
Palliative treatment for colorectal cancer.
Der Internist 2004, 10.1007/s00108-004-1215-6

17. **Flossmann E et al**
Effect of Aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent
evidence from randomized and observational studies
Lancet 2007, 369:1603-13

18. **Ganiatsas S, Kwee L, Fujiwara Y, Perkins A, Tohru I, Labow MA, Zon LI**
SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade
crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis.
Proc Natl Acad Sci USA (1998), Vol. 95, 6881-6886

19. **Hickson JA, Huo D, Vander Griend DJ, Lin A, Rinker-Schaeffer CW, Yamada SD**
The p38 Kinases MKK4 and MKK6 Suppress Metastatic Colonization in
Human Ovarian Carcinoma
Cancer Res 2006, 66(4): 2264-70

20. **Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J:**
Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated
protein kinase (p38beta).
J Biol Chem. 1996 Jul 26; 271(30):17920-6

21. **Kim H.L., Vander Griend DJ, Yang X, Benson DA, Dubauskas Z, Yoshida BA, Chekmareva MA, Ichikawa Y, Sokoloff MH, Zhan P, Karrison T, Lin A, Stadler WM, Ichikawa T, Rubin MA, Rinker-Schaeffer CW**
Mitogen-activated protein kinase kinase 4 metastasis suppressor gene expression is inversely related to histological pattern in advancing human prostatic cancers.
Cancer Res 2001 Apr 1; 61(7): 2833-7

22. **Laemmli, U. K.**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227 (1970) 680-685

23. **E. Layne**
Methode von Warburg-Kalckar
Meth. Enzymol. Vol. 3, 454 (1957)

24. **Lei Wang, Yong Pan, Jia Le Dai**
Evidence of MKK4 pro-oncogenic activity in breast and pancreatic tumors
European Journal of Cancer, Volume 38, Issue 15, October 2002
Meth. Enzymol. Vol. 3, 454 (1957)

25. **G. Löffler**
Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie, 4. Auflage
Springer 2000

26. **TL Lotan, M Lyon, D Huo, JB Taxy, C Brendler, BA Foster, W Stadler, CW Rinker-Schaeffer**
Up-regulation of MKK4, MKK6 and MKK7 during prostate cancer progression: an Important role for SAPK signalling in prostatic neoplasia
Cancer Research 66, Feb 15, 2006
27. **Maxam, A. & Gilbert, W.**
A new method of sequencing DNA.
Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. Bd. 74, S. 560-564. (1977)
28. **McOrist AL, Jackson M, Bird AR**
A comparison of methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples
Journal of Microbiol. Methods 2002
29. **Mirow L., Stanneck L., Strik M., Schiedeck T.H.K., Duchrow M., Bruch H.P., Broll R. (2002)**
Abstract – „Expression von MKK4 in Kolonkarzinomen – Pilotstudie.“
Langenbecks Arch Surg 387 (5-6), 266
30. **Mirow L., Stanneck L., Schiedeck T.H.K., Duchrow M., Bruch H.P., Broll R. (2003)**
Abstract – „Expression of MKK4 in colorectal cancer“
Tech Coloproctol 7 (Suppl 1), S7-8
31. **M. Müller und Mitarbeiter**
Chirurgie für Studium und Praxis
Medizinische Verlags- und Informationsdienste, 2002/03

32. **Mullis KB:**
Target amplification for DNA analysis by the polymerase chainreaction.
Ann Biol Clin (Paris). 1990; 48(8)
33. **Nishina H, Radvanyi L, Raju K, Kozieradzki I, Penninger JM**
Impaired TCR-mediated apoptosis and Bcl-XL expression in T cells
lacking the stress kinase activator SEK1/MKK4
J. Immunoll 1998 Oct. 161(7)
34. **Oevermann E., Killaitis C., Kraus M., Schwandner O., Bruch H.P.,**
Aktuelles aus der Nachsorge beim kolorektalen Karzinom
Coloproctology 2005, 27: 289-8
35. **Robinson D, He F, Pretlow T, Kung HJ:**
A tyrosine kinase profile of prostate carcinoma.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA: Vol. 93, June 1996: 5958-5962
36. **Robinson VL, Hickson JA, Vander Griend DJ, Dubauskas Z, Rinker-
Schaeffer CW**
MKK4 and metastasis suppression: a marriage of signal transduction and
metastasis research.
Clin Exp Metastasis. 2003; 20(1): 25-30
37. **Sanger F. et al.**
Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA.
Nature. Bd. 265, S. 687-695. (1977)

38. **Sanger, F. et al.**
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. Bd. 74, S.
5463-5467. (1977)
39. **SantaLucia J Jr.**
Physical principles and visual-OMP software for optimal PCR design.
Methods Mol.Biol. 2007
40. **Schepp, Wolfgang**
Primärprävention kolorektaler Polypen und Karzinome – Einsatz von
ASS noch unzureichend gesichert
Deutsches Ärzteblatt 93, Ausgabe 44
41. **Schmiegel W., Reinacher-Schick A.**
Acetylsalicylsäure zur Prävention kolorektaler Adenome
Der Internist Oktober 2003, Volume 44, Seiten 1322-1324
42. **G Sethi, KS Ahn, D Xia, JM Kurie, BB Aggarwal**
Targeted Deletion of MKK4 Gene Potentiates TNF-Induced Apoptosis
through the Downregulation of NF-kappaB
J. Immunol (2007) 179: 1926-33.
43. **L.H. Sobin, Ch. Wittekind**
TNM Classification of Malignant Tumours (In affiliation with UICC)
Kolorektale Klassifizierung
John Wiley and Sons, Hoboken, New Jersey
6. Ausgabe, 2002

44. **Su G.H., Hilgers W, Shekher MC, Tang DJ, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE**
Alterations in Pancreatic, Biliary and Breast Carcinomas Support MKK4 as a Genetically Targeted Suppressor Gene
Cancer Research 58, 2339-2342, 1998
45. **Su Gh, Song JJ, Repasky EA, Schutte M, Kern SE**
Mutation rate of MAP2K4/MKK4 in breast carcinoma
2001
46. **Teng D.H., Perry III WL, Hogan JK, Baumgard M, Bell R, Berry S, Davis T, Frank D, Frye C, Hattier T, Ju R, Jammulapati S, Janecki T, Leavitt A, Mitchell JT, Pero R, Sexton D, Schroeder M, Su PH, Swedlund B, Kyriakis JM, Avruch J, Bartel P, Wong AKC, Oliphant A, Thomas A, Skolnick MH, Tavitgian SV:**
Human Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 4 as a Candidate Tumor Suppressor.
Cancer Research 57, Okt. 1, 1997; 4177-4182
47. **Tu Z, Mooney SM, Lee FS**
A subdomain of MEKK1 that is critical for binding to MKK4
Cell Signal 2003 Jan., 15(1)
48. **Wada T, Nakagawa K, Watanabe T, Nishitai G, Seo J, Kishimoto H, Kitagawa S, Sasaki T, Penninger JM, Nishina H, Katada T:**
Impaired Synergistic Activation of Stress-activated Protein Kinase SAPK/JNK in Mouse Embryonic Stem Cells Lacking SEK1/MKK4.
J Biol Chem 2001, 276(33): 30892-30897
49. **Wang L, Pan Y, Dai JL:**
Evidence of MKK4 pro-oncogenic activity in breast and pancreatic tumors
Oncogene 2004 Aug 5; 23(25): 5978-85

50. **O. Warburg & W. Christian**
Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase
Biochem. Z. 310, 384 – 421 (1941)
51. **T Watanabe, K Nakagawa, S Ohata, G Nishitai, J Seo, S Tanemura, N Shimizu, H Kishimoto, T Wada, J Aoki, H Arai, T Iwatsubo, M Mochita, T Watanabe, M Satake, Y Ito, T Matsuyama, TW Mak, JM Penninger, H Nishina, T Katada**
SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast Proliferation
Dev Biol. (2002) 250
52. **Jürgen Weitz, Moritz Koch, Jürgen Debus, Thomas Höhler, Peter R. Galle, Markus W. Büchler**
Colorectal Cancer
Lancet 2005; 365:153-65
53. **Whitehouse CA, Hottel HE**
Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of Francisella tularensis DNA from spiked soil samples
Molecular Cell Probes, 2007
54. **Wie Xin, K J. Yun, Francesca Ricci, Marianna Zahurak, Wanglong Qiu, Gloria H. Su, Charles J. Yeo, Ralph H. Hruban, Scott E. Kern, Christine A. Iacobuzio-Donahue**
MAP2K4/MKK4 Expression in Pancreatic Cancer – Genetic Validation of Immunohistochemistry and Relationship to Disease
Molecular Oncology, 2006

55. **Wu C.W., Li A, Chi CW, Huang CH, Shen KH, Liu WY, Lin WC:**
Human Gastric Cancer Kinase Profile and Prognostic Significance of MKK4 Kinase
American Journal of Pathology (2000), Vol. 156, No. 6; 2007-15
56. **Xiangdong Meng & Scot A. Wolfe**
Identifying DNA sequences by a transcription factor using a bacterial one-hybrid System
Nature 2006 Jun: 30 – 45
57. **Yamada SD, Hickson JA, Hrobowski Y, Vander Griend DJ, Benson D, Montag A, Karrison T, Huo D, Rutgers J, Adams S, Rinker-Schaeffer CW:**
Mitogen-activated protein kinase kinase acts as a metastasis suppressor gene in human ovarian carcinomas.
Cancer Res 2002 Nov 15; 62(22): 6717-23
58. **Yang D, Tournier C, Wusk M, Lu HT, Xu J, Davis RJ, Flavell RA:**
Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun-NH2-terminal kinase activation, and defects in AP-1 transcriptional activity.
Proc Natl Acad Sci USA (1997) Apr 1; 94(7): 3004-9
59. **Yoshida BA, Dubauskas Z, Chekmarea MA, Christiano TR, Stadler WM, Rinker-Schaeffer CW**
Human MKK4 as a candidate tumor suppressor
Cancer research 59, Nov 1 1999
5483-5487

VII. Anhang

1. Geräte und Chemikalien

Gerät	Firma	Ort	Land
Biofuge 22R	Heraeus	Hanau	D
DNA Sequencer L4000	MWG Biotech	Ebersberg	D
Bunsenbrenner Fireboy eco	TecNoMara, IBS	Fernwald	D
DU®G40 Spectrophotometer	Beckmann Coulter	Fullerton	USA
Elektropipette Precision	Biozym	Hamburg	D
Horizontal Elektrophoresekammer (4x)	Fröbel	Wasserburg am Bodensee	D
Inkubator Kelvitron®t	Heraeus	Hanau	D
Laborwaage PC 400	Mettler-Toledo	Giessen	D
Magnetrührer IKA-Combimag RCT	Jahnke&Kunkel	Staufen	D
Megafuge 1.UR	Heraeus	Hanau	D
Mikrowelle HF 22034	Siemens	München	D
PC Cordant	Fujitsu-Siemens	München	D
PCR-Maschine Primus 96 ^{plus}	MWG-BIOTECH	Ebersberg	D
PCR-Maschine Cyclone 25	PEQLab, Biotechnologie GmbH	Erlangen	D
Pipette 0,5 - 10µl Reference	Eppendorf	Hamburg	D
Pipette 10 – 100µl Reference	Eppendorf	Hamburg	D
Pipette 100 – 1000µl Reference	eppendorf	Hamburg	D
Pipetus classic	Hirschmann	Eberstadt	D
Photodokumentationsanlage	Mitsubishi	Düsseldorf	D
Photodokumentdrucker	Citizen Systems	Esslingen	D
REAX 2000	Heidolph	Schwabach	D
Sterilbank Class II TYPE A/B 3	NUAIRE	Plymouth	USA
Stromgeber E443	CONSORT	Turnhout	B
Thermomixer Compact	eppendorf	Hamburg	D
UV-Schirm	Fröbel	Wasserburg am Bodensee	D
UV-Schirm Auswerteeinheit	MWG-BIOTECH	Ebersberg	D
Vortex Genie2	Scientific Industries inc.	Bohemia, NY	USA
Wasserbad 1083 (2x)	GFL	Burgwedel	D

Verbrauchsmaterial	Firma	Ort	Land
Biosphere Filter Tips 10µl neutral	Sarstedt	Nümbrecht	D
Biosphere Filter Tips 100µl gelb	Sarstedt	Nümbrecht	D
Biosphere Filter Tips 1000µl blau	Sarstedt	Nümbrecht	D
GELoader Tips 1-10 µl	eppendorf	Hamburg	D
PP- Röhrchen 15ml	Greiner	Frickenhausen	D
PP-Röhrchen 50ml	Greiner	Frickenhausen	D
WYPALL X60	Kimberly-Clark	Neenah	USA
Mikro-Schraubröhre 1,5 ml steril	SARSTEDT	Nürnbergrecht	D
Multidish 6-Well	Nunc Intermed	Wiesbaden- Biebrich	D
Multiply [®] -µStrip 0,2 ml Deckel	SARSTEDT	Nürnbergrecht	D
Multiply [®] -µStrip 0,2 ml Kette	SARSTEDT	Nürnbergrecht	D
0,5µl Multiply Pro	SARSTEDT	Nümbrecht	D
Pipetten Spitzen 0,5-10 µl	Greiner	Frickenhausen	D
Pipetten Spitzen 10-100 µl	Greiner	Frickenhausen	D
Pipetten Spitzen 50-1000 µl	Greiner	Frickenhausen	D
Reaktionsgefäße 1,5 ml	SARSTEDT	Nürnbergrecht	D
Reaktionsgefäße 2ml	SARSTEDT	Nürnbergrecht	D
46 - Wellplatte	SARSTEDT	Nürnbergrecht	D

Kit	Firma	Ort	Land
DNA Sequenzierungs Kit	Amersham biotech harmacia	Uppsala	SW
Nucleospin Plasmid	Machery-Nagel	Düren	D
Pfu DNA Polymerase	Promega	Madison, WI	USA
pCR 4Blunt-Topo	Invitrogen	Carlsbad, CA	USA
Plasmid Maxi Kit 100	QUIAGEN	Hilden	D
Taq DNA Polymerase	Invitrogen	Carlsbad, CA	USA

Chemikalien	Firma	Ort	Land
Agarose Ultra Pur	Life Technologies	Paisley	UK
Trizol	GIBCO® Invitrogen	Carlsbad, CA	USA
dNTP	Amersham Biosciences	New Jersey	USA
DNA Molecular Weight Marker VI	Roche	Mannheim	D
Ethidiumbromid 1%Lsg.	Roth	Karlsruhe	D
Glycerin	Apotheke UK-SH	Lübeck	D
HeLa S3-Zelllinie	DSMZ	Braunschweig	D
LB-Medium	s. Mixtur		
Kanamycin	Sigma	Steinheim	D
Steriles Wasser	Delta Select	Pfullingen	D
Schwerelösung	s. Mixtur		
TAE Puffer	s. Mixtur		
Chillout Liquid Wax	Biozym Scientific	Hess. Oldendorf	D
Primer MKK4	MWG Biotech	Ebersberg	D

Mixturen:

LB-Medium/Agar

Auf einen Liter steriles Wasser
10g Bacto Tryptan
5g Bacto Yeast Extract
10g NaCl
pH wird durch NaOH-Zugabe auf 7,5 titriert
Autoklavieren!
Für Nährböden wird dem Medium 15g/l Agar zugegeben.

TAE-Puffer

242g Trisbase
57,1ml Eisessig
37,2g Na₂EDTA-2H₂O
Wasser ad ein Liter
pH auf 8,3 bis 8,5 titrieren

Stop-Solution/Schwerelösung

40% Saccharose
0,25 Xylenyanol
0,1 M EDTA
pH auf 8,0 pipettieren

2. Primersequenzen

Primername	Sequenz	Bindungsstelle	Annealing T.
M13universal(-21), 18mer	5'TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'		
M13reverse(-29), 18mer	5'CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3'		
MKK4 CL1 Sense-d	5'-TTC AAA TCT ACA GCA AGG TTT-3'	166 bis 271	46,8°C
MKK4 CL1 Antisense	5'-AGC CAG CAT CTC TTG TCT TG-3'	786 bis 891	49,4°C
MKK4 CL2 Sense	5'-GCA AAA TCA CTT TAG CAA CTG-3'	626 bis 731	47,3°C
MKK4 CL2 Antisense	5'-GGA AAC GAA CAC CAA TCT TAT-3'	1319 bis 1424	47,8°C

Primer hergestellt durch die Firma MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland.

II. Danksagung

Mein Dank gilt allen Betreuern, Mitstudenten, Freunden und meiner Familie, die mich in den Jahren dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben. Ohne sie alle wäre die Fertigstellung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Insbesondere danke ich meinem Betreuer Herrn Dr. med. Lutz Mirow für die Möglichkeit, unter seiner Obhut wissenschaftlich tätig zu werden sowie für fortwährende Motivation und kritische Hinterfragung von Methode sowie Zeiteinteilung. Ebenso danke ich aber auch für manches persönliche Gespräch und Rat in allen Lebenslagen.

Dem Chefarzt der chirurgischen Abteilung Herrn Prof. Dr. med. H.-P. Bruch sei gedankt für die Gelegenheit, unter seiner Führung eine Dissertation durchzuführen.

Zudem geht mein aufrichtiger Dank an Frau Regina Kaatz, medizinisch – technische Assistentin im chirurgischen Forschungslabor des UK-SH, Campus Lübeck und gute Seele hinter dieser Arbeit. Ihre anhaltende Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei allen Problemen im fachlichen wie im persönlichen Bereich haben entscheidend zur Durchführung dieser Dissertation beigetragen.

Ein besonderes Dankeschön an Herrn Dr. rer. nat. Michael Duchrow (†), der mir mit fachlicher Kompetenz immer zur Seite stand und für alle auftretenden Probleme Lösungen fand. Es ist schade, dass er nicht mehr bei uns ist, um das Resultat von vielen Stunden Arbeit zu erleben.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeiterinnen des Forschungslabors der Klinik für Chirurgie (Frau G. Grosser-Pape, Frau E. Garibi, Frau V. Grobleben und Frau A.Aumüller) bedanken. Sie alle standen mir mit Rat und Tat zur Seite.

Meinen Eltern sei gedankt für endlose Geduld und jahrelange Unterstützung auf meinem Weg durch das Medizinstudium und durch diese Inauguraldissertation.

Nur sie allein wissen, wie viel Mühe diese Arbeit gekostet hat und darum ist ihnen beiden diese Arbeit gewidmet.

An letzter, aber keineswegs unwichtigster Stelle geht mein Dank an Katja Oberhagemann, gute Freundin, Kommilitonin und Mitstreiterin auf diesem Weg. Wer weiß, wie viel Cappuccino wir zwischen den Versuchen im Labor getrunken haben, wie viel Gespräche wir geführt und wie viel wir gelacht haben? Nur wir allein. Ohne Dich an meiner Seite hätte ich diese Arbeit vielleicht nie zu Ende geführt, einen besonderen Dank dafür!

IX. Lebenslauf

Christina Katrin Lisk, geborene Behra
Westring 71 A
48477 Riesenbeck



Geburtsdatum: 25.11.1979 in Mettingen, NRW

Schulausbildung

1986 – 1990 Paul Gerhard – Grundschule, Mettingen
1990 – 1999 Kardinal von Galen Gymnasium, Mettingen
10/1996 - 01/1997: Bullard High School, Fresno, USA

Schulabschluss

1999 Abitur

Studium

Wintersemester 1999 – Sommersemester 2006
Medizinische Fakultät Medizinische Universität zu Lübeck,
später Universität Lübeck
September 2001: Physikum
September 2002: Erstes Staatsexamen
März 2005: Zweites Staatsexamen
April 2006: Drittes Staatsexamen

PJ – Tertiale

1. Terial Chirurgie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
2. Terial Innere Medizin am Westküstenklinikum Heide
3. Terial Psychiatrie am UK-SH, Campus Lübeck

Arbeitserfahrung:

01. September 2006: Aufnahme einer Tätigkeit als Assistenzärztin im Städtischen Krankenhaus Forst, Innere Medizin
01. Dezember 2008: Innere Medizin, Krankenhaus Ibbenbüren