

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie

Klinische Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Untersuchung des mTOR Signalweges im kolorektalen Karzinom  
und seinen prämaligen Vorstufen**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät**

**der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

**2017**

vorgelegt von:

Hayman Magid

geb. am 29.10.1992 in Jarank Saghir, Syrien

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	1
1.1 Zusammenfassung .....	1
1.2 Abstract .....	2
<b>2. Einleitung</b> .....	4
2.1 mTOR .....	4
2.1.1 S6K1 .....	6
2.1.2 AKT .....	7
2.2 Ziele der Arbeit .....	9
<b>3. Material und Methodik</b> .....	9
3.1 Materialien .....	9
3.1.1 Verbrauchsmaterialien .....	9
3.1.2 Instrumentarien .....	10
3.1.3 Chemikalien/ Biochemikalien .....	11
3.1.4 Angewendete Sets .....	11
3.1.5 Assay on Demand .....	12
3.1.6 Software .....	12
3.1.7 Auswahl des Patientenkollektivs .....	12
3.2 Methoden .....	16
3.2.1 Proteinisolation .....	16
3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	17
3.2.3 Gesamt-RNA-Isolation .....	17

3.2.4 ELISA .....	19
3.2.5 RNA-Konzentrationsbestimmung .....	22
3.2.6 cDNA-Synthese .....	22
3.2.7 PCR.....	24
3.2.8 qRT-PCR.....	24
3.2.9 Statistik und Auswertung .....	27
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>28</b>
4.1 RNA-Ebene .....	29
4.2 Proteinebene .....	31
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>36</b>
5.1 mTOR.....	36
5.2 S6K1.....	38
5.3 AKT .....	40
5.4 Zusammenfassung und Schlussfolgerung.....	42
<b>6. Anhang</b> .....	<b>43</b>
6.1 Verzeichnis der Abbildungen.....	43
6.2 Verzeichnis der Tabellen .....	43
6.3 Abkürzungsverzeichnis.....	44
6.4 Literaturverzeichnis .....	46
<b>7.Danksagung</b> .....	<b>54</b>
<b>8. Lebenslauf</b> .....	<b>55</b>

# 1. Zusammenfassung

## 1.1 Zusammenfassung

**Hintergrund und Ziele:** Das Kolorektale Karzinom (CRC) ist die vierthöchste, krebisbedingte Todesursache weltweit. Der mTOR/S6K1/AKT Signalweg scheint maßgeblich an der Entwicklung, dem Wachstum und der Metastasierung verschiedener Tumoren beteiligt zu sein. Die hier durchgeführte Arbeit diente dem Ziel, pathologisches sowie das korrespondierende normale Tumornachbargewebe im Hinblick auf das Expressionsverhalten von mTOR, S6K1 und AKT zu untersuchen.

**Methoden:** Untersucht wurde schockgefrorenes Gewebe aus Operationspräparaten des Labors der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg-Saar. Es wurden insgesamt 63 Gewebeprouben, davon 20 kolorektale Karzinome (CRC), 19 kolorektale Lebermetastasen (CRLM), 15 Enteritiden und 9 Adenome, untersucht. Im ersten Schritt wurde die Expression von mTOR, S6K1 und AKT auf der RNA Ebene mittels einer RealTime-PCR untersucht. In einem zweiten Arbeitsschritt erfolgte die Expressionsuntersuchung des mTOR/S6K1/AKT-Signalweges mittels ELISA auf der Proteinebene

**Ergebnisse:** Die Expressionsanalyse von mTOR und S6K1 auf der RNA Ebene ergab signifikante Unterschiede zwischen pathologischem und korrespondierendem Tumornachbargewebe bei CRLM-Patienten ( $P < 0,05$ ). Dieses Ergebnis konnte nicht auf der Proteinebene bestätigt werden. In der CRC-, Adenom- und Enteritid-Patientengruppe zeigten weder mTOR noch S6K auf der Proteinebene eine signifikant erhöhte Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Tumornachbargewebe. Es zeichnete sich aber ein signifikanter Expressionsunterschied für das mTOR Protein in den Enteritiden ab, in denen das mTOR Protein signifikant höher exprimiert wurde als in der der CRC- und CRLM-Gruppe ( $P < 0,05$ ).

Das AKT Protein zeigte weder auf der RNA- noch auf der Proteinebene einen signifikanten Expressionsunterschied in einer der untersuchten Entitäten.

Weiterhin liess sich keine Korrelation zwischen erhöhter mTOR, S6K1 und AKT Proteinexpression und den in dieser Untersuchung aufgeführten klinischen und pathologischen Parametern bei CRC-Patienten beobachten.

**Schlussfolgerungen:** Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten nicht auf eine Rolle des mTOR, S6K1 und AKT Proteins bei der Entwicklung des CRC und seiner prämaligen Vorstufen hin. Die Ergebnisse deuten vielmehr darauf hin, dass das mTOR Protein eine Funktion im entzündeten kolorektalen Gewebe hat, da im entzündlichen kolorektalen Gewebe der Enteritid Patienten eine signifikant erhöhte mTOR- Proteinexpression im Vergleich zu den anderen untersuchten Entitäten gemessen wurde. Es konnte keine Korrelation zwischen erhöhter mTOR, S6K1 und AKT Proteinexpression und den in dieser Untersuchung aufgeführten klinischen und pathologischen Parametern bei CRC-Patienten beobachtet werden.

Im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit bedarf es weiterer Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven. Dabei wäre es auch interessant, weitere experimentelle Nachweismethoden wie etwa Immunhistochemie und Western Blot einzusetzen, um die Komplexität des mTOR/S6K1/AKT Signalweges besser zu verstehen.

## 1.2 Abstract

**Background and Goal of the study:** Colorectal cancer (CRC) is the fourth most common cause of cancer death globally. The mTOR/S6K1/AKT pathway seems to be involved in development, growth and metastasis of various tumors. The goal of this study was to compare the expression profiles of mTOR, S6K1 and AKT in colorectal cancer and its pre-stages.

**Methods:** Shock-frozen tissue, taken from surgical specimens of patients operated at the University Hospital Homburg-Saar, were investigated. A total of 63 patients (20 CRC-, 19 CRLM-, 15 Enteritides- and 9 adenoma patients) were examined. Initially, the expression profiles of mTOR, S6K1 and AKT were analyzed and compared on the RNA level in tumor tissues and its corresponding neighboring tissues by RealTime PCR. In addition, mTOR, AKT and S6K1 were also analyzed on the protein level by ELISA.

**Results:** The CRLM patients showed a significant expression of mTOR and S6K1 on the RNA level ( $P < 0,05$ ). These findings could not be confirmed on the protein level. In the CRC, adenoma and Enteritids patient groups neither mTOR nor S6K1 have shown a significantly higher expression in tumor tissues compared to tumor neighboring tissues. However, a significant expression difference was observed for the mTOR protein in the Enteritids, where mTOR protein was significantly higher expressed than in the CRC and CRLM patient cohorts ( $P < 0.05$ ). AKT did not present a significant expression on protein and RNA level in either group. Furthermore, we could not determine any correlation between increased mTOR, S6K1 and AKT protein expression and the clinical and pathological parameters investigated in this study.

**Conclusions:**

The results of this study do not suggest a role for mTOR und S6K1 proteins in the CRC development. However, the results do suggest that mTOR protein has a function in inflamed colorectal tissue as mTOR protein expression was shown to be significantly higher in Enteritids in comparison to the other entities.

AKT does not appear to be involved in the pathogenesis of CRC or its pre-stages. mTOR, S6K1 and AKT protein expression are not correlated with gender, TNM-stage and metastasis based on the results of this study. However, more investigations with larger groups of patients are needed. Therefore, it is important to use different experimental designs, such as immunohistochemical and western blot analysis, to get a better understanding of the mTOR/S6K1/AKT pathway.

## 2. Einleitung

### 2.1 mTOR

Die Entdeckung des Immunsuppressivums Rapamycin und dessen Wirkungsweise führten zur Entdeckung des mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Komplexes. mTOR wird durch Rapamycin inhibiert. Es ist bislang in jedem eukaryotischen Genom nachgewiesen worden, was die Bedeutsamkeit dieses Proteinkomplexes widerspiegelt. mTOR dient zum einen als Sensor für intra-, sowie extrazelluläre Signale und zum anderen als ein zentraler Regulator für Zellstoffwechsel, -wachstum, -proliferation und überleben.

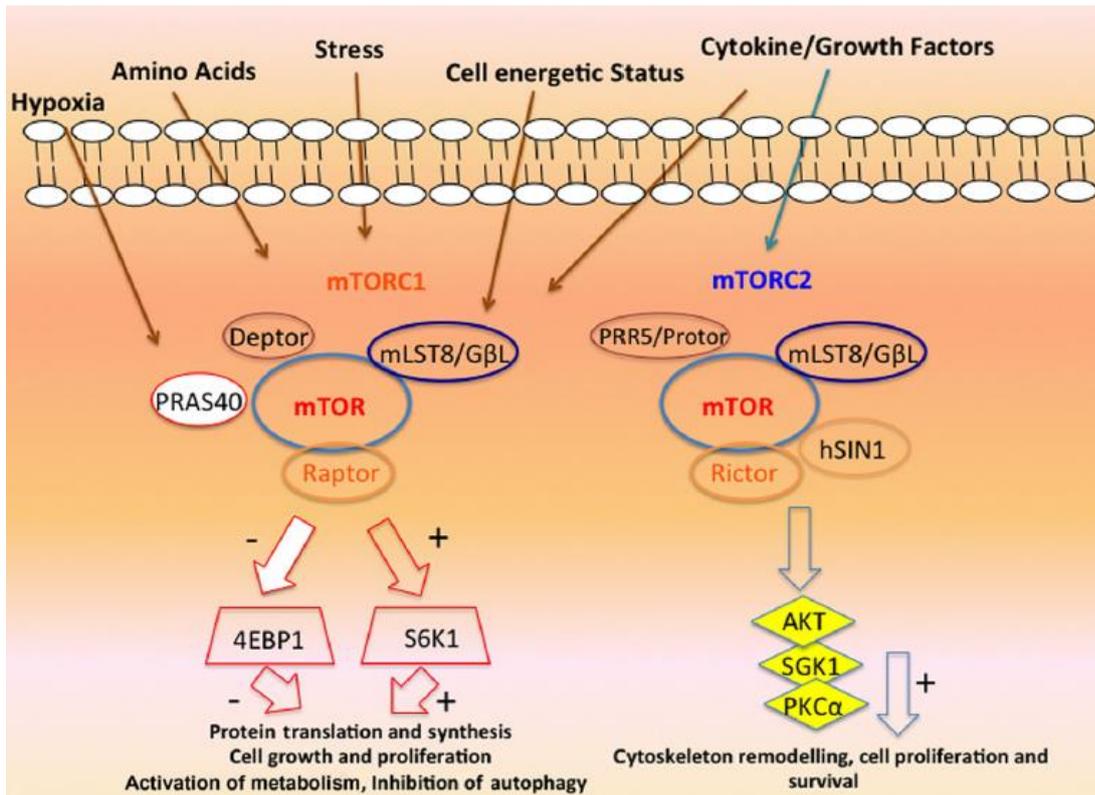
Die zentrale Wirkung von mTOR wird über die Phosphorylierung von anderen Molekülen erzielt, wodurch diese aktiviert werden. In verschiedenen Modellsystemen konnte gezeigt werden, dass der mTOR Stoffwechselweg für die zelluläre Homöostase essentiell ist und dass eine aberrante Veränderung der Phosphorylierungsaktivität zu einer Entwicklung von Fettleibigkeit, Diabetes und Krebs beitragen kann (Dann et al., 2007). In verschiedenen Krankheiten, insbesondere bei Tumorerkrankungen, wird eine aberrante Regulation des mTOR Stoffwechselweges, ausgelöst durch Mutation oder Hyperaktivität des mTOR Proteinkomplexes, mit Gewebswucherung und Tumorwachstum in Verbindung gebracht (Strimpakos et al., 2009; Willems et al., 2012; Zaytseva et al., 2012; Cheng et al. 2013). mTOR ist eine Serine/Threonin-Kinase und gehört zur Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) Familie. Das mTOR Protein lässt sich in zwei unterschiedliche multi-Protein Komplexe unterteilen: mTOR complex 1 (mTORC1) und mTOR complex 2 (mTORC2) (Guertin et al., 2007; Laplante et al., 2009).

Dabei kontrolliert mTORC1 das Zellwachstum in Abhängigkeit von Energieangebot und Wachstumsfaktoren, während mTORC2 für Zellproliferation und, -überleben zuständig ist. mTORC1 ist ein Multiproteinkomplex bestehend aus fünf Komponenten: mTOR, welches die katalytische Untereinheit bildet; regulatory-associated protein of mTOR (Raptor); mammalian lethal with Sec13 proteine 8 (mLST8/GβL); proline-rich AKT substrate 40 kDa (PRAS40) und DEP-domain-containing mTOR-interacting protein (Deptor) (Loewith et al., 2002). Die exakte Zusammensetzung der einzelnen Komponenten des mTORC1 kann je nach Zelltyp und -lokalisation variieren (Laplante et al., 2012). Raptor wirkt positiv regulierend auf

mTORC1, übt eine Stabilisierungsfunktion auf den Komplex aus und ist Ziel zahlreicher Interaktionspartner (Hara et al., 2002; Kim et al., 2002; Schalm et al., 2003). PRAS40 und Deptor hingegen regulieren den mTORC1-Komplex negativ (Sanak et al., 2007; Peterson et al., 2009). mLST8 bindet an die Kinaseeinheit von mTOR und reguliert diese positiv. Es scheint, als könne mLST8 eine Rapamycin-sensitive Bindung zwischen Raptor und mTOR herstellen (Kim et al., 2003).

Der mTORC2 Komplex besteht aus mTOR, rapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor), mammalian stress-activated PK-interacting protein-1 (mSIN1), mLST8, Protor-1, heat shock protein 70- $\alpha$  (Hsp70) und Deptor (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2004; Frias et al., 2006; Pearce et al., 2007). Rictor ist für die katalytische Aktivität von mTORC2 von Bedeutung und arbeitet analog zu Raptor in mTORC1 (Sarbassov et al., 2004). Das mSIN1 ist eine essentielle Untereinheit von mTORC2, da es zum einen für die Komplexbindung und zum anderen für die mTOR Aktivität und der damit verbundenen Phosphorylierung von AKT-Ser473 fungiert (Yang et al., 2006). Das mLST8 ist eine stabile Komponente beider mTOR Komplexe (Guertin et al., 2006). Protor-1 interagiert mit Rictor, ist aber für die anderen Untereinheiten des mTORC2 Komplexes nicht essentiell (Pearce et al., 2007). Das Hsp70 ist für die richtige Formation und Kinaseaktivität von mTORC2 erforderlich (Martin et al., 2008).

Die Rolle von mTOR für das Tumorwachstum wurde in den letzten Jahren näher untersucht. mTOR spielt schon in frühen Entwicklungsstadien der Tumorgenese eine Rolle, was die besondere Bedeutung dieses Proteins unterstreicht (Zhang YJ et al., 2009). Sowohl für mTORC1 wie für mTORC2 wurde eine Überexpression im CRC gemessen (Roulin D et al., 2010). In diesen Zusammenhang spielen auch der stromabwärts gelegene Effektor S6K1, der von dem mTOR Komplex 1 phosphoryliert wird, sowie die Proteinkinase B (AKT), die von dem mTOR Komplex 2 phosphoryliert wird, eine zentrale Rolle. Mutationen in beiden Genen wurden mit einer Tumorentwicklung in Zusammenhang gebracht (Strimpakos et al., 2009).



**Abb. 1:** mTOR Signalweg. Der mTOR Signalweg ist ein zentraler Regulator in der Zelle. mTORC1 und mTORC2 nehmen zwar unterschiedliche Aufgaben wahr, reagieren jedoch gemeinsam auf externe Stimuli wie etwa Hypoxie, zellulärer Stress, Zytokine und Wachstumsfaktoren. mTOR reguliert Zellwachstum und, -teilung, abhängig von Nahrungsangebot und Umweltbedingungen (Moschetta et al. 2014).

### 2.1.1 S6K1

Das S6K1 gehört zur cAMP Proteinkinase A/ Proteinkinase G/ Proteinkinase C (AGC Kinase) Familie. AGC Kinasen sind Serine-Threonin Kinasen, welche regulierend auf einige zelluläre Prozesse, wie etwa Zellwachstum, -überleben und –metabolismus, wirken (Pearce et al., 2010). Es besitzt zahlreiche Isoformen, wie u.a das p70-S6K1. Dieses besitzt 502 Aminosäuren und ist sowohl im Zytoplasma, sowie im Zellkern lokalisiert (Rosner et al., 2011). Das S6K1-Protein fungiert als ein stromabwärts Effektor des mTOR-Komplexes und spielt eine entscheidende Rolle für dessen Signalweg. Die Aktivierung von S6K1 beginnt mit einer initialen Phosphorylierung von vier Serin Einheiten des C-Terminus: S411, S418, S421 und S424 (Ben-Hur et

al., 2013). Dies führt zur Umstrukturierung des Proteins, welches mTOR die Phosphorylierung des T389 Restes ermöglicht und schließlich S6K1 aktiviert (Burnett et al., 1998). Der Aktivierung des S6K1 Proteins bedarf es außer mTOR noch das GßL-, das AKT-, und das PRAS40-Protein (Kim et al., 2003; Haar et al., 2007). Bei Nahrungskarenz wird die mTOR Aktivität gehemmt, was gleichzeitig auch eine Dephosphorylierung von S6K1 bewirkt (Pardo et al., 2013).

Der mTOR/S6K1 Signalweg ist in diversen Tumoren dereguliert wird derzeit als wichtiger Faktor für die Pathogenese verschiedener Tumorentitäten angesehen (Georgrescu et al., 2010). Dabei zeigt das S6K1 Protein sowohl eine erhöhte Aktivität, als auch eine Resistenz gegenüber Arzneistoffen und Chemotherapie, was ihre wichtige Rolle im Tumorwachstum und -überleben verdeutlicht (Ismail et al., 2014).



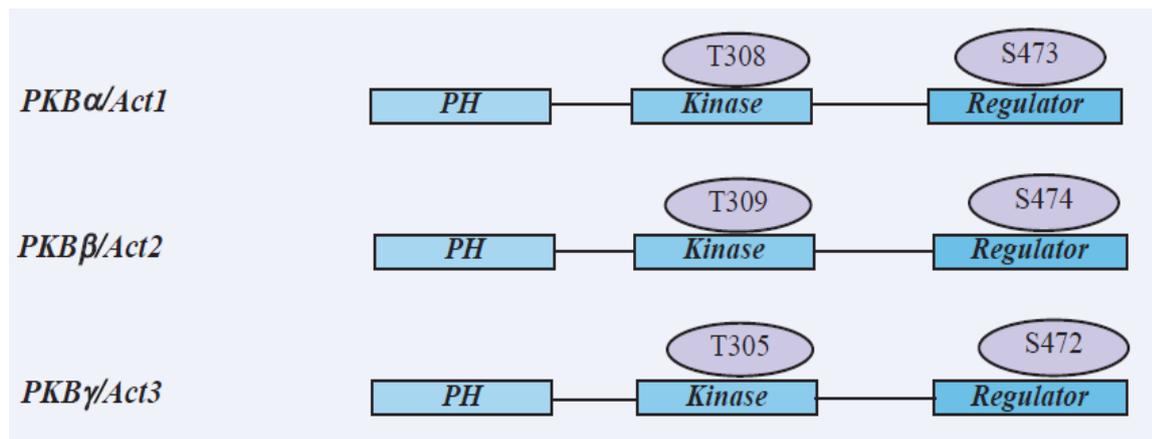
**Abb. 2:** Struktur des S6K1 Protein. NTD: N-Terminus; CTD: C-Terminus Domäne; NLS: Kernlokalisierungssequenz; Pro: Prolin-reiche Domäne; P: Phosphorylierter Rest

### 2.1.2 AKT

AKT besteht aus drei nahezu identischen Proteinen: AKT1, AKT2 und AKT3. Diese Proteine sind Serin/Threonin Kinasen und gehören zur Familie der Proteinkinase B (PKB), welche wiederum zur cAMP Proteinkinase A/ Proteinkinase G/ Proteinkinase C (AGC Kinase) Familie gehören. Alle drei Isoformen besitzen ein Pleckstrin-homolog (PH) Ende, eine zentrale Kinase Domäne und ein hydrophobes Carboxyl Ende welches als Regulator fungiert. Das AKT-Protein kann an zwei Stellen phosphoryliert werden. Zum einen an der Kinase Domäne (T308/T309/T305) und zum anderen am Carboxyl Ende (S473/S474/S472). Die Phosphorylierung nur einer

Stelle z.B. durch mTOR am S473 bewirkt keine vollständige Aktivierung von AKT (Sarbasov et al., 2005). Vielmehr ist dazu die Phosphorylierung an beiden Stellen notwendig. Neben dem mTORC2, kann das AKT auch von DNA-Dependent Protein Kinase (DNA-PK) und phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) aktiviert werden (Hemmings et al., 2012). Inhibitoren des AKT Signalweges sind Protein phosphatase 2A (PP2A) (Andjelkovic et al., 1996), PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1 (PHLPP1/2) (Brognard et al., 2007) und Phosphatase and Tensin homolog (PTEN) (Stambolic et al., 1998).

AKT/PKB ist ein Knotenpunkt zahlreicher zellulärer Signalkaskaden und ist ein wichtiger stromabwärts gelegener Effektor der Phosphoinositid-3-Kinase, welcher sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Zellen eine wichtige Rolle spielt (Engelman et al., 2009; Manning et al., 2007; Franke et al., 2008). Das AKT Protein spielt für die Regulation von Zellproliferation, -überleben, und -größe, sowie für den Glucosemetabolismus und die Angiogenese eine zentrale Rolle (Bellacosa et al., 2005). Eine Hyperaktivität dieses Signalweges ist in vielen Tumorarten nachgewiesen worden (Hanahan et al., 2000).



**Abb. 3:** Struktur der AKT/PKB Isoforme in humanen Zellen. Die Zeichnung verdeutlicht außerdem die Serin u. Threonin Aktivierungstellen der jeweiligen Isoforme (Song et al., 2005).

## 2.3 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des mTOR/p70-S6K1/AKT Signalweges im CRC-, CRLM-, Adenom-, und Enteritid-Gewebe. Untersucht wurde das Expressionsprofil von mTOR, S6K1 und AKT auf RNA- und Proteinebene in den erwähnten Entitäten. Ferner wurde analysiert, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression des mTOR/S6K1/AKT Signalweges und verschiedenen klinischen sowie pathologischen Parametern bei CRC-Patienten gibt. Dazu wurden insgesamt 63 Gewebeproben auf der RNA- und Proteinebene isoliert und hinsichtlich der Expression von mTOR, S6K1 und AKT untersucht.

## 3. Material und Methodik

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Combitips	Eppendorf
ELISA-Platten, 96-Well Reaktions Platte	R&D Systems
ELISA-Plattenfolie	R&D Systems
Küvette, UVette®	Eppendorf
MicroAmp® Optical 96-Well Reaktions Platte	Applied Biosystems
Minisart® plus Spritzenvorsatzfilter	Sartorius
PCR-Reaktionsgefäße, 0.2 ml	VWR International GmbH
Pipettenspitzen (0.1-100/200/1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH
Reaktionsgefäße/Eppis (1.5/2 ml)	Eppendorf
Ritips® professional	Ritter GmbH
Serological Rotilabo® Pipetten (10/15/25ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Sterile Einmalspritzen	HSW

Zentrifugen R�hrchen (15/50 ml)	VWR International GmbH
---------------------------------	------------------------

**Tab. 1:** Verbrauchsmaterialien

### 3.1.2 Instrumentarien

Instrument	Hersteller
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems®
Abzugshaube	K�ttermann GmbH
Dispergierger�t Ultra-Turrax �T8	IKA® -Werke GmbH Co. KG
Herafreeze HFU-Basic Serie, -86�C	Heraeus
Incubator (37 �C; 5,0 % CO2) NuncTM	RS Biotech
Multipette® Plus	Eppendorf
NanoDrop 8000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Photometer	Eppendorf
Photometer, Mikroplatten-Reader ELx800	BioTek Instruments
Pinzetten	Carl Roth GmbH + Co KG
Pipetten (10/20/200/1000�l)	Eppendorf
Pipettierhelfer, Accu-Jet® Pro	VWR International GmbH
RCT basic	IKA® -Werke GmbH Co. KG
Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH + Co KG
SimpliAmp™ PCR-Cycler	Applied Biosystems®
Vortex Labdancer S40	VWR International GmbH
Vortex REAX 2000	Heidolph
Waage	Sartorius AG
Zentrifuge, Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Zentrifuge, Zentrifuge 5810R	Eppendorf

**Tab. 2:** Instrumentarien

### 3.1.3 Chemikalien/ Biochemikalien

Produkt	Hersteller
Bacillol®	Bode Science
BSA (1%)	R&D Systems TM
Destilliertes Wasser	VWR
EDTA	Carl Roth®
Ehtanol (70%, 99%)	Sigma-Aldrich®
HPLC-H2O	VWR
NaF	Merck KGaA
PBS	life technologic
ProteaseArrest™	G-Biosciences
RIPA Lysis & Extraction Buffer	G-Biosciences
RNase-Free Water	QIAGEN
SDS-Lösung	Amersco®
Streptavidin-HRP	R&D Systems TM
Triton X-100	Carl Roth®
Tween (0,05%)	Carl Roth®
Urea	Carl Roth®

**Tab. 3:** Chemikalien/ Biochemikalien

### 3.1.4 Angewendete Sets

Set	Hersteller
BCA TM Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
DuoSet® IC für Phospho-AKT (S473)	R&D Systems TM
DuoSet® IC für Phospho-p70 S6 Kinase (T389)	R&D Systems TM
DuoSet® IC für Phospho-TOR (S2448)	R&D Systems TM
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems™

RNeasy® Mini Kit	QIAGEN	
TaqMan® Master Mix	Gene Expression	Applied Biosystems™

**Tab. 4:** Angewendete Sets

### 3.1.5 Assay on Demand

Assay on Demand	Hersteller	Identifikationsnummer
mTOR	Thermo Fisher Scientific	HS00234508_M1
AKT	Thermo Fisher Scientific	HS00178289_M1
p70sk61	Thermo Fisher Scientific	HS00923433_M1
pmm1	Thermo Fisher Scientific	HS00160195_M1

**Tab. 5:** Assay on Demand

### 3.1.6 Software

Software	Hersteller
SPSS	IBM
Excel	Microsoft

**Tab. 6:** Software

### 3.1.7 Auswahl des Patientenkollektivs

Alle Gewebeproben wurden während der Operation entnommen und in der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie der Universität des Saarlandes bei – 80°C gelagert. Es wurde pathologisches sowie das dazugehörige gesunde Tumornachbargewebe entnommen und bei – 80°C gelagert. Es liegt sowohl die Einverständniserklärung der Patienten als auch die Zustimmung der örtlichen Ethikkommission, der Ärztekammer des Saarlandes, vor.

Hierbei wurden insgesamt 63 Gewebeproben untersucht: 20 Kolorektale Karzinome (Primärtumor Kolon n = 10, Primärtumor Rektum n = 10), 19 Lebermetastasen, 15 Enteritiden und 9 Adenome. Über das Alter zum Zeitpunkt der Operation, das Geschlecht der Patienten, TNM-Stadium und Grading sowie weitere untersuchte Parameter geben die Tabellen 7 bis 10 Auskunft:

<b>Charakteristik</b>	<b>CRC (n=20)</b>
Lokalisation des Primärtumors	
Kolon	10
Rektum	10
Geschlecht	
Männlich	13
Weiblich	7
Alter bei OP	
Durchschnitt	68,8
Intervall	55-80
TNM-Stadium	
I+II	7
III+IV	13
Grading	
G1	–
G2	12
G3	2
G4	–
Lymphknotenmetastasen	
positiv	7
negativ	13
Invasion in Venen	
V0	6
V1	3
k.A	11

Weitere Erkrankung	
Arterielle Hypertonie	7
Adipositas	2
Diabetes mellitus	2
Anämie	2
KHK	1
Osteoporose	1

**Tab. 7:** Patienten mit Kolorekalem Karzinom

<b>Charakteristik</b>	<b>CRLM (n=19)</b>
Primarius	
Kolon-CA	12
Rektum-CA	7
Geschlecht	
Männlich	10
Weiblich	9
Alter bei OP	
Durchschnitt	62,9
Intervall	51-74
Chemotherapie	
Positiv	7
k.A	12
Weitere Erkrankung	
Arterielle Hypertonie	5
Diabetes mellitus	2
KHK	2
Adipositas	1

**Tab. 8:** Patienten mit Lebermetastasen

<b>Charakteristik</b>	<b>Adenom (n=9)</b>
Ursprung	
Kolon	3
Rektum	2
Tubulovillöses	4
Geschlecht	
Männlich	6
Weiblich	3
Alter bei OP	
Durchschnitt	64,1
Intervall	45-75
Chemotherapie	
Positiv	1
k.A.	8
Weitere Erkrankung	
Diabetes mellitus	1

**Tab. 9:** Patienten mit Adenom

<b>Charakteristik</b>	<b>Enteritiden (n=15)</b>
Art der Entzündung	
Divertikulitis	3
Colitis Ulcerosa	7
Morbus Crohn	5
Geschlecht	
Männlich	7
Weiblich	8
Alter bei OP	
Durchschnitt	48,3
Intervall	23-78
Weitere Erkrankung	
Diabetes mellitus	1

Adipositas	1
Arterielle Hypertonie	1

**Tab. 10:** Patienten mit Enteritiden

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Proteinisolation

In diesem Analyseschritt wurde für jeweils eine Probe zwischen 80 und 100mg Patientengewebe entnommen und zu 1ml RIPA Lysis & Extraction Puffer hinzugefügt. Das RIPA Lysis & Extraction Puffer soll hierbei eiskühlt verwendet werden. Im nächsten Schritt wurden 10µl ProteaseArrest™ hinzugefügt. ProteaseArrest™ umfasst sowohl reversible, als auch irreversible Protease Inhibitoren, um Serin, Cystein und andere Proteasen zu hemmen, womit über 95% dieser Proteasen inhibiert werden. Anschließend wurde mit dem Ultra Turrax homogenisiert, wobei zwischen den einzelnen Gewebeproben gründlich gespült wurde, um Verunreinigungen vermeiden. Die Proben wurden danach 5 bis 15 min auf Eis gelagert und periodisch mit der Pipette durchmischt. Im nächsten Schritt wurden die Proben 15 min, bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppis überführt und bei –20°C gelagert.

### 3.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Als nächstes wurde die Gesamt Protein Konzentration mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits von Pierce bestimmt. Diese Methode basiert auf einer farbmetrischen Detektion und Quantifizierung der Bicinchonsäure (BCA). Da  $\text{Cu}^{2+}$  -Ionen in einer alkalischen Lösung zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen durch Proteine reduziert werden, kann anhand dieser gebildeten  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen die Konzentration bestimmt werden. Diese Reaktion bildet eine Violett Färbung, die durch die Chelation von zwei BCA Molekülen und einem  $\text{Cu}^{1+}$ -Ion zustande kommt. Diese Farbreaktion wird nun photometrisch bei

einer Wellenlänge von 562nm gemessen, wobei die Absorption proportional zur Proteinkonzentration der Lösung erfolgt.

Neben dieser relativen Konzentrationsbestimmung erfolgte auch eine absolute Bestimmung des Proteingehaltes der einzelnen Proben mit Hilfe der Messung einer Verdünnungsreihe einer Bovine-, Serum-, Albumin (BSA)-Standardlösung bekannter Konzentration im Bereich von 0,025 bis 2 mg/ml (Tabelle5). Mithilfe, der so ermittelten Eichgerade kann der Gesamtproteingehalt der jeweiligen Proben ermittelt werden. Im ersten Schritt wurden die Proteinlösungen (10µl) im Verhältnis 1:5 und 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und auf die 96-Well Platte aufgetragen. Danach wurde eine Mischung aus BCA (19,2ml) und Kupfer(II)-sulfat (380µl) angesetzt und 200µl zu jedem Well hinzu pipettiert. Anschließend wurde die 96-Well Platte für 30 Sekunden geschüttelt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Im letzten Schritt wurde die Platte auf Raumtemperatur gebracht und mit dem Mikroplatten-Reader ELx800 die Absorption bei 562nm gemessen.

Konzentration der BSA-Lösung	Zusammensetzung
2 mg/ml	unverdünnt
1.5 mg/ml	25 µl Aqua dest. + 75 µl BSA (2 mg/ml)
1 mg/ml	50 µl Aqua dest. + 50 µl BSA (2 mg/ml)
0.75 mg/ml	50 µl Aqua dest. + 50 µl BSA (1.5 mg/ml)
0.5 mg/ml	50 µl Aqua dest. + 50 µl BSA (1 mg/ml)
0.25 mg/ml	50 µl Aqua dest. + 50 µl BSA (0.5 mg/ml)
0.125 mg/ml	50 µl Aqua dest. + 50 µl BSA (0.25 mg/ml)
0.025 mg/ml	90 µl Aqua dest. + 10 µl BSA (0.25 mg/ml)

**Tab. 11:** Verdünnungsreihe bekannter Konzentration

### 3.2.3. Gesamt-RNA-Isolation

Zur Isolation der Gesamt RNA einer Gewebeprobe wurde das miRNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Dieses System kombiniert eine Phenol/Guanidin Lysis Mischung

mit einer Silica Membran, welche eine selektive Bindefähigkeit für RNA besitzt. Das zugrunde liegende Prinzip dieser Methode beruht auf der spezifischen Bindung von RNA an eine Silikatmembran und der Geschwindigkeit der Mikrospintechnologie. Die Qiazol Lysis Flüssigkeit, welches Guanidin und Thiocyanate enthält, dient dem Homogenisieren der Gewebeproben (maximal 50mg je Probe). Dabei werden auch RNasen inhibiert, so dass die RNA vollständig isoliert werden kann. Nach Hinzufügen von Chloroform und anschließendem Zentrifugieren bilden sich eine obere wässrige, eine zwischen-, und eine untere organische Phase. Die obere Phase enthält die RNA, während DNA vorwiegend in der mittleren und Proteine in der unteren Phase zu finden sind. Nach Abpipettieren der oberen Phase wurde Ethanol hinzugefügt, um optimale Bedingungen für die Bindung der RNA an die Silikatmembran zu schaffen, sofern es sich um RNA-Moleküle mit mindestens 18 Nukleotiden handelt. Anschließend wurde die Probe auf die RNeasy Mini Säule gegeben. Nur die RNA kann effektiv an die Silika Membran binden, während andere Bestandteile effizient ausgewaschen werden. Abschließend wird die RNA in 50µl RNase freiem Wasser gelöst und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **Durchführung:**

Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde das Turrax Gerät desinfiziert, um Verunreinigungen zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurde einmal mit 10 % SDS-Lösung und viermal mit HPLC Wasser gereinigt.

1. Turrax reinigen.
2. 700µl QIAzol Lysis Reagenz in Eppendorf-Gefäße pipettieren.
3. Probenmaterial dispergieren und homogenisieren.
5. Zentrifugieren für 3 min bei 14000 rpm und Raumtemperatur.
6. Obere Phase umpipettieren.
7. Zugabe von 150µl Chloroform.
8. Mit dem Vortex 15 sec mischen.
9. Zentrifugieren für 15 min bei 12000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$ .

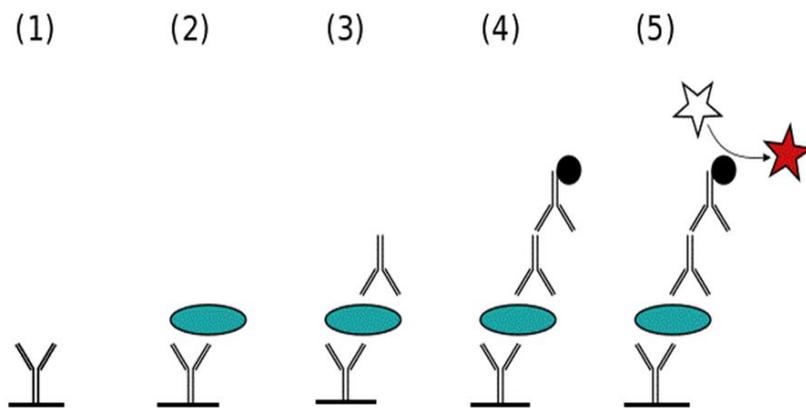
10. Abnahme der oberen RNA enthaltenden Phase und Zugabe von 100%igem Ethanol.
12. Lysat/Ethanol Gemisch direkt auf die Säule geben, maximal 700 µl.
13. Nach kurzer Zentrifugation (20 sec) bei 10.000 rpm und Raumtemperatur (RT). Durchfluss verwerfen und die Säule in ein neues Sammeltube überführen.
14. Rest des Lysat/Ethanol Gemisches auf die Säule geben.
15. Nach einer weiteren Zentrifugation für 20 sec bei 10.000 rpm und RT, den Durchfluss wiederum verwerfen und in ein neues Sammeltube überführen.
16. Zugabe von 700µl Buffer RWT. Zentrifugieren für 20 sec bei 10.000 rpm und RT. Durchfluss verwerfen.
17. Zugabe von 500µl Buffer RPE. Zentrifugieren für 20 sec bei 10.000 rpm und RT. Durchfluss verwerfen. Einmalige Wiederholung.
19. Erneute Zugabe von 500µl Buffer RPE. Zentrifugieren für 2 min bei 10.000 rpm und RT. Durchfluss verwerfen.
20. Säule bei 10000 rpm für 1 min abzentrifugieren.
21. Säule in frische Sammelgefäß stellen.
22. 50µl RNase freies Wasser direkt auf die Säule geben.
23. 1 min ruhen lassen.
24. 1 min Zentrifugieren bei 10.000 rpm.
25. Eluat bei -80°C bewahren.

### **3.2.4 ELISA**

Ein ELISA-Test eignet sich, um herauszufinden, ob und in welcher Menge eine bestimmte Substanz (Proteine, Viren, Hormone, Toxine und Pestizide) in einer Probe (Blutserum, Urin etc.) vorhanden ist. Es ist ein immunologischer Test (Antikörper-Antigen-Komplex), welcher auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht.

Es gibt mehrere ELISA-Techniken, wobei in dieser Arbeit die sog. Sandwich Methode angewendet wurde. Hierbei verwendet man zwei Antikörper, die jeweils an andere Epitope des Antigens binden. Der erste Antikörper (AK1, sog. coating antibody) wird an eine feste Oberfläche, meist an eine spezielle Mikrotiterplatte, gebunden. Nun wird die Probe in die wells der Mikrotiterplatte pipettiert, wodurch es zu einer Antikörper-Antigen-Komplexbildung kommt. Danach wird die Probe

inkubiert. Anschließend werden die nicht gebundenen Antikörper oder andere Bestandteile herausgewaschen. Ein zweiter, mit Biotin markierter monoklonaler Antikörper (AK2, sog. detection antibody) wird hinzugegeben und mit der Probe inkubiert. Jetzt bilden sich Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe. In einem dritten Inkubationsschritt wird das Biotin des AK2 durch ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat gebunden. Das Substrat 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin wird durch die Peroxidase oxidiert. Dies führt zu einer blauen Farbreaktion (Abb. 4). Durch Schwefelsäure (0,25 M) wird die Farbreaktion gestoppt. Mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann die Probe photometrisch bei 450 nm gemessen werden. Die Farbreaktion ist dabei proportional zur Antigen-Konzentration der Probe. Zur quantitativen Bestimmung der Ergebnisse werden Standardproben mit bekannter Konzentration des Antigens ermittelt und daraus eine Standardkurve erstellt.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung ELISA. (1) AK1-coat-antibody, am Boden der Mikrotiterplatte gebunden, (2) Zugabe der Probe und Inkubation, (3) Zugabe des AK2, (4) Zugabe und Komplexbildung des Enzym-gebundenen Antikörper-Antigen-Antikörpers, (5) Zugabe eines zum Enzym passenden Substrats, das zu einem nachweisbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird.

## Durchführung:

Für die Untersuchung des Phospho-AKT, Phospho-P70 S6 Kinase und Phospho-TOR Gens wurde das DuoSet® IC von R&D Systems verwendet. Im Ersten Schritt wird die ELISA-Platte mit 100µl Primärantikörper (AK1) beschichtet (Coating). Die Antikörper werden zunächst mit PBS auf eine Konzentration von 6µl/ml verdünnt. Anschließend wird bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Im zweiten Schritt wird die ELISA-Platte dreimal mit Waschpuffer gereinigt und abgeklopft. Nachfolgend erfolgt die Absättigung, hier werden pro Well 300µl des Blockpuffers pipettiert und über Nacht bei Raum Temperatur inkubiert. Danach wird Schritt zwei wiederholt. Nun werden die Proben 1:3 mit IC Diluent #3 (bei Phospho-TOR IC Diluent #4) verdünnt und je 100µl einheitlich pro Well pipettiert. Für den Standard ist eine Höchstkonzentration von 10ng/ml (für das Phospho-P70 S6 Kinase 20ng/ml) vorgesehen. Diese wird dann 1:2, 1:4, 1:8 usw. mit IC Diluent #3 verdünnt. Proben und Standardreihe werden immer im Doppelansatz pipettiert. Die Platte wird wiederholt über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gewaschen. Nun werden 100µl des Sekundärantikörpers (AK2) hinzugefügt. Dieser wird vorher mit IC Diluent #1 auf eine Ausgangskonzentration von 0,4µg/ml verdünnt. Erneut wird über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und danach gewaschen. Im nächsten Schritt wird Streptavidin-HRP 1:200 mit IC Diluent #1 verdünnt und zu je einem well mit 100µl pipettiert (Konjugatzugabe). Nach 20min Inkubation ohne Lichteinstrahlung erfolgt ein letzter Waschschrift. Nun werden 100µl des Substrats pro Well pipettiert und der Reaktion erneut 20 min Zeit ohne Lichteinstrahlung gegeben(Substratzugabe). Im letzten Schritt erfolgt das Abstoppen der Farbreaktion. Hierzu werden 50µl der Stopplösung in jedes Well pipettiert und bei 450nm photometrisch gemessen. Über die genauere Zusammensetzung der einzelnen Lösungen des DuoSet® IC Systems gibt Tab. 6 Auskunft.

Name	Zusammensetzung
Blockpuffer	1% BSA in PBS, dann steril filtrieren
IC Diluent #1	Entspricht Blockpuffer

IC Diluent #3	1mM EDTA, 0,5 Triton X-100, 5mM NaF, 1M Urea in PBS
IC Diluent #4	1mM EDTA, 0,5 Triton X-100 in PBS
IC Diluent #7	1mM EDTA, 0,5 Triton X-100, 5mM NaF, 6M Urea in PBS
IC Diluent #8	1mM EDTA, 0,5 Triton X-100, 5mM NaF in PBS
Stopplösung	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Substratlösung	1:1 Mischung aus H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und Tetramethylbenzidine
Waschpuffer	0,05% Tween in PBS

**Tab. 12:** Lösungen DuoSet® IC

### 3.2.5 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsmessung der Ribonukleinsäure erfolgt photometrisch und basiert auf der Extinktion der Stickstoff-Basen. Die Messung wird sowohl bei 260nm als auch bei 280 nm durchgeführt. Mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes wird daraus die Konzentration berechnet. Zur Beurteilung der Reinheit der RNA wurde der Quotient aus der Absorption bei 260nm und der Absorption bei 280nm herangezogen, wobei ein Wert um 2,0 für eine hohe Reinheit der RNA spricht. Außerdem wird ein zweiter Quotient von 260nm zu 230nm bestimmt. Hier spricht ein Wert von 1,80 für einen hohen Reinheitsgrad der Probe. Das Photometer wird zunächst mithilfe von RNase freiem Wasser kalibriert und gesäubert, bevor dann max. (einheitlich) 8 Proben gleichzeitig gemessen werden können. Dazu werden jeweils 2 µl jeder Probe pipettiert und mithilfe des NanoDrop 8000 Spectrophotometers gemessen. Die Ergebnisse werden gespeichert und für die cDNA-Synthese weiterverwendet.

### 3.2.6 cDNA-Synthese

Um die Genexpression mittels einer quantitativen Real Time PCR (qRT-PCR) durchzuführen, muss die isolierte RNA zunächst in complementary-DNA (cDNA)

umgeschrieben werden. Mithilfe der sog. Reverse Transkriptase (RT) kann die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dazu benötigt die RT einen Primer, welcher am 3'Hydroxyl-Ende der RNA bindet. Der Random Primer ist ein Hexamer-Oligonukleotid, welches aus sechs zufällig zusammengesetzten Nucleotiden besteht. Ferner benötigt man für die Synthese noch Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP Mix) und einen geeigneten Puffer (RT Buffer). Die Konzentration der verwendeten RNA wird vor jedem neuen Reaktionsansatz gemessen, da sich die Konzentration nach jedem Auftauvorgang verringert. Anschließend muss das benötigte Volumen berechnet werden, in dem 1µg RNA enthalten ist. Dieses Volumen soll mit RNase freiem Wasser immer 14,2µl ergeben, d.h. das berechnete RNA Volumen wird zum Mastermix gegeben und mit HPLC Wasser auf 20 µl aufgefüllt (Tabelle7). Der cDNA Ansatz enthält je Probe 2µl RT Puffer, 0,8µl dNTP, 2µl Random Primer und 1µl RT. Zusätzlich wird eine RNA freie Probe pipettiert, um den Reinheitsgrad der Proben und damit eine Verunreinigung auszuschließen. Daraus ergibt sich ein Endvolumen von 20µl bei einer einheitlichen Konzentration von 50ng/µl, wodurch die Proben untereinander verglichen werden können. Mithilfe des SimpliAmp™ PCR-Cycler wird abschließend die cDNA-Synthese durchgeführt. Die Synthese erfolgte unter folgenden Reaktionsbedingungen: 10min bei 25 °C, 120min bei 37°C und 5min bei 85°C. Nach der Synthese werden die Proben bei -20°C gelagert.

<b>Komponente</b>	<b>Menge/Volumen</b>
RT Puffer	2 µl
dNTPs	0,8 µl
Oligo dT-Primer	2 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
Eingesetzte RNA	1 µg
HPLC-Wasser	ad 20 µl

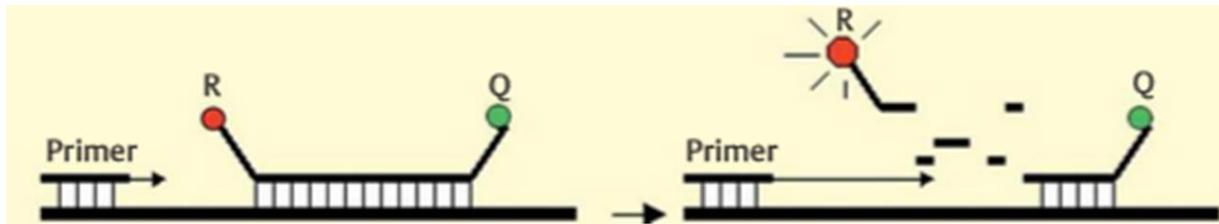
**Tab. 13:** cDNA Ansatz

### 3.2.7 PCR

Dieses Verfahren ermöglicht es, eine Vielzahl identischer Kopien eines DNA-Abschnitts herzustellen. Dazu werden zusätzlich zur DNA auch Nucleotide, hitzebeständige DNA-Polymerasen und spezifische Primer benötigt. Im ersten Schritt wird die DNA auf 90°C erhitzt, um die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Ketten in Einzelstränge aufzutrennen (Denaturierung). Nun wird die Temperatur auf 65°C abgekühlt, damit es zu einer spezifischen Anlagerung der Primer (sog. Primer annealing) an das 3'-Ende der DNA-Einzelstränge kommt. Im letzten Schritt wird eine optimale Temperatur für die DNA-Polymerase geschaffen. Die Polymerase beginnt an den Primern von 3' nach 5' mit der Anlagerung komplementärer Basen (Elongation). Dadurch entstehen aus einer Matrizen DNA zwei identische Tochterstränge. Dieser Vorgang wird kann beliebig oft wiederholt werden. Dabei steigt die Anzahl der neugebildeten DNA-Abschnitte exponentiell an.

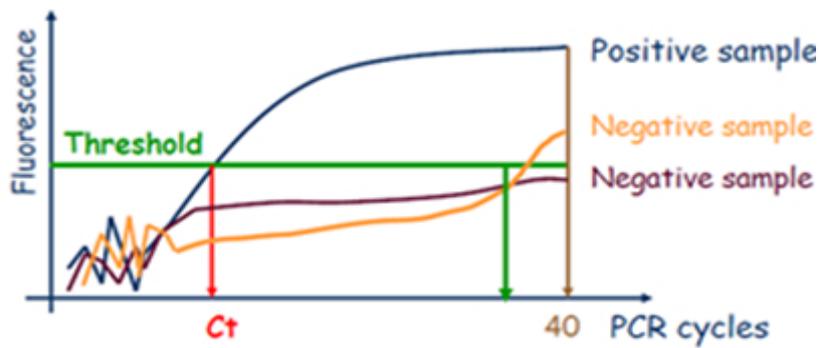
### 3.2.8 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung in Echtzeit, also in „real time“ bietet. Mit der qRT-PCR lassen sich Aussagen über die differenzielle Expression von mRNAs treffen. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz Farbstoffen, wie z.B. dem SYBR-Green, am Ende oder während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Die Farbstoffe sind an einer sequenzspezifischen Hybridisierungssonde, welche an ihrem 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff und an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff markiert ist, gekoppelt. Die Fluoreszenz des Reporters (R) wird bei intakter Sonde durch einen Quencher (Q) unterdrückt. Hierbei hybridisiert die Sonde zunächst mit dem komplementären DNA-Strang und wird dann bei der Elongation der Taq-Polymerase abgebaut. Der abgespaltene Reporter kann fluoreszieren (Abb. 5). Die Fluoreszenz nimmt dabei mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht (Holzapfel et al., 2007)



**Abb. 5:** Schematische Darstellung qRT-PCR: R=Reporterfarbstoff Q=Quencher

Die Auswertung erfolgt über den Cycle Threshold (Ct-Wert= Schwellenwert-Zyklus). Der Ct-Wert beschreibt den Anfang des exponentiellen Wachstums, bei dem die Fluoreszenz erstmals über den Hintergrundwert ansteigt (Abb. 6). Dieser tritt erst ab einer bestimmten Zyklenzahl auf, denn während der ersten Zyklen treten keine messbaren Ergebnisse auf. Je größer die Menge an DNA, desto schneller wird der Ct-Wert erreicht. Ein Vergleich des Ct-Werts zweier Proben zeigt, welche vor der Vermehrung mehr DNA bzw. RNA enthielt. Generell gibt es zwei Arten der Quantifizierung, die absolute und die relative Quantifizierung. Die absolute Quantifizierung wird nur selten angewendet, da diese relativ aufwendig und die Ergebnisse fragwürdig sind. Bei der relativen, Quantifizierung, welche auch hier verwendet wurde, wird eine sog. interne Kontrolle benötigt. Dafür werden z.B. Haushaltsgene benötigt. In dieser Arbeit wurde das Phosphomannomutase 1 (PMM1) verwendet. PMM1 kommt in allen eukaryotischen Zellen vor und für das Überleben dieser Zellen von immenser Bedeutung. Im Gegensatz zu den regulierten Genen, werden die Haushaltsgene unabhängig von Zelltyp, Zellstadium, Krankheit und äußeren Einflüssen exprimiert. Die Gesamtanalyse beruht somit auf diesem Signal.



**Abb. 6:** Ct-Wert

### Durchführung:

Um die Ct-Werte untereinander vergleichbar zu machen, wurde mit einer ausgewählten Probe eine Standardlösung angesetzt. Diese Probe zeichnete sich durch ihre besondere Reinheit aus ( $280/260=2,04$  /  $260/230=1,98$ ). Dazu wurde eine erneute cDNA-Synthese mit einer Konzentration von  $50\text{ng}/\mu\text{l}$  durchgeführt. Der cDNA-Ansatz enthielt je Probe  $10\mu\text{l}$  RT Puffer,  $4\mu\text{l}$  dNTP,  $10\mu\text{l}$  Random Primer und  $5\mu\text{l}$  RT. Zusätzlich wurde eine NoRT Kontrolle angesetzt, die alle Komponenten außer RNA enthält. Danach wurden alle Proben gevortext und zentrifugiert.

Mithilfe des SimpliAmp™ PCR-Cycler wurde anschließend die cDNA-Synthese durchgeführt. Die Synthese erfolgte unter folgenden Reaktionsbedingungen: 10 min bei  $25^\circ\text{C}$ , 120min bei  $37^\circ\text{C}$  und 5min bei  $85^\circ\text{C}$ . Nach der Synthese wurden die Proben bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Für die Taq-Man Platte wurden zunächst die cDNA-Proben, der Assay on Demand (AoD) und der Mastermix (TaqMan® Gene Expression Master Mix) komplett auf Eis aufgetaut. Für den Mastermixansatz wurden je Doppelprobe  $21\mu\text{l}$  TaqMan® Gene Expression Master Mix,  $2,1\mu\text{l}$  AoD und  $16,8\mu\text{l}$  HPLC-Wasser zusammen pipettiert. Dazu wurden dann  $2,1\mu\text{l}$  cDNA der jeweiligen Proben und zusätzlich  $2,1\mu\text{l}$ , für eine NORT-, und NT-Probe hinzu pipettiert. Dies ergab eine Gesamtmenge von  $40\mu\text{l}$ . Der Standard wurde immer frisch angesetzt. Der Pipettieransatz für den Standard ist aus Tab.14 zu entnehmen. Zu jedem Standard wurden  $21\mu\text{l}$  TaqMan® Gene Expression Master Mix und  $2,1\mu\text{l}$  AoD hinzu pipettiert. Anschließend wurden die Experimente mit dem Haushaltsgen PMM1 durchgeführt.

	<b>STD 1</b>	<b>STD 2</b>	<b>STD 3</b>	<b>STD 4</b>	<b>STD 5</b>	<b>STD 6</b>
<b>cDNA</b>	10,5 µl aus 50ng/µl	4,2 µl aus 50ng/µl	2,1 µl aus 50ng/µl	2,1 µl aus 25ng/µl	2,1 µl aus 5ng/µl	2,1 µl aus 1ng/ µl
<b>HPLC- H2O</b>	8,4 µl	14,7 µl	16,8 µl	16,8 µl	16,8 µl	16,8 µl

**Tab.14:** Pipetieransatz für Standardmessung

Alle Proben wurden danach gevortext und zentrifugiert (20 sec bei 5000 rpm). Die Proben und der STD wurden in Duplikaten (20µl pro Well) auf eine 96-Well Platte pipettiert. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Wells keine Luftblasen enthalten. Anschließend wurde die Platte mit einer Klebefolie verschlossen und bei 1000 rpm für 5min zentrifugiert. Zuletzt wurde die Platte in einem 7900HT Fast Real-Time PCR System inkubiert und das Programm gestartet. Genauere Informationen über den Ablauf des Programms liefert Tab.15.

Step	Enzyme Aktivation	PCR	
	HOLD	Cycle (40 Cycles)	
		Denature	Anneal/extend
Temp (°C )	95°C	95°C	60°C
Time	10 min	15 sec	60 sec

**Tab. 15:** qRT-PCR Programm im 7900HT Fast Real-Time PCR System

### 3.2.9 Statistik und Auswertung

Die Statistische Analyse der Proben erfolgte mit der SPSS-Software von IBM. Es wurden Mittelwerte (MW) und dessen Standardfehler (Stdfehler) berechnet.

Abhängig von der Normalverteilung der Proben wurde entweder der Wilcoxon-Test oder der t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Bei  $P < 0,05$ , wurden die Werte als signifikant eingestuft. Für die Proteinebene haben wurde die Proteinisolation, die Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung und das ELISA Verfahren durchgeführt. Die Ergebnisse wurden wie folgt zusammensetzt: Zunächst wurde der Mittelwert aus der 1:5 und 1:10 Verdünnung der BCA Bestimmung für die jeweiligen Proben berechnet (in  $\mu\text{g/ml}$ ). Anschließend wurde das ELISA-Ergebnis der jeweiligen Probe (pg/ml) in Bezug auf 1mg Gesamtproteinmenge gesetzt. Für die RNA-Ebene wurde nach Umschreibung der RNA in cDNA, die qRT-PCR der Zielgene im Vergleich zu einem entsprechenden Haushaltsgen durchgeführt. Dabei wurden die ct-Werte verglichen.

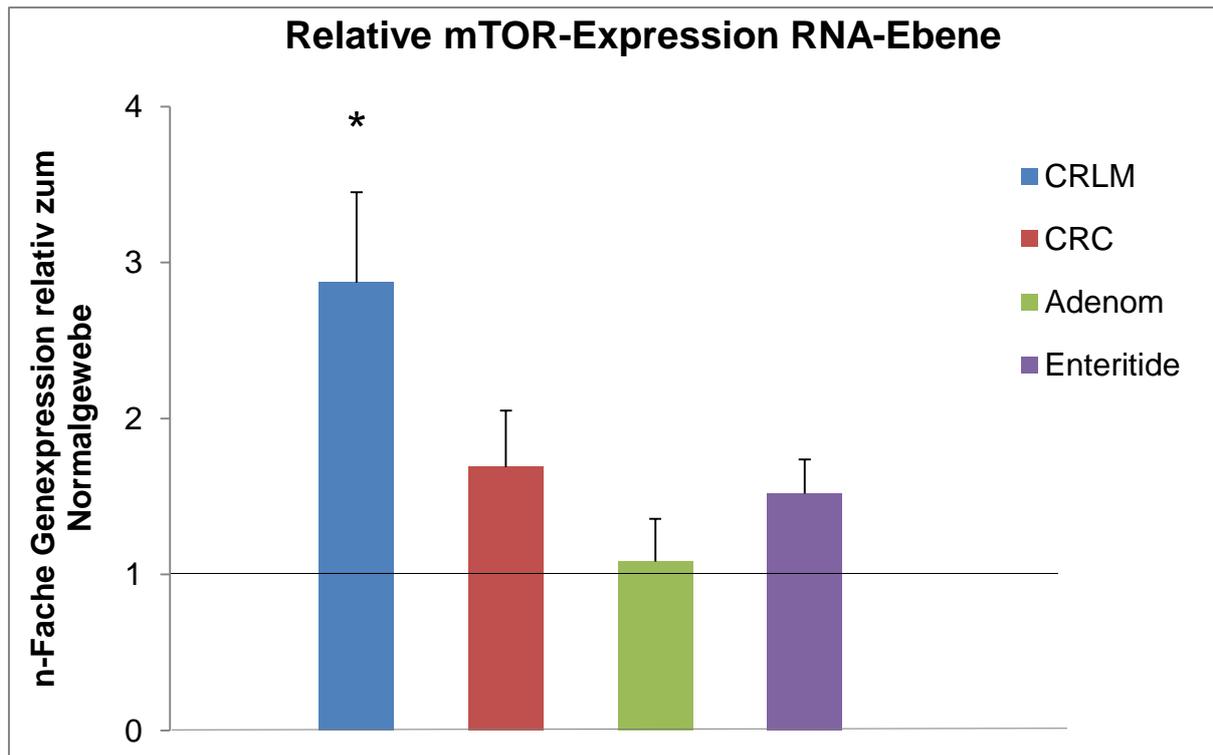
#### **4. Ergebnisse**

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression verschiedener Effektoren des mTOR Signalweges in menschlichen Gewebeproben von verschiedenen gastrointestinalen Tumorentitäten und prämaligen Vorstufen auf RNA und Proteinebene zu analysieren. Die mTOR Kinase ist die aktive Komponente des mTOR Komplex 1 (TORC1) und 2 (TORC2). Eines der stromabwärts gelegenen Zielgene von mTORC1 ist die p70S6 Kinase, die nach Phosphorylierung durch TORC1 aktiviert wird und eines der stromabwärts gelegenen Ziele von mTORC2 ist AKT. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die mTOR- Expression sowie die Expression seiner stromabwärts gelegenen Ziele, S6K1 und AKT untersucht. Es wurden insgesamt 63 Gewebeproben in die Untersuchung eingeschlossen. Diese umfassten 20 Kolorektale Karzinome (CRC), 19 Kolorektale Lebermetastasen (CRLM), 15 Enteritiden und 9 Adenome. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Expression dieser Gene im jeweiligen pathologischen und benachbarten normalen Gewebe auf RNA Ebene mittels Real Time PCR (qRT PCR) untersucht. Anschließend wurde ihre Expression auf der Proteinebene mittels ELISA analysiert.

## 4.1 RNA-Ebene

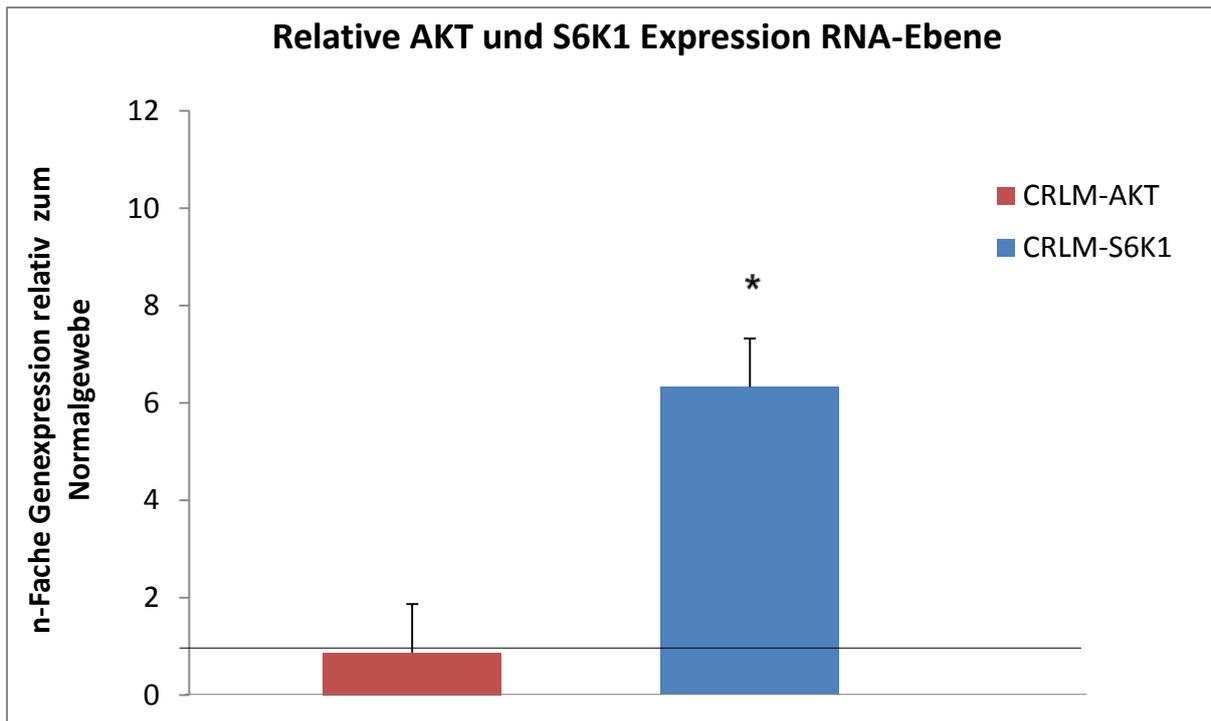
Der Einsatz der qRT-PCR erlaubt eine vergleichende Quantifizierung der Genexpression. Zu dieser vergleichenden Analyse ist eine Normalisierung mit Hilfe eines Referenzgens erforderlich, dessen Expression in allen untersuchten Proben stabil ist und nur geringfügigen Schwankungen unterliegt. Ein solches Haushaltsgen stellt PMM1 dar, das wir in unseren Untersuchungen zur Normalisierung eingesetzt haben. Um unsere qRT-PCR durchzuführen, musste zunächst die entsprechende RNA isoliert und ihre Konzentration sowie ihr Reinheitsgrad bestimmt werden. Nach Umschreibung der RNA in cDNA wurde die qRT-PCR der Zielgene im Vergleich zu einem entsprechenden Haushaltsgen durchgeführt.

Während die CRC-, Adenom- und Enteritid Patientengruppen hinsichtlich der mTOR-mRNA-Expression keinen signifikanten Unterschied zwischen dem pathologischen und dem benachbarten Normalgewebe aufweisen, zeigt die CRLM-Patientengruppe eine signifikant 3-fach erhöhte mTOR-mRNA-Expression im Tumorgewebe im Vergleich zum Tumornachbargewebe ( $P < 0,005$ ), (Abb. 7). In Übereinstimmung mit einer signifikant erhöhten mTOR Expression in CRLM Patienten zeigt sich auch die Expression des stromabwärts gelegenen Zielgens von mTORC1, p70S6, im Tumorgewebe signifikant 6,3-fach erhöht im Vergleich zum Normalgewebe ( $P < 0,005$ ), (Abb. 8). Die AKT mRNA Expression ist im Tumorgewebe nicht erhöht (Abb. 8).



**Abb. 7:** Relative mTOR-mRNA-Expression in CRLM-, CRC-, Adenom-, und Enteritid-Patientengewebe. n-facher Anstieg > 1 zeigt mTORm mRNA Überexpression in pathologischem Gewebe relativ zum Normalgewebe: CRLM n = 19 (\*P<0,05), CRC n = 20, Adenom n = 9, Enteritiden n = 15.

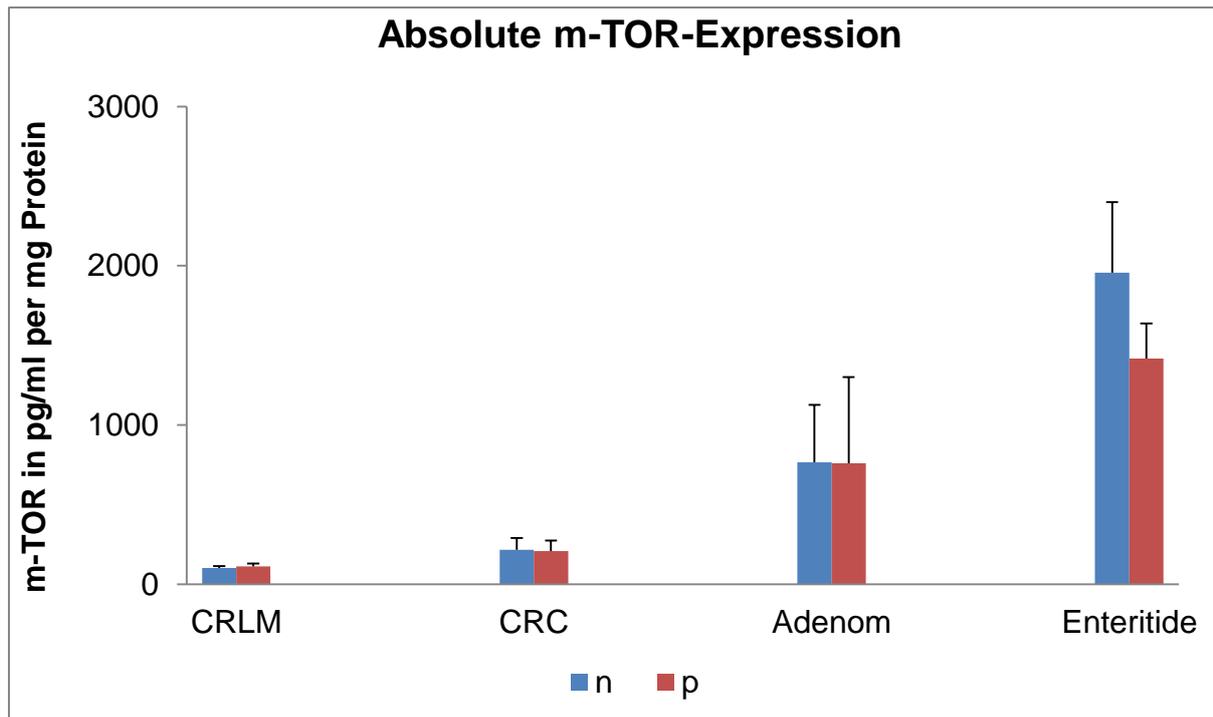
Abbildung 8 zeigt die relative AKT- und S6K1-mRNA Expression bei CRLM Patienten. Die CRLM Patienten zeigen im pathologischen Gewebe eine signifikant (P<0,005) 6,3-fach erhöhte S6K1-mRNA-Expression im Vergleich zum Tumornachbargewebe. Die AKT mRNA Expression ist im pathologischen Gewebe nicht signifikant erhöht.



**Abb. 8:** Relative S6K1- und AKT- mRNA-Expression bei Patienten mit CLRM. n-facher Anstieg > 1 zeigt S6K1 und AKT mRNA Überexpression im Tumorgewebe von CRLM Patienten im Vgl. zum jeweiligen Tumornachbargewebe. S6K1: \*P<0,05, n = 19 ; AKT n = 19.

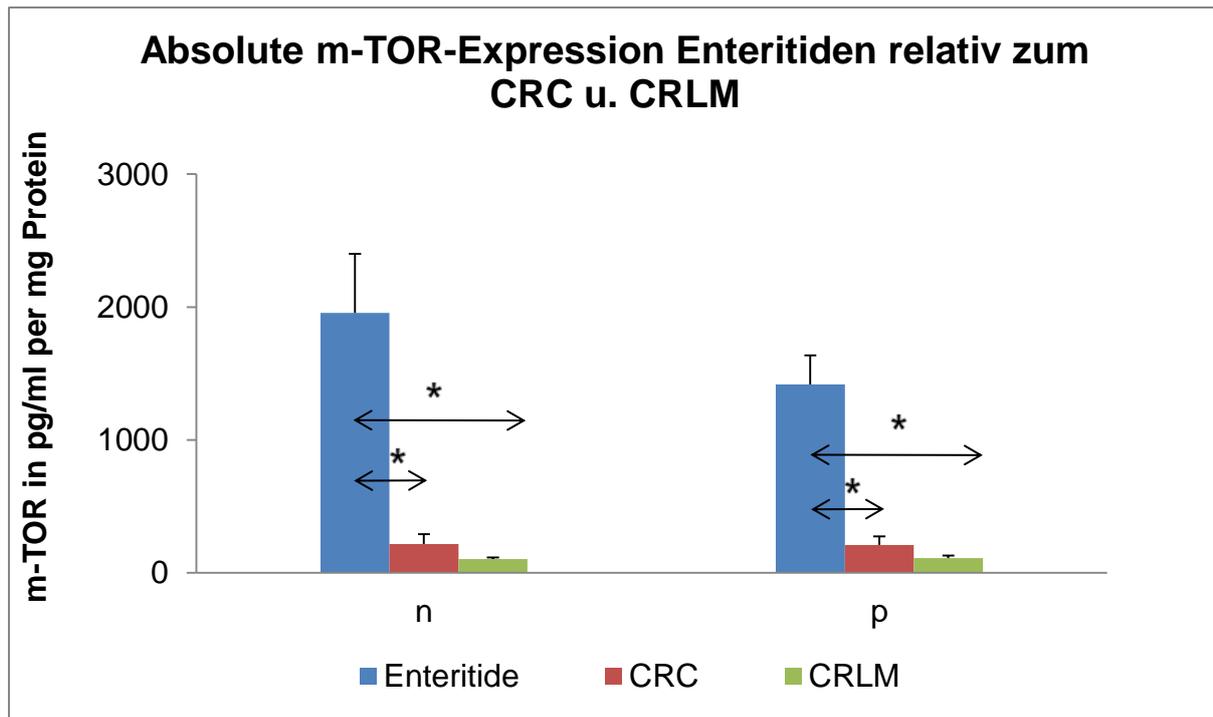
#### 4.2 Proteinebene

Nach Darstellung des mTOR mRNA Expressionsprofils in benignen und malignen kolorektalen Entitäten wurde abgeklärt, ob die Expression des mTOR Proteins mit der Expression der mTOR mRNA übereinstimmt. Zu diesem Zweck wurde die absolute mTOR Expression mittels ELISA in in CRLM-, CRC-, Adenom- und Enteritid- Patienten gemessen wie dargestellt in Abbildung 9.



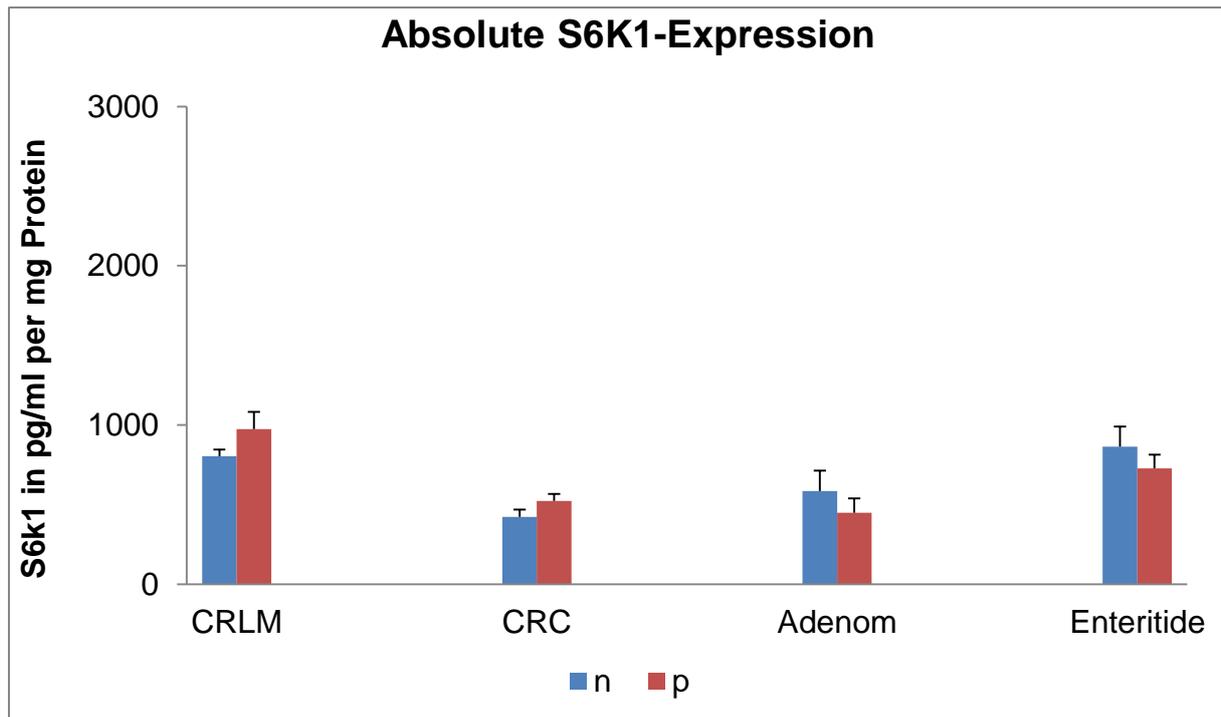
**Abb. 9:** Absolute mTOR Proteinexpression bei CRLM-, CRC-, Adenom- und Enteritid- Patienten in pathologischem Gewebe (p) und in gesundem Nachbargewebe (n). Alle Angaben in in pg/ml pro mg Gesamtprotein, CRLM n = 19; CRC n = 20; Adenom n = 9; Enteritiden n=15.

Das mTOR Protein wird in allen untersuchten kolorektalen Entitäten exprimiert, allerdings deutlich höher in den benignen kolorektalen Erkrankungen im Vergleich zu den malignen Entitäten. Während mTOR auf der mRNA Ebene in den CRLM Patienten signifikant hochexprimiert wurde (Abb. 7), konnte dies auf der Proteinebene nicht gezeigt werden. Vielmehr wurde bei keiner der Patientengruppe ein signifikanter mTOR Protein Expressionsunterschied zwischen pathologischem und gesundem Nachbargewebe beobachtet.



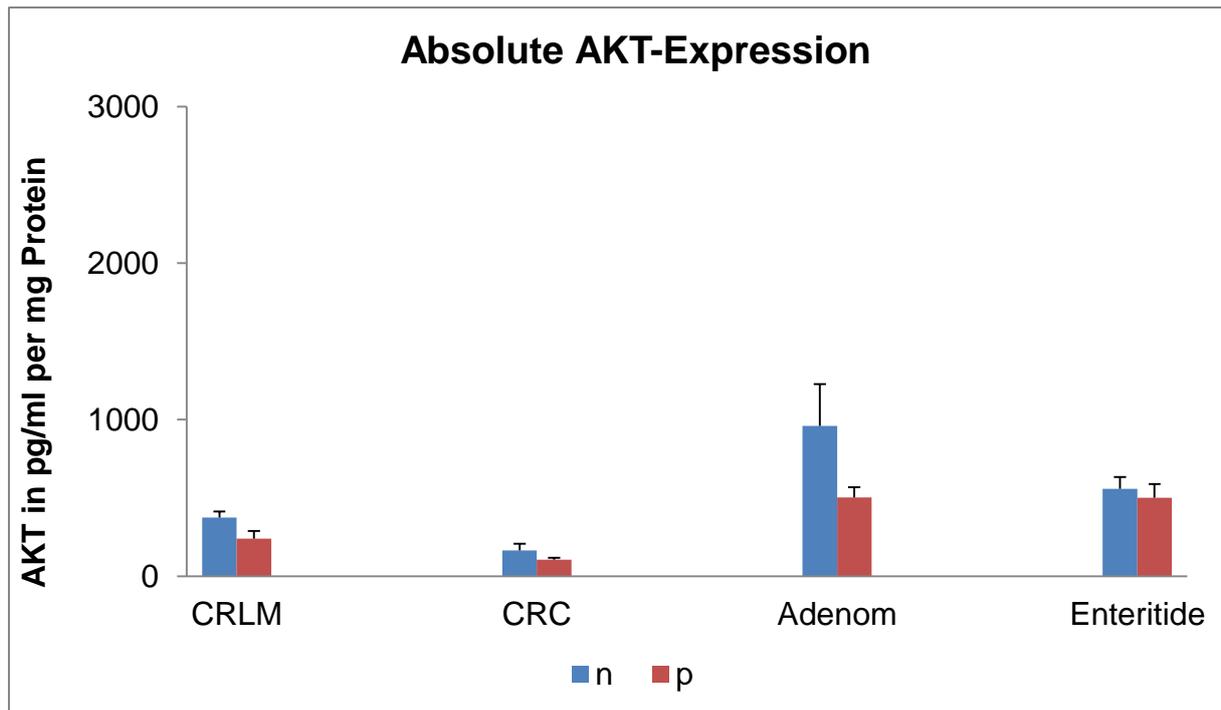
**Abb. 10:** Absolute mTOR-Proteinexpression in Enteritiden im Vgl. zu CRC und CRLM. Es wurde für jede Entität das pathologische (p) in Bezug gesetzt zum gesunden Nachbargewebe (n). Enteritid Patienten zeigten gegenüber CRLM und CRC Patienten eine signifikant erhöhte mTOR Expression sowohl in pathologischem (\* $P < 0,05$ ) als auch in gesundem Nachbargewebe (\* $P < 0,05$ ). Alle Angaben in pg/ml pro mg Gesamtprotein, CRLM  $n=19$ ; CRC  $n=20$ ; Enteritiden  $n=15$ .

Die Enteritid-Patienten zeigten eine signifikant ( $P < 0,05$ ) 13-fach erhöhte mTOR Proteinexpression im pathologischen Gewebe und eine 19-fach signifikant erhöhte mTOR Proteinexpression im gesunden Nachbargewebe ( $P < 0,05$ ), im Vergleich zu den CRLM Patienten wie dargestellt in Abbildung 10. Auch im Vergleich zur CRC-Gruppe zeigt das Enteritidgewebe eine signifikant ( $P < 0,05$ ) erhöhte mTOR Proteinexpression. Das pathologische Enteritid-Gewebe wurde 8-fach, das gesunde Enteritidgewebe wurde 9-fach höher exprimiert im Vergleich zum pathologischen bzw. gesunden CRC-Gewebe.



**Abb. 11:** Absolute S6K1-Proteinexpression bei CRLM-, CRC-, Adenom- und Enteritid-Patienten in pathologischem (p) und in gesundem Nachbargewebe (n). Alle Angaben in in pg/ml pro mg Gesamtprotein, CRLM n = 19; CRC n = 20; Adenom n = 9; Enteritiden n = 15.

Wie dargestellt in Abb. 11 wird das S6K1 Protein in allen Patientengruppen in pathologischem und in gesundem Gewebe ohne signifikanten Unterschied exprimiert.



**Abb. 12:** Absolute AKT-Proteinexpression bei CRLM-, CRC-, Adenom- und Enteritid-Patienten in pathologischem (p) und in gesundem Nachbargewebe (n). Alle Angaben in in pg/ml pro mg Gesamtprotein, CRLM n = 19, \*P<0,05; CRC n = 20; Adenom n = 9; Enteritiden n = 15.

Wie dargestellt in Abb. 12 wird das AKT Protein in allen Patientengruppen exprimiert. Es lässt sich bei CRLM-, CRC-, Adenom- und Enteritidpatienten kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen dem jeweiligen pathologischen Gewebe und dem gesunden Nachbargewebe feststellen.

		mTOR	AKT	S6K1
	n	P		
<b>Geschlecht</b>				
Männlich	13	.55	.55	.38
Weiblich	7	.18	.87	.31
<b>TNM-Stadium</b>				
I + II	7	.42	.49	.74
III + IV	13	.65	.38	.17
<b>Metastasen</b>				
positiv	7	.99	.87	.18
negativ	13	.86	.71	.55

**Tab. 16:** Klinisch/pathologische Parameter der CRC-Kohorte. n= Anzahl der Patienten, P= Wahrscheinlichkeit.

Tabelle 16 stellt dar, ob ein Zusammenhang zwischen verschiedenen klinischen und pathologischen Parametern und der Proteinexpression von mTOR/AKT/S6K1 bei CRC-Patienten besteht. Als Parameter wurden Geschlecht, TNM-Stadium und Metastasierung gewählt. Es wurde bei keinem der Proteine ein signifikant verändertes Expressionsverhalten im Hinblick auf die dargestellten Parameter festgestellt.

## 5. Diskussion

### 5.1 mTOR

Der mTOR Komplex stellt eine zentrale Schnittstelle des Energie-, Nährstoff- und Proteinstoffwechsels dar und spielt in der Zelle eine herausragende Rolle. In verschiedenen Krankheiten, insbesondere bei Tumorerkrankungen, wird eine aberrante Regulation des mTOR Stoffwechselweges, ausgelöst durch Mutation oder

Hyperaktivität des mTOR Proteinkomplexes, mit Gewebewucherung und Tumorwachstum in Verbindung gebracht (Dann et al., 2007; Strimpakos et al., 2009; Willems et al., 2012; Zaytseva et al., 2012; Cheng et al., 2013). Da eine erhöhte mTOR Expression schon in Prostata-, Leber-, und Pankreaskarzinomen beobachtet wurde, war es das Ziel dieser Arbeit, herauszufinden, wie mTOR im kolorektalen Karzinom und in kolorektalen Metastasen sowie im Adenom und in Enteritiden exprimiert wird (Kremer CL et al., 2006; Sahin F et al., 2004; Y. Jiao et al., 2011).

Auf der RNA Ebene konnten wir bei der CRLM-Patientengruppe eine signifikant erhöhte Expression der mTOR mRNA im Vergleich zum Normalgewebe aufzeigen. Hier weist die mTOR mRNA im pathologischen Gewebe eine ca. 3-Fach höhere Expression als das benachbarte Normalgewebe auf (Abb. 7). Auch Wu et al., konnten eine 2,3-Fach höhere mTOR mRNA im pathologischen CRC-Gewebe im vgl. zum normalen Nachbargewebe nachweisen (Shehua et al., 2015). Für die anderen drei untersuchten Entitäten liess sich kein signifikanter Unterschied in der mTOR Expression zwischen pathologischem und korrespondierendem Normalgewebe feststellen (Abb. 7).

Dies zeigte sich auch auf der Proteinebene, wie dargestellt in Abb. 9. Während sich bei den CRLM-Patienten auf der RNA-Ebene ein signifikanter mTOR Expressionsunterschied zwischen pathologischem und normalem Tumornachbargewebe zeigte, konnte dieser Unterschied auf der Proteinebene nicht dargestellt werden. Als Ursache hierfür kommen unterschiedliche posttranskriptionelle und posttranslationale Veränderungen in Betracht, andererseits könnte dies auch durch die Proteinisolation und das darin eingesetzte Reagenz Qiazol begründet sein. In anderen Studien konnte eine signifikant erhöhte mTOR Proteinexpression in pathologischem CRC-Gewebe gegenüber normalem Nachbargewebe nachgewiesen werden (Shuhua et al., 2015; Johnson et al., 2010). Allerdings erfolgte der Proteinnachweis in diesen Studien mittels Immunhistochemie bzw. Western Blot Analyse. Dies macht den Vergleich der Ergebnisse nur indirekt möglich. Ferner könnten unterschiedliche Ergebnisse aufgrund unterschiedlicher Kohorten der Patienten und der Lokalisation des Gewebes Zustandekommen. Vorangegangene Studien konnten eine erhöhte mTOR Expression nur im linksseitigen CRC-Gewebe nachweisen (Melling et al., 2015; Johnson et al., 2010). Es könnte somit rechtsseitiges CRC-Gewebe Zellen untersucht worden sein.

Wie in Abb. 10 dargestellt, zeigten die Enteritid-Patienten auf der Proteinebene im Vergleich zur CRC- und CRLM-Gruppe eine signifikant erhöhte mTOR Expression, sowohl im gesunden wie auch im pathologischen Gewebe. Es handelte sich hierbei um eine signifikant 13-fach erhöhte mTOR Expression im pathologischen Enteritid Gewebe im Vergleich zu der CRLM-Patientengruppe. Gegenüber der CRC-Gruppe handelte es sich um eine signifikant 8-fach erhöhte mTOR Expression. In diversen Studien konnte bereits die wichtige Rolle von mTOR bei der Entzündungsentwicklung dargelegt werden (Soliman et al., 2013). Auch Weichhart et al. berichten über die antiinflammatorische Wirkung von mTOR in Monocyten. So wurde gezeigt, dass mTOR die NF- $\kappa$ B-abhängige proinflammatorische Zytokin IL-12-Produktion hemmt und gleichzeitig die STAT3-abhängige antiinflammatorische IL-10-Produktion aktiviert (Weichhart et al., 2009). Hier könnten evtl. Entzündungsmediatoren die erhöhte mTOR Proteinexpression im Entzündungsgewebe bewirken. In diesem Zusammenhang sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, da die Literatur hierzu keine ausreichenden Kenntnisse liefert.

Wie dargestellt in Tab. 16 zeigt, dass es keine Korrelation zwischen der mTOR Proteinexpression und die in dieser Untersuchung aufgeführten klinischen sowie pathologischen Parameter bei CRC-Patienten, gibt. Allerdings gibt es signifikante mTOR Expressionsunterschiede in der humanen Alterung, wie wir jüngst in einer Studie gezeigt haben (Rubie et al., 2016). Geschlecht, TNM-Stadium und Metastasensetzung korrelieren jedoch nicht mit erhöhter mTOR Proteinexpression. Melling et al kann dieses Ergebnis bestätigen. Er konnte ebenfalls keine Korrelationen zwischen verstärkter mTOR Proteinexpression und den in Tab. 16 aufgeführten klinischen sowie pathologischen Parametern finden (Melling et al., 2015). Melling et al haben durch ihre hohe Anzahl an Patientenproben (n=1800) eine große statistische Aussagekraft.

## **5.2 S6K1**

Das S6K1 Protein spielt im mTOR Signalweg eine entscheidende Rolle. Es kann durch mTOR aktiviert werden und wirkt regulierend auf verschiedene zelluläre

Prozesse, wie Zellwachstum, -überleben und -metabolismus (Pearce et al., 2010). Das S6K1 Protein ist der direkte stromabwärts gelegene Effektor des mTORC1-Komplexes und spielt eine entscheidende Rolle für den mTOR Signalweg. Das S6K1 Protein ist in diversen Tumoren dereguliert und wird derzeit als wichtiger Faktor für die Pathogenese verschiedener Tumorentitäten angesehen (Georgrescu et al., 2010). S6K1 zeigt eine Resistenz gegenüber Arzneistoffen und Chemotherapie, was die wichtige Rolle dieses Proteins für das Tumorstadium und -überleben unterstreicht (Ismail et al., 2014). So konnte in vorherigen Studien eine Überexpression des S6K1 Proteins im pathologischen Gewebe im Vergleich zum normalem Nachbargewebe in diversen Tumorarten, wie etwa beim Magen-, und Mammakarzinom nachgewiesen werden (Xiao et al., 2009; Khotskaya et al., 2014). Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von S6K1 auf RNA und Proteinebene im kolorektalen Karzinom zu untersuchen. Auf der RNA-Ebene zeigte sich bei den CRLM-Patienten im pathologischen Gewebe eine 6-fach signifikant erhöhte S6K1 mRNA Expression im Vergleich zum normalen Tumornachbargewebe (Abb. 8). Auf der Proteinebene konnten die Ergebnisse der RNA Ebene jedoch in dieser Studie nicht bestätigt werden, was einerseits durch unterschiedliche posttranskriptionelle und posttranslationale Veränderungen begründet sein könnte, andererseits wie schon für mTOR ausgeführt auch durch experimentelle Bedingungen begründet sein. Auch für die Proteinisolation von S6K1 wurde das Reagenz Qiazol eingesetzt, was die Ergebnisse beeinflussen könnte (Abb. 11). Es gibt eine Studie, die sowohl auf der RNA Ebene wie auch auf der Proteinebene eine signifikant erhöhte S6K1 Expression im pathologischen CRC-Gewebe im Vergleich zum normalen Tumornachbargewebe zeigt (Lu et al., 2014). Während in zahlreichen Studien eine S6K1 Überexpression gegenüber normalem Tumornachbargewebe nachgewiesen wurde, gibt es für das CRC derzeit noch nicht ausreichend Literatur, um abschließend zu klären, ob eine Beteiligung des S6K1 Proteins im CRC grundsätzlich vorhanden ist. Wie dargestellt in Tab. 16, konnte keine Korrelation zwischen der S6K1 Proteinexpression und den in dieser Arbeit aufgeführten klinischen sowie pathologischen Parametern bei CRC-Patienten festgestellt werden. Während verschiedene Studien gezeigt haben, dass die S6K1 Expression mit erhöhten TNM-Stadien und Metastasierung korrelieren kann (Shaohua et al., 2015 und Lu et al., 2014), konnte dies in dieser Studie nicht gezeigt werden. Dies könnte auf

unterschiedliche Patientenkollektive und andere Nachweismethoden (IHC) zurückzuführen sein. Eine geschlechtsspezifische Korrelation konnte weder in dieser noch in anderen Studien nachgewiesen werden (Shaohua et al., 2015 und Lu et al., 2014).

### 5.3 AKT

Das Akt Protein spielt bei der Regulation von Zellproliferation, -überleben, -größe, Glucosemetabolismus und Angiogenese eine zentrale Rolle (Bellacosa et al., 2005). Es handelt sich hierbei um eine Serin/Threonin Kinase, die einen stromabwärts gelegenen Effektor des mTORC2-Komplexes darstellt und ein wichtiger stromabwärts gelegener Effektor der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und der Phosphoinositid-abhängigen Kinase-1 (PDK1) ist (Engelman et al., 2009; Manning et al., 2007; Franke et al., 2008). Eine Hyperaktivität des AKT/PI3K Signalweges lässt sich in vielen Tumorarten nachweisen wie etwa beim Sarkom und Melanom (Tomita et al., 2006; Dai et al., 2005).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen bei CRLM-Patienten keine signifikant erhöhte AKT Expression auf der RNA Ebene im pathologischen Gewebe im Vergleich zum Tumornachbargewebe (Abb. 8). Dieses Ergebnis für AKT unterscheidet sich von den Ergebnissen für mTOR und S6K1, die deren Expression auf RNA-Ebene eine signifikante Hochregulation zeigte. Dies könnte dadurch begründet sein, dass s6K1 ein Effektor des mTORC1 Komplexes ist und AKT ein Effektor des mTORC2 Komplexes, deren Regulation unterschiedlich ist. Auch in anderen Studien (Zinda et al., 2001), in denen die AKT Expression in verschiedenen Tumorarten untersucht wurde, konnte kein signifikanter AKT Expressionsunterschied auf RNA Ebene beobachtet werden, wobei dies auch für das Kolorektale Karzinom untersucht wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Tumorgenese des CRC und eine erhöhte AKT RNA Expression nicht oder nur geringfügig miteinander korrelieren. Andere Studien können einen signifikanten AKT RNA Expressionsunterschied im Kolorektalen Gewebe gegenüber gesundem Tumornachbargewebe belegen (Rychahou et al., 2008). Die abweichenden Ergebnisse könnten aufgrund unterschiedlicher Patientenkohorten oder Methodik zustande kommen.

Auf der Proteinebene zeigte sich bei keiner Patientengruppe eine signifikant erhöhte AKT Expression zwischen Normalgewebe und pathologischem Gewebe (Abb. 12). Diese Ergebnisse lassen keinen Zusammenhang zwischen AKT Expression und der Entwicklung des CRC bzw. seiner prämaligen Vorstufen erkennen. Die Tumorgenese des CRC ist nicht ausreichend entschlüsselt und kann auf multifaktoriellen genetischen und epigenetischen Faktoren beruhen, an denen verschiedene Signalwege beteiligt sind. Mutationen von AKT scheinen auch variabel in Bezug auf den Tumortyp zu sein. Anders als zum Beispiel beim Mammakarzinom sind Mutationen des AKT1 im CRC eher selten (<2%) (Carpten et al., Bleeker et al., 2008). Demnach können die Entstehung und das Wachstum von Tumoren auch AKT unabhängig verlaufen wie eine aktuelle Studie zeigen konnte (Lien et al., 2017). Kolorektale Karzinome ohne AKT Aktivierung scheinen sogar auf ein eher aggressiveres Verhalten und eine schlechtere Prognose bezüglich der Patientenüberlebensrate hinzudeuten, wie Baba et al an 717 CRC Patienten gezeigt hat (Baba et al., 2011).

Es konnte in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen molekularbiologischen AKT Daten und klinischen Parametern der Patienten festgestellt werden (Tab. 16). Andere Studien können eine Korrelation zwischen erhöhter AKT Expression und Metastasierung bzw. TNM-Stadium belegen (Zhang et al., 2012; Colakoglu et al., 2008). Allerdings basieren ihre Nachweis auf immunhistochemischen Untersuchungen, was den Vergleich mit den Daten dieser Arbeit nur indirekt erlaubt. Hierzu sind weiterführende Untersuchungen mit einem größerem Patientenkollektiv notwendig, um abzuklären in wieweit eine Korrelation zwischen erhöhter AKT Expression zum einen und Metastasierung bzw. TNM-Stadium zum anderen besteht. Eine geschlechtsspezifische Korrelation konnte weder in dieser noch anderen Studien nachgewiesen werden (Zhang et al., 2012; Colakoglu et al., 2008). Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit scheint das AKT Protein keine Rolle für die Entwicklung eines CRC oder seiner prämaligen Vorstufen zu spielen. Um als funktionierender und aussagekräftiger Biomarker zu dienen, bedarf es weiterer Studien, um die Rolle des AKT Proteins im CRC besser zu verstehen.

#### **5.4 Zusammenfassung und Schlussfolgerung:**

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten nicht auf eine Rolle des mTOR und S6K1 Proteins bei der Entwicklung des CRC und seiner prämaligen Vorstufen hin. Für beide Proteine konnte zwar bei den CRLM Patienten eine signifikant erhöhte Expression von mTOR und S6K auf der RNA Ebene in pathologischem Gewebe im Vergleich zu gesundem Nachbargewebe gezeigt werden. Auf der Proteinebene konnte dieser Befund jedoch nicht bestätigt werden. Diese Diskrepanz könnte durch unterschiedliche posttranskriptionelle und posttranslationale Veränderungen wie etwa transkriptionelles Spleißen, posttranskriptionelles Spleißen, translationale Modifikationen bzw. Regulationen und Proteinkomplex Formierung zustande kommen (Guo et al., 2008).

Da erst nach Abschluss der hier vorgestellten experimentellen Arbeiten beobachtet wurde, dass das Reagenz SDS die Proteinisolation stören könnte, wären potentielle Diskrepanzen zwischen der RNA- und Proteinebene möglicherweise auch durch das experimentelle Vorgehen erklärbar.

Im entzündlichen kolorektalen Gewebe der Enteritid Patienten wurde jedoch eine signifikant erhöhte mTOR- Proteinexpression im Vergleich zu den anderen untersuchten Entitäten gemessen, was auf eine Aufgabe von mTOR in entzündlichem kolorektalen Gewebe hinweist (Abb. 10).

Das AKT Protein hingegen zeigt weder auf der RNA noch auf der Proteinebene eine Beteiligung an der Genese des CRC und seiner prämaligen Vorstufen. Basierend auf diesem Ergebnis spielt das AKT Protein keine Rolle für die Entwicklung eines CRC und seiner prämaligen Vorstufen.

Eine geschlechtsspezifische Korrelation konnte weder für mTOR, S6K1 oder AKT festgestellt werden. Für weitere klinische und pathologische Parameter wie etwa TNM-Stadium und Metastasierung konnte in dieser Arbeit keine Korrelation gefunden werden, wobei dies in der Literatur kontrovers diskutiert wird.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sollten weiterführende Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven durchgeführt werden, um die Komplexität des mTOR/S6K1/AKT Signalweges besser zu verstehen. Dabei wäre es auch wichtig, weitere experimentelle Nachweismethoden wie etwa Immunhistochemie und Western Blot einzusetzen.

## 6. Anhang

### 6.1 Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1: mTOR Signalweg
- Abb. 2: Struktur des S6K1 Protein
- Abb. 3: Struktur der Akt/PKB Isoforme in humanen Zellen
- Abb. 4: Schematische Darstellung ELISA
- Abb. 5: Schematische Darstellung qRT-PCR
- Abb. 6: Ct-Wert
- Abb. 7: Relative mTOR-mRNA-Expression in CRLM-, CRC-, Adenom-, und Enteritid-Patientengewebe
- Abb. 8: Relative S6K1- und AKT- mRNA-Expression bei Patienten mit CLRM
- Abb. 9: Absolute mTOR Proteinexpression bei CRLM-, CRC-, Adenom- und Enteritid- Patienten
- Abb. 10: Absolute mTOR- Proteinexpression in Enteritiden im Vgl. zu CRC und CRLM
- Abb. 11: Absolute S6K1- Proteinexpression bei CRLM-, CRC-, Adenom- und Enteritid-Patienten
- Abb. 12: Absolute AKT- Proteinexpression bei CRLM-, CRC-, Adenom- und Enteritid-Patienten

### 6.2 Verzeichnis der Tabellen

- Tab. 1: Verbrauchsmaterialien
- Tab. 2: Instrumentarien
- Tab. 3: Chemikalien/ Biochemikalien
- Tab. 4: Angewendete Sets
- Tab. 5: Assay on Demand
- Tab. 6: Software

- Tab. 7: Patienten mit Kolorekalem Karzinom
- Tab. 8: Patienten mit Lebermetastasen
- Tab. 9: Patienten mit Adenom
- Tab. 10: Patienten mit Enteritiden
- Tab. 11: Verdünnungsreihe bekannter Konzentration
- Tab. 12: Lösungen DuoSet® IC
- Tab. 13: cDNA Ansatz
- Tab. 14: Pippetieransatz STD
- Tab. 15: Ablauf 7900HT Fast Real-Time PCR System
- Tab. 16: Klinisch/pathologische Parameter der CRC-Kohorte

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
3'-UTR	3' untranslatierte Region
AGC	cAMP Proteinkinase A/ Proteinkinase G / Proteinkinase C
AK	Antikörper
AoD	Assay of Demand
BSA	Bovines Serumalbumin
CRC	Kolorektales Karzinom
CRLM	Kolorektale Lebermetastasen
Deptor	DEP-domain- containing mTOR-interacting protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-Dependent Protein Kinase
dNTP	Nukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Hsp70	heat shock protein 70-α
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
k.A	Keine Angabe
KHK	Koronare Herzkrankheit
M	Mol
min	Minute
miRNA	MicroRNAs
ml	Milliliter

mLST8	mammalian lethal with Sec13 proteine 8
mM	Millimol
mRNA	messenger RNA
mSIN1	mammalian stress-activated PK-interacting protein 1
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
mTORC1	mTOR complex 1
mTORC2	mTOR complex 2
NaF	Natriumfluorid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NRT	No Reverse Transkriptase
nt	Nucleotiden
NTC	No Template
OP	Operation
PBS	Blei(II)-sulfid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK-1	phosphoinositide-dependent kinase-1
PH	Pleckstrin-homolog
	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 1
PHLPP1/2	
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKB	Proteinkinase B
PMM1	Phosphomannomutase 1
PP2A	Protein phosphatase 2A
PRAS40	proline-rich Akt substrate 40 kDa
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
qRT-PCR	real-time quantitative PCR
Raptor	regulatory-associated protein of Mtor
RHO	ρ-Faktor
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse III	Ribonuklease III
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkriptase
S6K1	S6 Kinase 1
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sog.	so genannte
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STD	Standard
Tab.	Tabelle
vgl.	Vergleich
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## 6.4 Literaturverzeichnis

1. Andjelkovic´ M, Jakubowicz T, Cron P, Ming XF, Han JW, Hemmings BA. (1996). Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 93: 5699–5704.
2. Banerjee P, Ahmad MF, Grove JR, Kozlosky C, Price DJ, Avruch J. Molecular structure of a major insulin/ mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* 21 (1990) 8550-8554.
3. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136(2):21
4. Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A and Testa JR. (2005). *Adv. Cancer Res.*, 93, 29–86.
5. Ben-Hur V, Denichenko P, Siegfried Z, Maimon A, Krainer A, Davidson B, Karni R. S6K1 alternative splicing modulates its oncogenic activity and regulates mTORC1, *Cell Rep*. 3 (2013) 103-115.
6. Bleeker FE, Felicioni L, Buttitta F, et al. AKT1(E17K) in human solid tumours. *Oncogene* 2008;27:5648–5650.
7. Brognard J, Sierecki E, Gao T, Newton AC. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms (2007). *Mol Cell* 25: 917–931.
8. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. RAFT1 phosphorylation of the translational regulator p70 S6 kinase and 4E-BP1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 1432-1437.
9. Burnett PE, Blackshaw S, Lai MM, Qureshi IA, Burnett AF, Sabatini DM, Snyder SH. Neurabin is a synaptic protein linking p70 S6 kinase and the neuronal cytoskeleton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 8351-8356.
10. Carpten JD, Faber AL, Horn C, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 2007;448:439–444.
11. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K and Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005; 436(7051):740-744.

12. Cheng H, Walls M, Baxi SM, Yin MJ (2013). Targeting the mTOR pathway in tumor malignancy. *Curr Cancer Drug Targets* 13: 267-277.
13. Claudia Rubie, Kathrin Kolsch, Beata Halajda, Hermann Eichlerb, Stefan Wagenpfeil, Klaus Roemer and Matthias Glanemanna. microRNA-496 – A new, potentially aging-relevant regulator of mTOR. *CELL CYCLE* 2016, VOL. 15, NO. 8, 1108–1116.
14. Colakoglu Tamer, Sedat Yildirim, Fazilet Kayaselcuk, Tarik Zafer Nursal, Ali Ezer, Turgut Noyan, Hamdi Karakayali, Mehmet Haberal. Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence? *The American Journal of Surgery* (2008) 195, 719–725.
15. Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol.* 2005;23:1473-1482
16. Dann SG, Selvaraj A, Thomas G (2007). Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med* 13: 433-442
17. DAXX/ATRAX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science*, 331 (6021) (2011), pp. 1199–1203
18. E. Wienholds, R.H. Plasterk: MicroRNA function in animal development. In: *FEBS Lett.* 579(26), 2005, S. 5911–5922
19. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:550-562.
20. Evan C Lien, Christian C Dibble and Alex Toker. PI3K signaling in cancer: beyond AKT. *Current Opinion in Cell Biology* 2017, 45:62–71.
21. Franke TF. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene.* 2008;27:6473-6488.
22. Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Scjroder W, Sculley T, Carr SA et al. (2006). mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* 16: 1865-1870.
23. Geogrescu MM. PTEN tumor suppressor network in PI3K-Akt pathway control, *Genes Cancer* 1 (2010) 1170-1177.

24. Guertin DA, Gunter KV, Bell GW, Thoreen CC, Sabatini DM (2006a). Functional genomics identifies TOR-regulated genes that control growth and division. *Curr Biol* 16: 958-970.
25. Guertin DA, Sabatini DM (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 12: 9-22
26. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J et al. (2006b). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* 11: 859-871
27. Haar, E.V. et al. Insulin signalling to MTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. (2007) *Nat. Cell Biol.* 9, 316-323
28. Hanahan D and Weinberg RA. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57–70.
29. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S et al. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110: 177-189.
30. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt Pathway, Cold Spring Harb *Perspect Biol* (2012).#
31. Holzapfel Bianca, Wickert Lucia. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit. Band 37, Nr. 2, S. 120–126.*
32. Hutchinson JN, Jin J, Cardiff RD, Woodgett JR, Muller WJ. Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2- mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res.* 2004;64:3171-3178.
33. Irie HY, Pearlman RV, Grueneberg D, et al. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 2005;171:1023-1034.
34. Ismail HM, Myronova O, Tsuchiya Y, Niewiarowski A, Tsaneva I, Gout I. Identification of the general transcription factor Yin Yang 1 as a novel and specific binding partner for S6 Kinase 2, *Cell. Signal.* 5 (2013) 1054-1063.
35. Jacinto E, Loewith R, Schimdt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A et al. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6: 1122-1128.

36. Khotskaya YB, A Goverdhan, J Shen, M Ponz-Sarvise, SS Chang, MC Hsu, Y Wei, W Xia, D Yu, MC Hung. S6K1 promotes invasiveness of breast cancer cells in a model of metastasis of triple-negative breast cancer. *Am J Transl Res* 2014;6(4):361-376.
37. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H et al. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110: 163-175.
38. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Gunter KV, Erdjument-Bromage H et al. (2003). GβL a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 11: 895-904.
39. Kremer CL, Klein RR, Mendelson J, Browne W, Samadzedeh LK, Vanpatten K, Highstrom L, Pestano GA, Nagle RB. Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression. *Prostate* 2006; 66: 1203-1212.
40. L. He, G.J. Hannon. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5(7), 2004, S. 522–531
41. Laplante M, Sabatini DM (2009). mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* 122: 3589-3594.
42. Laplante M, Sabatini DM (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149: 274-293
43. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S and Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003; 425(6956):415-419.
44. Lewis BP, Burge CB and Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005; 120(1):15-20.
45. Lin S and Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews Cancer.* 2015; 15(6):321-333.
46. Liu H, Radisky DC, Nelson CM, et al. Mechanism of Akt1 inhibition of breast cancer cell invasion reveals a protumorigenic role for TSC2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:4134-4139.

47. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D et al. (2002). Two TOR complexes, only one which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 10: 457-468.
48. Lu Qingjun, Jieshu Wang, Gang Yu, Tianhua Guo, Chun Hu , Peng Ren. Expression and clinical significance of mammalian target of rapamycin/P70 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in human colorectal carcinoma tissue. *Oncology Letters* 10: 277-282, 2015
49. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129:1261-1274.
50. Martin J, Masri J, Bernath A, Nishimura R, Gera J (2008). Hsp70 associates with Rictor and is required for mTORC2 formation and activity. *Biochem Biophys Res Commun* 372: 578-583.
51. Mendell JT and Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2012; 148(6):1172-1187. 5-233.
52. Michael J. Zinda, Mac A. Johnson, Jonathan D. Paul, Candice Horn, Bruce W. Konicek, Zhao Hai Lu, George Sandusky, James E. Thomas, Blake Lee Neubauer, Mei T. Lai, Jeremy R. Graff. AKT-1, -2, and -3 are Expressed in Both Normal and Tumor Tissues of the Lung, Breast, Prostate, and Colon. Vol. 7, 2475–2479, August 2001 *Clinical Cancer Research*.
53. Moschetta M, Reale A, Marasco C, Vacca A, Carratù M R (2014). Therapeutic targeting of the mTOR-signalling pathway in cancer: benefits and limitations. *British Journal of Pharmacology* 171: 3801.
54. Naif AlQurashi MSc<sup>a,b</sup>, Vinod Gopalan BHMS, MSc, PhD, Robert A. Smith BSc (Hon), PhD, Alfred King Y. Lam MBBS, MD, PhD, FRCPA. Clinical impacts of mammalian target of rapamycin expression in human colorectal cancers. *Human Pathology* (2013) 44, 2089–2096.
55. Nathaniel Melling, Ronald Simon, Jakob R Izbicki, Luigi M Terracciano, Carsten Bokemeyer, Guido Sauter, Andreas H Marx. Expression of phospho-mTOR kinase is abundant in colorectal cancer and associated with left-sided tumor localization. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(6):7009-7015
56. Pardo OE, Seckl MJ. S6K2: the neglected S6 kinase family member , *Front. Oncol.* 3 (2013) 191.
57. Pearce L.R, Komander D and Dario R. Alessi. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 9–22 (2010).

58. Pearce LR, Huang X, Boudeau J, Pawlowski R, Wullschleger S, Deak M (2007). Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J* 405: 513-522.
59. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137: 873-886.
60. Price DJ, Mukhopadhyay NK, Avruch J. Insulin-activated protein kinase phosphorylate a pseudosubstrate syntetic peptide inhibitor of the p70 S6 Kinase, *J. Biol. Chem.* 25 (1991) 16281-16284.
61. Rosner M, Hengstschläger M. Nucleocytoplasmatic localization of p70 S6K1, but not of its isoforms p85 and p31, is regulated by TSC2/mTOR, *Oncogene* 30 (2011) 4509-4522.
62. Roulin D, Cerantola Y, Dormond-Meuwly A, Demartines N and Dormond O. Targeting mTORC2 inhibits colon cancer cell proliferation in vitro and tumor formation in vivo. *Molecular cancer.* 2010; 9:57.
63. Sahin F, Kannangai R, Adegbola O, Wang J, Su G, Torbenson M. mTOR and P70 S6 kinase expression in primary liver neoplasms. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8421-8425.
64. Samuels Y, Diaz LA, Jr., Schmidt-Kittler O, et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell.* 2005;7:561-573.
65. Sanak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E et al. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 25: 903-915.
66. Sara M Johnson, Gulhati BS, Bill A R, Yimei Han, Piotr G Rychahou, Hung Q Doan, Heidi L Weiss, B Mark Evers. Novel Expression Patterns of PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway Components in Colorectal Cancer. *Journal of the American College of Surgeons* - May 2010
67. Sara M Johnson, MD1, Pat Gulhati, BS, Bill A Rampy, DO, PhD, Yimei Han, MS3, Piotr G Rychahou, MD5,7, Hung Q Doan, BA1,4, Heidi L Weiss, PhD, and B Mark Evers, MD, FACS. Novel Expression Patterns of PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway Components in Colorectal Cancer. *J Am Coll Surg.* 2010 May ; 210(5): 767–778.
68. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H et al. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-

- insensitive and raptor independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14: 1296-1302.
69. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor–mTOR complex. *Science* 307:1098–1101.
70. Schalm SS, Fingar DC, Sabatini DM, Blenis J (2003). TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr Biol* 13: 797-806.
71. Shaohua Zhang, Bi Jingwang. Expression of S6K1 and 4EBP1 in colorectal cancer tissues and its association with clinicopathologic characteristics. *Chin J Cancer Biother*, Dec. 2015, Vol. 22, No. 6.
72. Shuhua Wu, Chenbo Sun, Dong Tian, Yangyang Li, Xiangqian Gao, Shuang He, Tangyue Li. Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(4):3882-3891
73. Soliman, G.A. 2013. The role of mechanistic target of rapamycin (mTOR) complexes signalling in the immune responses. *Nutrients* 5: 2231–2257.
74. Song G, Ouyang G, Bao S (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 9, No 1, 2005 59-71
75. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW. 1998. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95: 29–39.
76. Strimpakos AS, Karapanagiotou EM, Saif MW, Syrigos KN, (2009). The role of mTOR in the management of solid tumors: an overview. *Cancer Treat Rev* 35: 148-159.
77. T. Weichhart, M.D. Saemann: The multiple facets of mTOR in immunity: *Trends in Immunology*, 30 (2009), pp. 218–226
78. T. Weichhart, M.D. Saemann: The multiple facets of mTOR in immunity: *Trends in Immunology*, 30 (2009), pp. 218–226
79. Tomita Y, Morooka T, Hoshida Y, et al. Prognostic significance of activated AKT expression in soft-tissue sarcoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12:3070-3077.

80. Willems L, Tamburini J, Chapuis N, Lacombe C, Mayeux P, Bouscary D (2012). PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. *Curr Oncol Rep* 14: 129-138
81. Xiao Li, Yi C Wang, Wu S Li and Yan Du. The role of mTOR and phospho-p70S6K in pathogenesis and progression of gastric carcinomas: an immunohistochemical study on tissue microarray. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2009, 28:152.
82. Y. Jiao, C. Shi, B.H. Edil, R.F. de Wilde, D.S. Klimstra, A. Maitra, et al.
83. Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan KL (2006). Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev* 20: 2820-2832.
84. Yi R, Qin Y, Macara IG and Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*. 2003; 17(24):3011- 3016.
85. Yinxu Zhang, Xiaomei Liu, Junhua Zhang, Leiyu Li and Chunying Liu. The expression and clinical significance of PI3K, pAkt and VEGF in colon cancer. *ONCOLOGY LETTERS* 4: 763-766, 2012.
86. Yong-Bin Zheng, Kuang Xiao, Goa-Chun Xiao, Shi-Lun Tong, Yu Ding, Qiu-Shuang Wang, Sheng-Bo LI and Zhi-Nan Hao. MicroRNA-103 promotes tumor growth and metastasis in colorectal cancer by directly targeting LATS2. *Oncology Letters* 12: 2194-2200, 2016
87. Yoshifumi Baba, Katsuhiko Nosho, Kaori Shima, Marika Hayashi, Jeffrey A. Meyerhardt, Andrew T. Chan, Edward Giovannucci, Charles S. Fuchs, and Shuji Ogino. Phosphorylated AKT Expression Is Associated With PIK3CA Mutation, Low Stage, and Favorable Outcome in 717 Colorectal Cancers. *Cancer* 2011;117:1399–408.
88. Zaytseva YY, Valentino JD, Gulhati P, Evers BM (2012). mTOR inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett* 319: 1-7.
89. Zhang YJ, Dai Q, Sun DF, Xiong H, Tian XQ, Gao FH, Xu MH, Chen GQ, Han ZG and Fang JY. mTOR signaling pathway is a target for the treatment of colorectal cancer. *Annals of surgical oncology*. 2009; 16(9):2617-2628

## **7. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mir bei der Erstellung meiner Dissertationsarbeit eine große Hilfe waren.

Meiner Doktormutter Frau PD. Dr.rer.nat. Claudia Rubie möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas danken. Ich möchte mich für die anhaltende Unterstützung bei der Bewältigung der zahlreichen kleinen und großen Problemen im Laboralltag, welche mit meiner Dissertation verbunden waren, danken.

Mein Dank gilt auch Frau Dr.rer.nat. Vilma Duarte Oliveira Frick und Frau Bianca Kruse, die mir immer mit viel Geduld bei den zahlreichen Experimenten zur Seite standen.

Zum Schluss gilt mein Dank meinen Eltern Sahra und Mohammed Sadiék Magid, die mich die ganzen Jahre des Studiums begleitet und unterstützt haben und ohne welche die Approbation und Dissertation nie möglich gewesen wäre.