Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
(Prof. Dr. med. J. Brockmöller)
im Zentrum Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Identifizierung genetischer Biomarker für die Wirksamkeit von Oxaliplatin: Kandidatengen-bezogene und Genom-weite Analysen

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Sadik Saman

aus Idil

Göttingen 2013

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer
I. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. J. Brockmöller
II. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. rer. nat. T. Beißbarth

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2014

I Inhaltsverzeichnis

1 **Einleitung** ... 1

1.1 Chemische Struktur von Oxaliplatin ... 1
1.2 Klinische Indikationen ... 1
1.3 Oxaliplatin-haltige Therapieschemata ... 1
1.4 Toxizität ... 2
1.5 Pharmakokinetik ... 3
1.6 Transmembranärer Transport ... 4
1.6.1 Import ... 4
1.6.2 Export ... 6
1.7 Zytotoxische Wirkung ... 7
1.7.1 Interaktion mit DNA ... 7
1.7.2 Induktion von Apoptose und Proliferationshemmung ... 8
1.7.3 Interaktion mit RNA ... 8
1.8 Reparatur von DNA-Addukten ... 8
1.9 Genetische Prädiktoren ... 10
1.9.1 Kandidatengen-Ansatz ... 10
1.9.2 Genom-weiter Ansatz ... 11
1.10 Zielsetzung ... 12

2 **Material** ... 13

2.1 Geräte ... 13
2.2 Verbrauchsmaterialien ... 14
2.3 Chemikalien ... 15
2.4 Enzyme und Kits ... 17
2.5 Lösungen und Puffer ... 17
2.6 Zellkulturmedien ... 17
2.7 LCLs ... 17
2.8 Farbstoffe ... 18
2.8.1 CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) ... 18
2.8.2 Vybrant Ruby® ... 18
2.8.3 Sytox® ... 18
2.9 Software ... 19
2.10 Datenbanken ... 20
2.11 Zelllinien ... 20
2.11.1 Trainingsset mit 104 LCLs ... 20
2.12 Primer für Multiplex-PCR ... 23
2.13 Primer für qRT-PCR ... 24

3 **Methoden** ... 25

3.1 Lymphoblastoide Zelllinien (LCL) ... 25
3.2 Auftauen von LCLs ... 25
3.3 Zellzählung mit *Counting beads* ... 26
3.4 CFSE-Färbung ... 26
3.5 Behandlung mit Oxaliplatin ... 27
3.6 FACS-Messung ... 27
3.6.1 Sytox® und Vybrant Ruby®-Färbung ... 27
3.6.2 Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting) ... 28
3.7 RNA-Analytik ... 28
3.7.1 RNA-Gewinnung ... 28
3.7.2 Isolierung und Gewinnung von RNA ... 29
3.7.3 cDNA-Synthese ... 29
3.7.4 quantitative Real Time-PCR ... 31
3.7.5 Referenzgene zur Normalisierung ... 33
3.8 DNA-Analytik ... 34
3.8.1 DNA-Probengewinnung ... 34
3.8.2 DNA-Isolierung und Quantifizierung ... 34
3.8.3 Quantifizierung von gebundenem Platin ... 34

3.8.4 PCR ... 35
3.8.5 Agarose-Gelelektrophorese ... 36
3.8.6 Genotypisierung mittels Primerextensionsmethode ... 38
3.9 Bioinformatik ... 40
3.10 Statistik ... 41
3.10.1 Deskriptive Statistik ... 41
3.10.2 Analytische Statistik ... 41

4 **Ergebnisse** ... 43

4.1 Basale Proliferationsrate ... 43
4.2 Variabilität funktioneller Parameter der Oxaliplatin-Sensitivität ... 44
4.2.1 V50 ... 44
4.2.2 Proliferationshemmung ... 45
4.2.3 DNA-gebundenes Platin ... 46
4.2.4 Einfluss basaler Proliferationsrate auf V50, P50 und Platineinlagerung ... 47
4.2.5 Korrelation von V50, P50 und Platineinlagerung ... 48
4.3 Expression ausgewählter Kandidatengene ... 49
4.3.1 Referenzgene ... 49
4.3.2 Ausgewählte Kandidatengene für Oxaliplatin-Transport und DNA-Reparatur ... 50
4.4 Korrelation Genexpression mit V50,P50 und DNA-gebundenem Platin ... 53
4.4.1 Vitalitätsminderung ... 53
4.4.2 Proliferationshemmung ... 54
4.4.3 Platingehalt in DNA ... 55
4.5 Polymorphismen im Kandidatengen SLC31A1 ... 56
4.6 Trainingsset mit Genotyp-Daten aus dem Resequenzierungsprojekt ... 57
4.7 Testset an den LCLs mit eigenen Genotyp-Daten ... 61

5 **Diskussion** ... 63

5.1 Korrelation der SLC31A1-Expression mit zytotoxischer Wirkung von Oxaliplatin ... 63
5.2 Einfluss eines SLC31A1-Genpolymorphismus ... 65
5.3 Gene für ATP-Transporter und für Basenexzisions-Reparatur ... 67
5.4 Potenzieller genetischer Biomarker auf Chromosom 9 ... 68
5.5 Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse ... 69
5.6 Ausblick ... 71

6 **Zusammenfassung** ... 72

7 **Literatur** ... 74

II Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BER	Basenexzisionsreparatur
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre oder *copy* DNA
CFSE	*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*
cm	Centimeter
CO_2	Kohlendioxid
CRC	*colorectal carcinoma*
DACH	Diaminocyclohexan
dbSNP	database SNP, innerhalb NCBI-Datenbank
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
d.h.	das heißt
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	*Desoxyribonucleic Acid*, Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
EBV	Epstein-Barr Virus
ERCC	*excision-repair cross-cpmlementing*
et al.	*et alii*, und andere
exp	*expected*, erwartete Anzahl
FACS	*fluorescence activated cell sorting*
FCS	*fetal calf serum*, Fetales Kälberserum
FDR	*false discovery rate*
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s^2)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GWAS	*genome wide association study*

h	Stunde
hCTR	*human copper transporter*
HEC	*human endometrial cell*
HHG	*housekeeping Gene*
HNPCC	*hereditary non-polyposis colorectal carcinoma*
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase-1
JT-Test	Jonckheere-Terpstra-Trend-Test
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LCL	*lymphoblastoid cell line*
m	Meter
M	mol/l
MAF	*minor allele frequency*, Frequenz des selteneren Allels
MeV	Mega-Elektronenvolt
Mg	Milligramm
µl / µg	Mikroliter / Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	*messenger RNA*, Boten-RNA
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	*National Center for Biotechnology Infromation*
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
ng / nm	Nanogramm / Nanometer
NSCLC	*non-small-cell lung carcinoma*
OCT	*organic cation transporter*
OD	optische Dichte
p	Signifikanzniveau
PBS	*phosphate-buffered saline*, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	*polymerase Chain Reaction*, Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pH	*pondus Hydrogenii*
PI	Propidiumiodid
ppb	*parts per billion* (Verdünnung von 10^{-9})

Primer-F	Vorwärts-Primer
Primer-R	Rückwärts-Primer
qRT-PCR	quantitative *Real Time*-Polymerasekettenreaktion
r / r²	Korrelationskoeffizient / Bestimmtheitsmaß
RNA	*ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure
rs-Nummer	*reference SNP*-Nummer
RNase	Ribonuklease
rpm	*rounds per minute*
RPMI	*Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640*
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s	Sekunde
SLC31A1	*solute carrier family 29 member 1*(Kupfertransporter), Synonym zu hCTR1
SNP	*Single Nucleotide Polymorphism*, Einzelnukleotid-Polymorphismus
sog.	sogenannt
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
U	Units (Einheit für Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehung/Minute
U/µL	Units/Mikroliter
UV	ultraviolett
V	Volt
WHO	*World Health Organization*
z.B.	zum Beispiel

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Zelllinien für die Trainingsstudie 22
Tab. 2 Primerliste für die Genotypisierung des Testsets mit PCR- und SNaPshot™-Primern…. 23
Tab. 3 PCR-Bedingungen für die einzelnen Gene der qRT-PCR. 24
Tab. 4 Verdünnungsschema für die unterschiedlichen Oxaliplatin-Konzentrationen. 27
Tab. 5 Reaktionsansatz für die Primeranlagerung. 30
Tab. 6 Reaktionsansatz für die reverse Transkription 30
Tab. 7 Reaktionsansatz für die qRT-PCR. 33
Tab. 8: Reaktionsbedingungen der qRT-PCR 33
Tab. 9 Reaktionslösung für die Multiplex-PCR 35
Tab. 10 Reaktionslösung für die Einzel-PCR 36
Tab. 11 Reaktionsbedingungen für die Multiplex-PCR 36
Tab. 12 Reaktionsbedingungen für die Einzel-PCR 36
Tab. 13 Reaktionsansatz für die erste enzymatische Aufreinigung vor der SNaPshot™-Reaktion. 39
Tab. 14 Reaktionsansatz für die SNaPshot™-Reaktion. 39
Tab. 15 Reaktionsbedingungen der SNaPShot™-Reaktion. 39
Tab. 16 Reaktionsansatz für die zweite enzymatische Aufreinigung. 40
Tab. 17 Reaktionsansatz zur Probenvorbereitung für die Sequenzierreaktion 40
Tab. 18 Korrelation zwischen Vitalitätsminderung, Proliferationshemmung und Platineinlagerung 48
Tab. 19 Die 20 stärksten SNP-Assoziationen bezüglich Oxaliplatin-Vitalitätshemmung im Trainingsset.. 60

IV Abbildungsverzeichnis

Abb. 1Strukturformel von Oxaliplatin. 1
Abb. 2 Import und Export von Oxaliplatin über verschiedene Transporter..... 4
Abb. 3 Schematische Struktur des SLC31A1-Transporters..... 6
Abb. 4 Schmelzpunktkurve nach *Real Time*-PCR von *SLC31A1* 32
Abb. 5 Gelelektrophorese für die Etablierung der Multiplex-PCR..... 38
Abb. 6 Elektropherogramm für die 20 analysierten Genpolymorphismen. 40
Abb. 7 Häufigkeitsverteilung der basalen Proliferationsrate der Zelllinien des Trainingssatzes.. 44
Abb. 8 Verteilung der V50-Oxaliplatin-Konzentration im Trainingssatz..... 45
Abb. 9 Verteilung der P50-Oxaliplatin-Konzentration 46
Abb. 10 Einlagerung von Oxaliplatin in die DNA..... 47
Abb. 11 Basale Proliferationsrate ($P_{basal, 24h}$) und Oxaliplatin-Empfindlichkeit..... 48
Abb. 12 Korrelation zwischen Proliferationshemmung (P50) bzw. Platineinlagerung mit der Vitalitätsminderung (V50). 49
Abb. 13 Effekte von Oxaliplatin auf die Expression von vier Referenzgenen in 16 LCLs 50
Abb. 14 Einfluss von Oxaliplatin auf die Expression der Kandidatengene in der Pilotstudie. 51
Abb. 15 Effekt von Oxaliplatin auf die Expression der Kandidatengene unter Bezug auf die Referenzgene 52
Abb. 16 Genexpression unter 1,3 µM Oxaliplatin in der Trainingsstudie 53
Abb. 17 Basale Expressionsrate von Oxaliplatin-Transportern und Vitalitätsminderung 54
Abb. 18 Hemmung der Proliferationsrate in Abhängigkeit des Expressionsstatus von *SLC31A1*..... 55
Abb. 19 Beziehung der Oxaliplatin-vermittelten Effekte auf die SLC31A1-Transkription zu DNA-gebundenem Platin.. 55
Abb. 20 *SLC31A1*-Expressionsänderung durch Oxaliplatin in Abhängigkeit der Genvariante rs11793978 56
Abb. 21 Inter-Tag-Korrelationen der funktionellen Phänotypen 57
Abb. 22 Manhattan-Plots der Genom-weiten Assoziation mit V50..... 60
Abb. 23 Einfluss von SNP rs74382821 auf die Empfindlichkeit gegenüber Oxaliplatin 62
Abb. 24 Beziehung zwischen basaler Expression und den durch Oxaliplatin induzierten Veränderungen. 64

1 Einleitung

1.1 Chemische Struktur von Oxaliplatin

Oxaliplatin wurde 1996 zuerst in Frankreich als vielversprechendes Medikament zur Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms zugelassen(http://www.pharma-zeutische-zeitung.de). Chemisch handelt es sich um trans-L-(–)-Diaminocyclohexaoxalato-platin mit Komplexierung des Platins durch 1,2-Diaminocyclohexan (DACH) und einen Oxalat-Rest mit einem Molekulargewicht von insgesamt 397,3 Da.

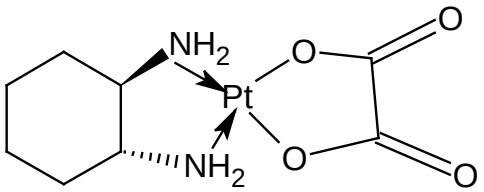


Abb. 1 Strukturformel von Oxaliplatin. Die Grafik wurde mit Hilfe der Software ChemSketch, Version 12.01 erstellt.

1.2 Klinische Indikationen

Oxaliplatin ist eine antineoplastische Substanz. Diese wird zur Erstlinien-Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms (CRC) im Stadium III und zur Zweitlinien-Therapie bei pankreatischen und gastroösophagealen Karzinomen eingesetzt (Kurian et al. 2012). *In vitro* wirkt es wachstumshemmend auf Cisplatin-und Carboplatin-resistente Zelllinien (Rixe et al. 1996).

Gegenwärtig stellt das CRC das Haupteinsatzgebiet von Oxaliplatin dar. Bei seiner klinischen Einführung war es das einzige der Platinderivate, das bei CRC Wirkung zeigte (Simpson et al. 2003). Auf diese Tumorentität entfielen im Jahr 2008 mit 65.000 Neuerkrankungen 14 % aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland. Bei Männern ist es die dritthäufigste und bei Frauen sogar nach Brustkrebs die zweithäufigste bösartige Krebserkrankung mit einer Letalität von 30.000 pro Jahr (www.rki.de).

1.3 Oxaliplatin-haltige Therapieschemata

Oxaliplatin wird beim CRC Stadien-abhängig in adjuvanter, neoadjuvanter und palliativer Indikation verwendet. Als Monotherapie ist es mit schlechter Ansprechrate verbunden und unwirksam, sodass stets eine Kombination mit anderen Substanzen angewandt wird. Typischer Kombinationspartner ist hierbei 5-Fluoruracil (5-FU), letzteres ggf. mit

zusätzlicher Gabe von Folinsäure gemäß dem FOLFOX-Schema (Goldberg et al. 2004). Neue Daten bezüglich einer Hinzunahme von Oxaliplatin zu 5-FU im Rahmen einer neoadjuvanten Radiochemotherapie deuten auf eine Verbesserung der lokoregionären Ansprechrate hin (Rodel et al. 2012). Eine andere Studie sah in diesem Zusammenhang keinen Vorteil für Oxaliplatin, jedoch signifikant mehr schwere Nebenwirkungen (Gerard et al. 2010). Möglicherweise profitiert nur eine Untergruppe von Patienten von einer Oxaliplatin-Behandlung, wofür jedoch bislang zuverlässige Biomarker fehlen. Als standardmäßige Alternative zu FOLFOX gilt der Austausch von Oxaliplatin durch Irinotecan (FOLFIRI). Neuerdings werden im Sinne einer aggressiveren Therapie beide Ansätze kombiniert (FOLFIRINOX). So konnten in einer kleinen Phase-II-Studie bei CRC mit initial irresektablen Lebermetastasen diese in den meisten Fällen nach FOLFIRINOX reseziert werden, mitunter sogar als R0 (Falcone et al. 2007; Ychou et al. 2008). Bei metastasiertem CRC wurde vor kurzem an einer kleinen Stichprobe auch die zusätzliche Gabe des Antikörpers Cetuximab zu FOLFIRINOX (ERBIRINOX) erfolgreich getestet (Assenat et al. 2011).

Am intensivsten untersucht ist FOLFIRINOX bislang beim Pankreaskarzinom. Hier zeigte dieses Regime gegenüber dem Standard Gemcitabin Vorteile in der Überlebenszeit, ging jedoch auch mit höheren Toxizitäten einher (Conroy et al. 2011; Hosein et al. 2012; Peddi et al. 2012). Wegen der vermehrten Toxizität sollte das FOLFIRINOX-Schema eher bei Patienten mit gutem Allgemeinzustand angewandt werden, wobei dann offenbar eine höhere Lebensqualität als mit Gemcitabin erzielt werden kann (Gourgou-Bourgade et al. 2013).

1.4 Toxizität

Wie bei den meisten klassischen Zytostatika können unter Oxaliplatin Blutbildveränderungen wie Neutropenien und Thrombozytopenien auftreten (James et al. 2009). Dies ist insbesondere bei Kombinationstherapien mit Substanzen, welche ein ähnliches Nebenwirkungsspektrum aufweisen, zu beachten und erfordert intensive Blutbildkontrollen. Weiterhin kann es zu gastrointestinalen Beschwerden (Durchfälle, Erbrechen) kommen (Andre et al. 2004). Die Nephrotoxiziät von Oxaliplatin ist hingegen im Vergleich zu Cisplatin praktisch vernachlässigbar und es kommt normalerweise auch bei Niereninsuffizienz nicht zu einer merklichen Akkumulation im Plasma. Aus Japan wurde berichtet, dass sich bei einem 77-jährigen Patienten die bereits bestehende Niereninsuffizienz nach wiederholten Oxaliplatin-Gaben verschlechtert hat (Kawazoe et al. 2010). Aus

Sicherheitsgründen rät der Hersteller von der Anwendung von Oxaliplatin ab, wenn die Kreatinin-Clearance unter 30 ml/min liegt (Hind et al. 2008).

Typisch für Oxaliplatin sind akute distal sensorische und motorische Störungen, welche mit 60-90% sehr häufig nach der ersten Applikation auftreten und durch Kälte getriggert oder verschlimmert werden. Diese äußern sich in unwillkürlichen Muskelzuckungen, tetanischen Muskelkrämpfen, verlängerten Muskelkontraktionen und Missempfindungen in den Extremitäten und im perioralen Bereich. Binnen 14 Tagen bilden sich diese Reaktionen meist komplett zurück (Gamelin et al. 2002; Schulze et al. 2011). Neben diesen neurotoxischen, vermutlich durch Störung Spannungs-abhängiger Natriumkanäle bedingten Akutreaktionen kann es – ähnlich wie bei Cisplatin – in bis zu 30% der Fälle auch zu einer Dosis-abhängigen kumulativen sensorischen Neuropathie kommen. Diese manifestiert sich nach kumulativen Dosen zwischen 750-850 mg/m^2 bei 10-15% der Patienten, wobei typischerweise über Parästhesien und Dysästhesien in den Extremitäten geklagt wird (Saif und Reardon 2005). Nach Absetzen von Oxaliplatin klingen auch diese Symptome nach 6 bis 12 Monaten in der Regel wieder ab (Grothey 2003). Während der Therapie können die neurotoxischen Effekte mitunter eine Dosisreduktion, Therapiepausen oder einen Substanzwechsel erfordern.

1.5 Pharmakokinetik

Beim CRC im Stadium III werden in der adjuvanten Phase 12 Zyklen einer FOLFOX-Chemotherapie empfohlen (www.krebsgesellschaft.de/s3_II_kolorektales_karzinom_2008). In den gängigen FOLFOX-Schemata (FOLFOX4/FOLFOX6) wird Oxaliplatin jeweils an Tag 1 eines 14-tägigen Zyklus intravenös mit 85 mg/m² Körperoberfläche verabreicht. Die Substanz wird als Puder geliefert und muss kurz vor ihrer Verwendung in sterilem Wasser gelöst werden (keine Chlorid-haltigen Lösungen). Bei dieser Applikationsweise wird gegen Ende einer 2-4-stündigen Infusion eine maximale Konzentration an freiem Oxaliplatin von ca. 1 µM (Burz et al. 2009) bzw. 2 µM (Fachinformation Eloxatin, Fa. Sanofi-Aventis) erreicht. Bei der höheren Dosis von 130 mg/m² betragen diese Werte 2-3 µM. Die entsprechende AUC (*area under the curve*) über 48 h beläuft sich auf ca. 10 µM*h (bei 85 mg/m²) bzw. ca. 20 µM*h (bei 130 mg/m²). Zwei bis fünf Stunden nach der Infusion ist der größte Teil des applizierten Platins (ungefähr 85%) an Plasmaproteine gebunden (Gamelin et al. 1997; Kelland und Farrell 2000). Die Elimination von ultrafiltriertem und Gesamtplatin ist biphasisch und wird bei einer dreiwöchig verabreichten Dosis von 130 mg/m² mit 26 min und 38,7 h für Gesamtplatin bzw. 21 min und 24,2 h für ultrafiltriertes Platin angegeben (Extra et al. 1998). Im Unterschied zu Cisplatin tritt bei Oxaliplatin keine Kumulation der freien oder

Protein-gebundenen Substanz ein, jedoch kommt es zu einer verlängerten Retention von Oxaliplatin in Erythrozyten, was u.a. zu dessen toxischen Effekten beitragen dürfte (Gamelin et al. 1997). Nach 48 h ist über die Hälfte der applizierten Substanz renal ausgeschieden (Kelland und Farrell 2000; Takimoto et al. 2003). Zwischen Oxaliplatin und seinem wichtigsten Kombinationspartner 5-FU scheint es keine relevante pharmakokinetische Interaktion zu geben (Joel et al. 2004).

1.6 Transmembranärer Transport

Damit Oxaliplatin antiproliferativ wirken kann, muss es in die Zelle aufgenommen werden. Es ist bekannt, dass Kupfertransporter wie *SLC31A1*, *SLC31A2*, *ATP7A* und *ATP7B* wesentlich mit der Zytotoxizität von Platinverbindungen korrelieren (Abada et al. 2012; Holzer et al. 2004a; Lin et al. 2002; Safaei und Howell 2005; Samimi et al. 2004a; Samimi et al. 2004b). Bei den *SLC31* handelt es sich um Einwärts-, bei den *ATP7* um Auswärts-Transporter.

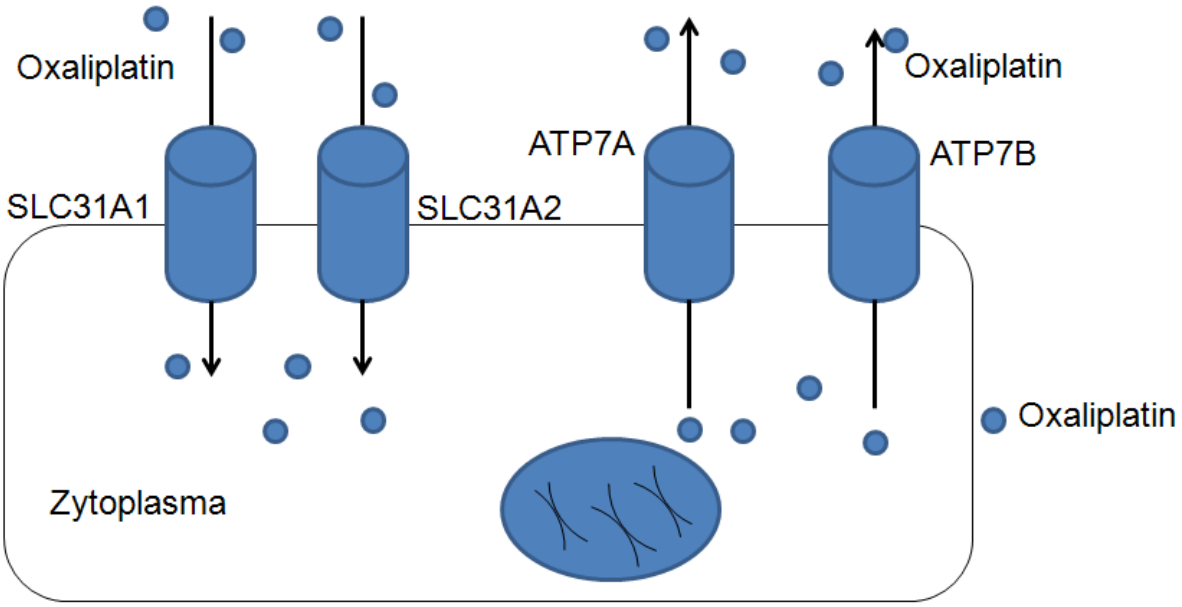


Abb. 2 Import und Export von Oxaliplatin über verschiedene Transporter

1.6.1 Import

Der *SLC31A1* (*CTR1*, *copper transporter 1*) ist ein Influx-Transporter nicht nur für Kupfer, sondern auch für Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin (Holzer et al. 2006; Larson et al. 2009). Dieser wird in vielen menschlichen Organen exprimiert, am stärksten in der Leber, und relativ schwach in Hirn- und Skelettmuskelzellen (Zhou und Gitschier 1997). Der *SLC31A1*-

Transporter besteht aus 120 Aminosäuren und enthält drei transmembranäre Segmente (Moller et al. 2000). In aktiver Form bildet er ein Homotrimer (Guo et al. 2004).

In unterschiedlichen Zelltypen findet sich ein differenzielles Lokalisationsmuster des *SLC31A1* (Klomp et al. 2002). Versuche mit indirekter Immunfluoreszenz in Zervix-karzinomzellen (HeLa) lokalisierten den Transporter in zytoplasmatischen Kompartimenten, während sich kein Nachweis in der Plasmamembran zeigte. Auch in Zellen des hepato-zellulären Karzinoms (HepG2) sowie in Lungenkarzinomzellen (A559 und H441Zelllinien) wurde der Transporter überwiegend intrazellulär nachgewiesen. Chorion-Karzinomzellen (BeWo-Zelllin) zeigten den *SLC31A1*-Transporter teilweise in der Plasmamembran, aber überwiegend in perinukleären Kompartimenten. In Kolonkarzinomzellen (Caco-2 und HT29-Zelllinien) hingegen war dieser Transporter überwiegend in der Plasmamembran exprimiert, jedoch auch geringfügig in zytoplasmatischen Kompartimenten. Dies könnte ein Grund für die klinische Sensitivität von Kolonkarzinomzellen gegenüber Oxaliplatin sein. Im Unterschied zu Cisplatin und Carboplatin, welche durch Interaktion mit dem *SLC31A1* die den Platin-komplexierenden Liganden verlieren, bleibt bei Oxaliplatin der Diamino-cyclohexan-Ligand mit dem Platin komplexiert (Crider et al. 2010).

Massenspektrometrische Untersuchungen ergaben, dass die transporterabhängige Oxaliplatin-aufnahme abnahm, je höher die Oxaliplatinkonzentration war. Offenbar sind auch andere Mechanismen am Import beteiligt (Holzer et al. 2006). Dabei gibt es auch Hinweise auf passive Diffusion von Platin-Komplexen in die Zelle (Binks und Dobrota 1990; Hromas et al. 1987). Dass Oxaliplatin direkt durch den *SLC31A1* ohne Beteiligung weiterer transmembranärer Prozesse aufgenommen wird, ist auch deswegen unwahrscheinlich, da bereits das kleinere Cisplatin zu groß für die Poren des *SLC31A1*-Homotrimers ist (Aller et al. 2004). Möglicherweise findet zunächst eine extrazelluläre Bindung der Platinsubstanz an den *SLC31A1* statt mit anschließender endozytotischer vesikulärer Aufnahme; in diesen Prozess könnte der *SLC31A1* involviert sein (Blair et al. 2009).

Der *SLC31A2* hat starke strukturelle Homologie zum *SLC31A1 (Blair et al. 2009).* In Säugetierzellen findet sich der *SLC31A2* primär in endosomalen und lysosomalen Kompartimenten, in einigen Zellen (z.B. COS-7) auch in der Plasmamembran und bildet dabei Multimere, zum Teil zusammen mit *SLC31A 1* lokalisiert (van den Berghe et al. 2007).

Die Hemmung der Substanz-Aufnahme durch *SLC31A2* war bei Kupfer, jedoch nicht bei Cisplatin und Carboplatin (für Oxaliplatin nicht untersucht) von einer Interaktion mit *SLC31A1* abhängig (Blair et al. 2009). Vertiefende Untersuchungen weisen darauf hin, dass die durch *SLC31A2* reduzierte zelluläre Aufnahme von Cisplatin teilweise über eine

Beeinflussung der Makropinozytose, eine Clathrin-vermittelte Endozytose, bedingt sind (Blair et al. 2011).

Weiterhin wurden Kationentransporter beschrieben, die die Oxaliplatinaufnahme beeinflussen: *OCT1, OCT2, OCT3* (basolaterale organische Influx-Kationentransporter). Die Expression von *OCT1* (*organic cation transporter 1*) war in kolorektalen Zellen positiv mit der Sensitivität gegenüber Oxaliplatin korreliert (Kitada et al. 2008). Cisplatin stellt im Gegensatz zu Oxaliplatin kein Substrat für den *OCT3*-Transporter dar (Yonezawa et al. 2006). *OCT2* wird unter anderem in der Leber, im Dünndarm und in der basolateralen Membran der Nierentubuli exprimiert. Es vermittelt den Transport von organischen Kationen, wenn der einwärts gerichtete Gradient ausreichend hoch ist (Gorboulev et al. 1997). *OCT3* wird überwiegend im Intestinalbereich exprimiert (Kekuda et al. 1998), was zur höheren Sensitivität von Kolonkarzinomzellen gegenüber Oxaliplatin verglichen mit Cisplatin beitragen könnte.

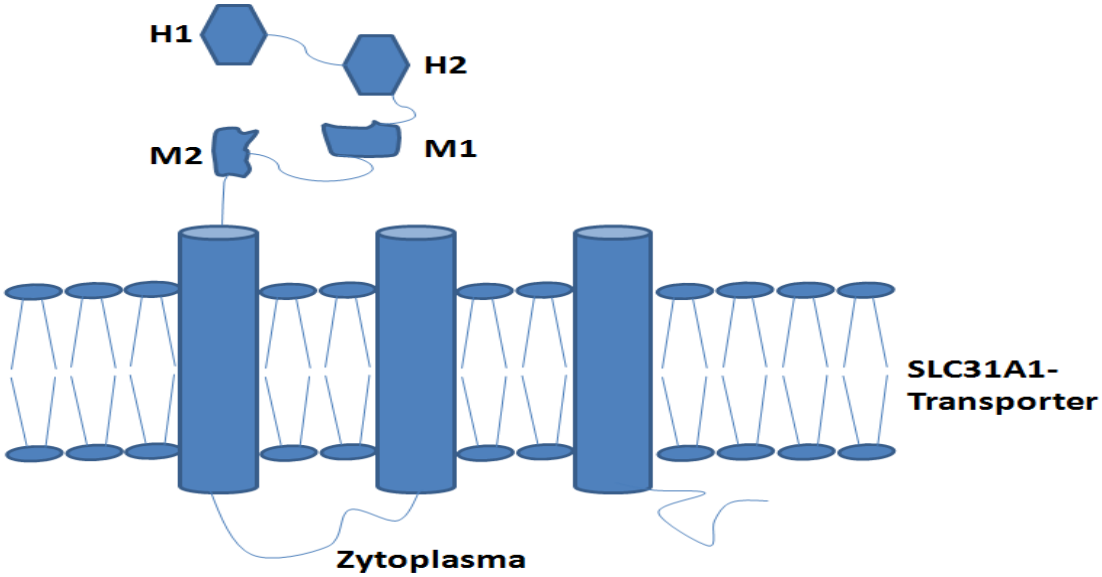


Abb. 3 Schematische Struktur des SLC31A1-Transporters. Modifiziert nach Roohangiz Safaei (Safaei 2006).

1.6.2 Export

ATPase-Transporter wie *ATP7A* und *ATP7B* wurden als Kupfer-Efflux-Transporter beschrieben, die aber offenbar auch die Akkumulation von Oxaliplatin in Zellen verhindern und damit zur Resistenz gegenüber Oxaliplatin beitragen können (Safaei 2006). In kolorektalen Zellen zeigte sich eine inverse Beziehung zwischen der Expressionsstärke von *ATP7A* und *ATP7B* und der Empfindlichkeit gegenüber Oxaliplatin (Kitada et al. 2008). In der klinischen Beobachtung scheint der *ATP7B*-Transporter ein wichtiger Resistenzfaktor für

Cisplatin zu sein. Mit *ATP7B*-Inhibitoren im Rahmen einer Cisplatin-Behandlung konnte bei ovariellem Karzinom effektiv einer Resistenz entgegengewirkt werden (Nakayama et al. 2002).

In den proximalen Nierentubuluszellen kommen *OCT1* und *OCT2* in der basolateralen sowie *MATE1* und die Nieren-spezifische Spleißvariante *MATE2-K* (Komatsu et al. 2011) in der apikalen Membran vor. Es könnte sich dabei um Transporter handeln, die an der tubulären Sekretion von Oxaliplatin beteiligt sind. Gleichzeitig könnten sie eine entscheidende Rolle spielen bei der Verteilung und Toxizität von Oxaliplatin im Körper (Yonezawa et al. 2006).

1.7 Zytotoxische Wirkung

1.7.1 Interaktion mit DNA

Wie bei anderen Platinderivaten beruht die wachstumshemmende Wirkung von Oxaliplatin auf der Bildung von DNA-Platin-Addukten, die letztlich zum programmierten Zelltod führen. Vergleichbar mit Carboplatin und Cisplatin bindet Oxaliplatin bevorzugt in GC-reichen Regionen der großen DNA-Furche. Art, Häufigkeit und Lokalisation der Addukte scheinen sich zwischen den Platinderivaten nicht zu unterscheiden (60-65% Intrastrang GG, 25-30% Intrastrang AG, 5-10% Intrastrang GNG und 1-3% Interstrang (Sharma et al. 2007). Obwohl nach Verabreichung gleicher Konzentrationen Cisplatin mehr Platinaddukte bildet, kommt es bei Oxaliplatin häufiger zu Strangbrüchen. Die höhere Zytotoxizität basiert wohl auf dem großvolumigen Diaminocyclohexan (DACH) des Oxaliplatins, dessen DNA-Addukte sperriger sind (Raymond et al. 2002). Deshalb braucht Oxaliplatin weniger Platin-DNA-Addukte als Cisplatin, um Apoptose auszulösen (Faivre et al. 2003).

Kristallographisch konnte gezeigt werden, dass die durch Oxaliplatin und Cisplatin gebildeten Platin-GG-Addukte an die große Furche der DNA binden, diese verengen und ihre Polarität vermindern. Dies hat zur Folge, dass aus der ursprünglichen B-DNA eine A-DNA-ähnliche Struktur resultiert. Neben weiteren Parametern unterscheiden sich B- und A-DNA insbesondere in der Geometrie der großen und kleinen Furche. Bei Cisplatin ist der verengende Effekt auf die große Furche relativ zu Oxaliplatin geringer; obwohl diese Unterschiede eher diskret sind, wird ein Zusammenhang mit der DNA-Reparaturfähigkeit vermutet, welche Cisplatin-Läsionen leichter erkennen und reparieren kann als Oxaliplatin (Scheeff et al. 1999). Auf diese Aspekte wird weiter unten im Kapitel 1.8 eingegangen. Nicht reparierte Strangbrüche wurden mit der Nukleotid-Sedimentationsmethode beobachtet (Faivre et al. 2003). Ein wesentlicher Grund für die relativ stärkeren Schäden bei Oxaliplatin dürfte auch sein, dass dieses über die NH_2-Gruppe seines DACH-Liganden eher am O-6-Atom der

3'-Guanin-Base bindet, wohingegen Cisplatin vorwiegend Addukte an 5'-Position eines Basenpaares bildet. Daraus resultieren Unterschiede in der Proteinerkennung und Schadensbehebung (Todd und Lippard 2009). Mit dem Ausmaß der DNA-Schädigung steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Apoptose ausgelöst wird bzw. die Proliferation der Zellen gehemmt wird.

1.7.2 Induktion von Apoptose und Proliferationshemmung

Bei Versuchen mit HCT116-Kolonkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass Oxaliplatin eine Proliferationshemmung in den Phasen G2/M bewirkt. Zugleich wurde das pro-apoptotische Bax-Protein in die Mitochondrien transloziert und Protein C ins Zytosol freigesetzt. Letzteres hatte eine Aktivierung der Caspase 3 und somit die Einleitung der intrinsischen Apoptose zur Folge (Arango et al. 2004). Der enge Zusammenhang mit der Bax-vermittelten Apoptose wurde dadurch erhärtet, dass Frameshift-Mutationen in der G8-Region von Bax zur Resistenz gegenüber Oxaliplatin bei HCT116-Zelllinien führen können (Gourdier et al. 2002). Im Gegensatz dazu wurde in HCT15-Kolonkarzinomzellen nicht der intrinsische, sondern der extrinsische Apoptoseweg durch Oxaliplatin aktiviert. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Oxaliplatin-induzierte Apoptose Zelltyp-abhängig ist (Marchetti et al. 2004).

1.7.3 Interaktion mit RNA

Platin-Addukte interferieren auch mit der RNA-Synthese. Dabei werden drei Hypothesen angenommen: Vor Start der Transkription können Platin-DNA-Addukte mit Transkriptionsfaktoren interagieren und somit deren eigentliche Bindung am Promotor verhindern. Addukte im Bereich von Nukleosomen, durch Histone verpackte DNA-Abschnitte, blockieren die RNA-Polymerase, sodass diese nicht an die DNA-Matrize binden kann. Nach initiierter Transkription stören Basen mit Platin-Addukten, da diese nicht in das aktive Zentrum der RNA-Polymerasen passen (Alcindor und Beauger 2011). In diesem Zusammenhang konnte belegt werden, dass die zytotoxische Effizienz der Platinkomplexe mit der Hemmung der RNA-Synthese korreliert (Sandman et al. 1999).

1.8 Reparatur von DNA-Addukten

Beim kolorektalen Karzinom entfallen ca. 15-20% der Fälle auf Tumore mit einer sogenannten Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) als Ausdruck einer MMR (*mismatch repair*)-Defizienz (Aaltonen et al. 1998; Hampel et al. 2005). Etwa 80% dieser Subentität sind durch

epigenetische Veränderungen in der Promotorregion des *MLH1*-Gens bedingt, ca. 20% durch erbliche Genpolymorphismen in Genen des MMR-Systems; letztere Gruppe wird auch als hereditäre non-polypöse Form (HNPCC) des kolorektalen Karzinoms oder als Lynch-Syndrom bezeichnet. Das MMR zusammen mit DNA-Schaden-Erkennungsproteinen und transläsionären DNA-Polymerasen kann offenbar zwischen Platin-GG-Addukten, die cis-Diamin-Liganden enthalten (gebildet durch Cisplatin und Carboplatin), und trans-RR-Cycloaminohexan-Liganden (gebildet durch Oxaliplatin) unterscheiden. Hier könnte eine Erklärung für die unterschiedliche Toxizität und Wirkung liegen (Sharma et al. 2007). Im Falle von Cisplatin und Carboplatin ist bekannt, dass dessen Platinaddukte vom MMR erkannt werden. Es kommt daraufhin über Aktivierung der JNK-Kinase zur Einleitung von Apoptose (Fink et al. 1997). Die zytotoxische Wirkung ist hier von einem funktionierenden MMR-System abhängig. Dies erklärt, warum MMR-defiziente Zellen gegenüber diesen beiden Platinderivaten resistenter sind. So zeigten Versuche mit Kolonkarzinomzellen (HCT116+cH2), die *MLH1*-defizient waren, eine 2,1-fache Resistenz gegenüber Cisplatin und eine 1,3-fache gegenüber Carboplatin verglichen mit dem *MLH1*-Wildtyp. Bei *MSH2*-defizienten endometrialen Zellen (HEC59) zeigte sich eine 1,8-fache Resistenz gegenüber Cisplatin und eine 1,5-fache Resistenz gegenüber Carboplatin verglichen mit dem Wildtyp des *MSH2*. Für Oxaliplatin trifft dies nicht zu; hier hängt die Empfindlichkeit nicht von der Funktionalität des MMR-Systems ab (Fink et al. 1996).

Generell besteht keine Kreuzresistenz gegenüber Oxaliplatin bei Cisplatin-resistenten Zelllinien (Schmidt und Chaney 1993). Als essenziell für die Reparatur von Oxaliplatin-bedingten Schäden erwiesen sich vor allem Exzisionsreparaturenzyme (NER) wie das *ERCC1, ERCC2, ERCC5 und XPA (Arnould et al. 2003).* Das NER ist eines der größeren Reparatursysteme der Zelle und entfernt unter anderem sperrige, an der DNA-Helix haftende Addukte, wie sie auch von Oxaliplatin gebildet werden (Park et al. 2001; Shuck et al. 2008). *XPA* erkennt schon früh DNA-Läsionen und interagiert während der Reparatur mit *ERCC1*. Mutationen am *XPA,* die Interaktion mit *ERCC1* unmöglich machten, führten zu Verlust der DNA-Reparatur (Li et al. 1995). In diesem Zusammenhang wurde in Kolonkarzinomzellen aufgezeigt, dass erhöhte Expressionen an *ERCC1* und *XPA* negativ mit der Zytotoxizität von Oxaliplatin korreliert waren (Arnould et al. 2003). Ein anderes am NER beteiligtes Enzym ist das *ERCC5*. Es hat die Aufgabe, geschädigte DNA am 3'-Ende zu schneiden und ist an der Stabilisierung der Komplexe für Exzision und Reparatur beteiligt (Aboussekhra et al. 1995; Dunand-Sauthier et al. 2005; Hohl et al. 2007).

1.9 Genetische Prädiktoren

Zur Identifizierung medizinisch und biologisch relevanter Gene bzw. Genpolymorphismen kommen prinzipiell zwei Ansätze in Betracht: ein Kandidatengen-orientierter und ein Genom-weiter. Von einem Genpolymorphismus (SNP, *single nucleotide polymorphism*) spricht man, wenn die Frequenz des selteneren Allels mindestens 1% in der Allgemeinbevölkerung beträgt.

1.9.1 Kandidatengen-Ansatz

Beim Kandidatengen-Ansatz werden selektiv Gene untersucht, für die ein Zusammenhang mit den interessierenden klinischen oder funktionellen Parametern bekannt ist oder vermutet wird. Für die Wirksamkeit von Oxaliplatin kommen hierfür insbesondere Gene für dessen Transport (wie oben in Kapitel 1.6 beschrieben) und für die Reparatur der von diesem verursachten DNA-Schäden (v.a. Nukleotid-Exzisions-Reparatur, siehe Kapitel 1.8) in Frage. Dabei können sowohl deren Expression als auch darin enthaltene Genpolymorphismen einen Bezug zu den interessierenden Parametern haben.

Bezüglich der Transportergene für Oxaliplatin gibt es kaum Literaturdaten zu Genpolymorphismen. Lediglich eine vor kurzem erschienene Studie nennt eine Kombination zweier Genvarianten des *SLC31A1* als mögliche Resistenzmarker gegenüber Platin-haltiger Therapie (Xu et al. 2012a). Für Gene aus dem Bereich der Nukleotid-Exzisions-Reparatur gibt es dagegen in diesem Zusammenhang eine Reihe von Publikationen. Im Jahre 2001 konnte in einem der ersten Berichte dieser Art gezeigt werden, dass der Arg399Gln-Polymorphismus auf dem Exon 10 des *XRCC1*-Gens zur Resistenz von Kolontumorzellen gegenüber Oxaliplatin-basierter Therapie führt (Liu et al. 2013b; Stoehlmacher et al. 2001). In einer anderen Studie wurde der *XPD* (*ERCC2*)-Lys751Gln-Polymorphismus als Prädiktor für das Ansprechen auf eine Oxaliplatin-haltige Chemotherapie beschrieben (Park et al. 2001). Der Effekt dieses Polymorphismus auf den Therapieverlauf konnte später bestätigt werden, wobei sich zusätzlich ein Einfluss einer *ERCC1*-Genvariante fand (Ruzzo et al. 2007). Ein Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression von *ERCC1* und der Überlebenszeit von mit Oxaliplatin behandelten Patienten mit Stadium IV eines CRC war schon zuvor postuliert worden (Shirota et al. 2001). Weiterhin scheinen zwei Polymorphismen im Bereich des *ERCC5*-Gens einen Einfluss auf den Erfolg einer Oxaliplatin-Therapie zu haben (Chen et al. 2009). Einer neueren Studie zu Folge könnte in diesem Rahmen auch eine Genvariante im zur Basen-Exzisions-Reparatur gehörenden *XRCC1* bedeutsam sein (Huang et al. 2011). In einer neueren Studie mit 98 Patienten war kein Polymorphismus in den Genen *ERCC1* und *ERCC2* mit dem Therapieansprechen auf Oxaliplatin assoziiert (Farina Sarasqueta et al. 2011).

Insgesamt ist die Studienlage zur Beeinflussung der Oxaliplatin-Sensitivität durch genetische Polymorphismen uneinheitlich, nicht selten sind die Ergebnisse widersprüchlich.

1.9.2 Genom-weiter Ansatz

Bei einer „*genome wide association study*“(GWAS) werden Marker über das Genom hinweg auf Assoziationen geprüft. Dieses Vorgehen war in den vergangenen Jahren die Domäne von SNP-Arrays, welche eine bestimmte Zahl genetischer Marker enthalten (zuletzt bis ca. 1 Million). Seit jüngster Zeit kann mit neuen Sequenzierungstechniken in relativ kurzer Zeit sogar das Genom komplett analysiert werden. Das Ziel besteht jeweils darin, genetische Marker zu identifizieren, die beispielsweise an einer Erkrankung beteiligt sein oder das Therapieansprechen auf bestimmte Medikamente beeinflussen können.

Zur Identifikation von SNPs zur Prädikation der Toxizität bei FOLFOX-Therapie wurden kürzlich die Daten eines Genom-weiten Ansatzes publiziert (Fernandez-Rozadilla et al. 2013). Das initiale Trainingsset, an welchem ca. 900.000 SNPs analysiert wurden, umfasste jedoch mit 221 Patienten eine für diese Fragestellung sehr kleine Fallzahl. In einer anschließend von den Autoren durchgeführten Replikation der 50 stärksten Assoziationen in 791 weiteren Patienten erbrachte, wenn man die Kriterien des Multiplen Testens anwendet, keinen eindeutig signifikanten Befund.

In einer anderen Studie wurde zur Identifizierung klinisch relevanter genetischer Loci, u.a. für Oxaliplatin, eine Kombination aus Genom-weiter *in vitro*-Sensitivitätstestung und nachfolgender Überprüfung der stärksten Assoziationssignale in einer klinischen Kohorte gewählt (Kim et al. 2010). Dabei fanden die Autoren für den SNP *EPHA7* rs2278107 bei Homozygotie des häufigeren Allels eine schlechtere Tumorkontrolle bei Behandlung mit Oxaliplatin, welche nominal signifikant mit $p = 0{,}014$ war; einschränkend muss hier jedoch darauf hingewiesen werden, dass die klinische Gruppe nur 36 Patienten umfasste.

Aus pharmakologischer Sicht erscheinen lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) als ein mögliches Modell zur Analyse von Dosis-Wirkungs-Beziehungen und anschließender Assoziationstestung mit Genotypen, sofern die Limitationen dieses Ansatzes bedacht werden (Stark et al. 2010). Einen Einfluss auf die Zytotoxizität von zu testenden Substanzen weist dabei insbesondere die Heterogenität der basalen Proliferationsrate, welche zu einem erheblichen Teil genetisch determiniert ist, nicht jedoch die der EBV-Kopienzahl oder der ATP-Spiegel auf. Für Cisplatin wurde die induzierte Zytotoxizität in LCLs gemessen und mit Expressionsdaten und Genvarianten in Beziehung gesetzt (Huang et al. 2007). In einer Metaanalyse wurden diesbezüglich jüngst die stärksten genetischen Marker für Sensitivität gegenüber Cisplatin und Carboplatin zusammengestellt (Wheeler et al. 2013), wobei die

Daten für diese beiden Platinderivate sehr divergent sind. Für Oxaliplatin gibt es noch keine vergleichbaren Untersuchungen. Zuvor waren bereits 4728 Stämme von Saccharomyces cerevisiae mit individueller Deletion aller nicht-essenziellen Gene auf Empfindlichkeit u.a. gegenüber Oxaliplatin getestet worden (Wu et al. 2004). Die stärksten Zusammenhänge ergaben sich dabei für Gene aus dem Bereich der Nukleotid-Exzisionsreparatur.

1.10 Zielsetzung

Aus dem in der Einleitung dargelegten aktuellen Stand der Wissenschaft war es das Ziel meines Dissertationsvorhabens, Biomarker für die Zytotoxizität von Oxalipatin zu identifizieren. Die dazu bislang in der Literatur verfügbaren, sehr heterogenen Daten sind wenig valide und klinisch gegenwärtig nicht verwendbar. Um zu robusten Aussagen zu gelangen, ist ein großer Stichprobenumfang erforderlich. Das Studiendesign sollte neben einem Trainingsset mindestens ein Testset enthalten. Als Untersuchungsmaterial standen zwei Sets an lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) zur Verfügung, welche als Modell für sich schnell proliferierenden Zellen dienten. Das Trainingsset stellte dabei 104 kommerziell erworbene LCLs dar, welche Genom-weit genotypisiert bzw. sequenziert sind. Das Testset umfasste 94 LCLs, welche von Patienten im Rahmen einer Studienteilnahme gewonnen wurden. An diesen LCLs sollte über Dosis-Wirkungs-Beziehungen die Zytotoxizität von Oxaliplatin als Vitalitätsminderung, Proliferationshemmung und DNA-gebundenes Platin ermittelt und mit der Expressions- und genetischen Variabilität dieser Zellen in Beziehung gesetzt werden. Für letztere sollte sowohl ein Kandidatengen- als auch ein Genom-weiter Ansatz verfolgt werden. Die stärksten Assoziationen in der Trainingsstudie sollten dann in der Teststudie überprüft werden. Dabei stellten sich im Einzelnen folgende Fragen:

1. Wie groß ist das Ausmaß der zytotoxischen Variabilität von Oxaliplatin in dem zu untersuchenden LCL-Kollektiv?
2. Sind die zu erhebenden funktionellen Parameter „Zellvitalitätsminderung“, „Proliferationshemmung“ und „DNA-gebundenes Platin“ miteinander korreliert?
3. Ist die Expression von Kandidatengenen für Oxaliplatin-Transport bzw. DNA-Reparatur mit der Zytotoxizität verknüpft? Und wenn ja, gibt es hierfür determinierende Genvarianten?
4. Lassen sich aus einer Genom-weiten Assoziationsanalyse Biomarker identifizieren, welche dann in einem Testset bestätigt werden können?

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Accu-jet®	Brand, Wertheim
Autoklav	KSG Sterilisatoren, Olching
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biophotometer 6313	Eppendorf, Hamburg
Elektrophorese-Kammer (ComPhor L Mini-Gelkammer)	Biozym, Hessisch Oldendorf
FACS-Gerät: BD LSRII	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Feinwaage BL 610	Sartorius, Göttingen
Fluor-S™ MultiImager (für Gelfotografie)	BioRad, Hercules USA
Inkubator: Function line	Heraeus, Hanau
Inkubator: New Brunswick Galaxy 170 S	Eppendorf, Hamburg
Kühlschrank VIP Series –86°C	Sanyo Electric Co Ltd., Japan
Magnetrührer: 2 mg magnetic motion	
Magnetrührer (IKAMAG RET)	IKA, Staufen
Mikroliter-Küvette für Photometer (LabelGuard™)	Implen, München
Mikroskop Telaval31	Zeiss, Jena
Mikrowelle MWS 2820	Bauknecht, Schorndorf
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Netzteil für Elektrophoresekammer Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen
PCR-Gradienten-Cycler (384-Well), Typ Master-Cycler	Eppendorf, Hamburg
PCR-Gradienten-Cycler (96-Well), PTC-200 Peltier	MJ Research/BioRad, Hercules, USA
pH-Meter CG822	Schott Geräte
pH-Meter PB-11	Sartorius, Göttingen
Pipetten (0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl) Typen *Research* und *Reference*	Eppendorf, Hamburg
PTC-200 Peltier Thermal Gradient Cycler	MJ Research/BioRad, Hercules, USA

Rahmen und Septen für Sequenzierer	Applied Biosystems, Darmstadt
Roboter (QiaCube) für Nukleinsäuren-Isolierung	Qiagen, Hilden
Sequenzierer 3130 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Sequenzierplatten	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterilbank-Clean Air type DFL/REC4 KL 2A	Mahl, Trendelburg
Sterilbank-Clean Air EN12469	Kranich Göttingen
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
TaqMan® 7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer (MS 2 min*ishaker*)	IKA, Staufen
Vortexer (Test tube shaker value unit)	www.laworld-online.com, USA
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Wasserbad GFL 1083	Schütt, Göttingen
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Multifuge X3R Heraeus, Thermo scientific)	Heraeus, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	**Hersteller**
Einweg-Pasteurpipetten, Glas, 230 mm	Brand, Wertheim
Einweg-Pasteurpipetten, Kunststoff, 3 ml	Roth, Karlsruhe
Filter: 50 µm Cup Filcons	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Mehrkanal-Pipette (8er) 0,5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
PCR-Folien (Adhesive PCR Foil Seals)	Abgene, Epsom
Pipetten, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen RNase-, DNase-frei (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Kisker, Steinfurt
Platten, 6-Well steril für Zellkultur	Nunc, Roskilde, Dänemark

Platten, Thermo fast 384-Well	Abgene, Epsom
Platten, Thermo fast 96-Well	Abgene, Epsom
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
RNase-freie 96 Multiply PCR Platte natur	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 5 ml für FACS	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Röhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spitzen für Multipipette plus (Combitip plus 0,1, 0,2, 0,5, 1,0, 2,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spitzen für Multipipette plus, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Streifen (8er) für PCR-Platten	Abgene, Epsom
TaqMan Adhesive Optical Covers	Applied Biosystems, Darmstadt

2.3 Chemikalien

Chemikalie	**Hersteller**
100 bp-Leiter	Rapidozym, Berlin
Agarose *Ultra Pure*	Invitrogen, Karlsruhe
Anodenpuffer (für Sequenzierer)	Applied Biosystems, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Eloxantin® 5mg/ml (Oxaliplatin)	Sanofi-Aventis
Ethanol	J. T. Baker, Phillipsburg, USA
Ethidiumbromid (1% in H_2O)	Merck, Darmstadt
FACS Flow / Rinse / Safe	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
GeneScan™ LIZ® 120 Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt
HiDi-Lösung (mit Formamid)	Applied Biosystems, Darmstadt
Natriumchlorid	J. T. Baker, Phillipsburg, USA
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Polymer POP7 (für Sequenzierer)	Applied Biosystems, Darmstadt
Primer (Design nach gewünschter Sequenz, siehe Anhang)	MWG-Biotech, Ebersberg

Random Primer dN6	Roche, Mannheim
Ribonuklease-Inhibitor (RNA guard)	Amersham, Freiburg
RNAse-Zap	Sigma, St.Louis, USA

2.4 Enzyme und Kits

Kits	Hersteller
Exonuklease I	Fermentas, St. Leon-Rot
GoScript™ Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
qRT-PCR-Mastermix: HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus mit ROX	Solis Biodyne, Tartu, Estland
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	Fermentas, St. Leon-Rot
SNaPshot™-Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt
TopTaq-DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden

2.5 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Abkürzung	Molarität
PBS-Puffer, pH 7,4	NaCl	128,5 mM
hergestellt als 10x-Konzentrat, 1x-Verdünnung mit NaOH eingestellt	KCl	2,8 mM
	Na_2HPO_4	8,1 mM
	KH_2PO_4	1,5 mM
TE-Puffer, pH 7,5, eingestellt mit HCl	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM

2.6 Zellkulturmedien

Lösungen und Puffer	Abkürzung	
RPMI Medium 1640	Gibco/Invitrogen,Karlsruhe	
LCL-Medium	RPMI	84%
	FCS (aus 100%)	15%
	Ampicllin/Streptomycin (aus 100x)	1%

2.7 LCLs

Für die Versuche wurden durch das Epstein-Barr-Virus immortalisierte B-Zellen lymphoblastoide Zellen (LCLs) verwendet. Bei diesen Zelllinien handelte es sich um

unverwandte Spender kaukasischen Ursprungs. Sie wurden vom Corriel Institue for Medical Research, Camden, New Jersey, USA kommerziell erworben.

2.8 Farbstoffe

2.8.1 CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester)

Dies ist ein Farbstoff, mit dem durchflusszytometrisch die Zellproliferation gemessen werden kann. Zur besseren Passage der Zellmembran wird an Acetatgruppen gekoppeltes CFSE verwendet. Dieses fluoresziert nicht. Nach passiver Diffusion in die Zelle werden die Acetatgruppen von einer unspezifischen zytosolischen Esterase gespalten. Das freigesetzte CFSE reagiert über seine Succinimidyl-Ester-Gruppe mit intrazellulären primären Aminen. Auf diese Weise wird der Carboxyfluorescein-Farbstoff mit intrazellulären Proteinen verbunden. Der Farbstoff kann damit die Zelle nicht mehr verlassen. Bei jeder Zellteilung wird ein Teil des Farbstoffs an die Tochtergeneration weitergegeben, sodass mit jeder Teilung die Intensität abnimmt und diese durchflusszytometrisch gemessen werden kann. Der Exzitationspeak liegt bei 492 nm, der Emissionspeak bei 517 nm. CFSE wurde von der Firma eBioscience bezogen (http://www.ebioscience.com/cfse.htm).

2.8.2 Vybrant Ruby®

Dies ist ein zellmembrangängiger Farbstoff, der selektiv an den DNA-Doppelstrang lebender Zellen bindet. Erst nach Bindung an DNA fluoresziert der Farbstoff nach Exzitation durch das FACS-Gerät bei 638 nm und Emission bei 686 nm. Somit ermöglicht Vybrant Ruby®, den DNA-Gehalt von Zellen zu bestimmen. Da der Zellzyklus in unterschiedliche Phasen unterteilt wird, die einen unterschiedlichen DNA-Gehalt aufweisen, können damit theoretisch auch Rückschlüsse auf Zellzyklusphasen der zu untersuchenden Zellen gezogen werden. Vybrant Ruby® wurde von der Firma Molecular Probes entwickelt, welche heute Teil von Invitrogen/LifeTechnologies ist (http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/References).

2.8.3 Sytox®

Sytox® ist ein Fluorochrom, das zur Darstellung toter Zellen angewendet wird. Intakte Zellmembranen lebender Zellen sind für diesen Farbstoff undurchlässig, während tote Zellen mit geschädigter Membran Sytox® aufnehmen. Intrazellulär fluoresziert dieses nach Bindung an DNA durch Emission blauen Lichtes bei 480 nm, nachdem es mit einem Violett-Laser (405 nm) angeregt wurde. Lieferant für Sytox® war ebenfalls die Firma Invitrogen/LifeTechnologies (http://products.invitrogen.com/ivgn/product/S34857).

2.9 Software

Adobe Photoshop: Bildbearbeitung

Paint: Bildbearbeitung

FACSDiva:

Für die visuelle Darstellung und Durchführung der durchflusszytometrischen Messungen angewandte Software.

Cyflogic Version 1.2.1:

Software mit gleicher Funktion wie FACSDiva zur visuellen Darstellung und Durchführung durchflusszytometrischer Messungen.

Quantity One S Version 4.2.1 (BioRad): Analysen von Gelläufen einschließlich der Bestimmung von Fragmentlängen

Cell-QuestVersion1.1.2™

Anhand dieser Software werden durchflusszytometrische Messungen des FACS-Scan Geräts visualisiert.

3100 Data Collection Software Version 1.0 (Applied Biosystems)

Ermöglicht die Ermittlung von Daten mit dem 3100 Genetic Analyser Sequenzierer

GeneScan Analysis Version 3.5.1 (Applied Biosystems)

Auswertung von DNA-Fragment-Analysen im Sequenzierer

HaploView-Software (http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview):

Software zur grafischen Aufbereitung von Daten aus genetischen Datenbanken.

MS Office

„Microsoft Word, Excel und Microsoft Powerpoint“ für Textverarbeitung, Präsentationen Tabellenkalkulation und Bildbearbeitung,

DesignPro5:

Software für die Beschriftung von Reagenzglas-Etiketten

CloneManager (Version 6.00) und Oligo (Version 6.58) d

Phase-Software (Version 2.1):

Software zum Berechnen der Haplotypen

SDS 2.1 (Applied Biosystems)

Auswertung von Expressionsmessungen, die mit dem TaqMan 9100 HT unternommen wurden.

SPSS Version 12.0

Grafische Darstellung von Messdaten und Testung auf mögliche Assoziationen.

SWEEP Version 1.0

Analyse von genetischen Selektionssignaturen

2.10 Datenbanken

NCBI (http://www.nih.gov/)

Diese Datenbank wurde für die Beschaffung von Informationen zu bestimmten Genen, mRNA und Proteinen genutzt, ebenso Wissen über bereits dokumentierte Polymorphismen.
dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/):

weltweit größte Datenbank zur genetischen Keimbahn-Variabilität beim Menschen

HapMap (http://www.hapmap.org/index.html.en)

2.11 Zelllinien

Insgesamt standen für meine Dissertation 198 lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) zur Verfügung. Diese unterteilten sich in ein Trainingsset von 104 und ein Testset von 94 LCLs. Bei LCLs handelt es sich um B-Lymphozyten, welche mit Epstein-Barr-Viren immortalisiert wurden.

2.11.1 Trainingsset mit 104 LCLs

Die 104 LCLs des Trainingssets waren vom Coriell-Institut (http://www.coriell.org/) bezogen worden. Für 100 dieser LCLs sind Genotypinformationen in der HapMap- und für 76 in der *1000 human genomes*-Datenbank verfügbar (für die Zuordnung der einzelnen LCLs siehe Tab. 1). Die HapMap-Daten wurden durch Chip-Arrays gewonnen mit Bestimmung von bis zu 4 Millionen über das Genom verteilter Genpolymorphismen. Die *1000 human genomes*-Daten enthalten zusätzlich Informationen durch komplette Genom-weite Resequenzierung. Die statistische Auswertung in Relation zu den Funktionsparametern erfolgte getrennt für das HapMap- und das *1000 human genomes*-Kollektiv.

Coriell ID #	HapMap-Analyse	*1000 human genomes*-Analyse
NA06984	ja	ja
NA06985	ja	nein
NA06986	ja	ja
NA06989	ja	ja
NA06993	ja	nein
NA06994	ja	ja
NA07000	ja	ja
NA07022	ja	nein
NA07034	ja	nein
NA07037	ja	ja
NA07051	ja	ja
NA07055	ja	nein
NA07056	ja	ja
NA07345	ja	nein
NA07347	ja	ja
NA07357	ja	ja
NA11829	ja	ja
NA11831	ja	ja
NA11832	ja	nein
NA11839	ja	nein
NA11840	ja	nein
NA11843	ja	ja
NA11881	ja	nein
NA11882	ja	nein
NA11892	ja	ja
NA11894	ja	ja
NA11918	ja	nein
NA11919	ja	ja
NA11920	ja	ja
NA11930	ja	ja
NA11931	ja	ja
NA11932	nein	ja
NA11933	nein	ja
NA11992	ja	ja
NA11993	ja	ja
NA11994	ja	ja
NA11995	ja	ja
NA12003	ja	ja
NA12004	ja	ja
NA12005	ja	nein
NA12006	ja	ja
NA12043	ja	ja
NA12044	ja	ja
NA12045	ja	ja
NA12046	nein	ja
NA12056	ja	nein
NA12057	ja	nein
NA12058	nein	ja
NA12144	ja	ja
NA12145	ja	nein
NA12146	ja	nein
NA12154	ja	ja
NA12155	ja	ja
NA12156	ja	nein

Coriell ID #	HapMap-Analyse	*1000 human genomes*-Analyse
NA12234	ja	nein
NA12239	ja	nein
NA12248	ja	nein
NA12249	ja	ja
NA12272	ja	ja
NA12273	ja	ja
NA12275	ja	ja
NA12282	ja	ja
NA12283	ja	ja
NA12286	ja	ja
NA12287	ja	ja
NA12341	ja	ja
NA12347	ja	ja
NA12348	ja	ja
NA12383	ja	ja
NA12399	ja	ja
NA12400	ja	ja
NA12489	ja	ja
NA12546	ja	ja
NA12717	ja	ja
NA12718	ja	ja
NA12748	ja	ja
NA12749	ja	ja
NA12750	ja	ja
NA12751	ja	ja
NA12760	ja	nein
NA12761	ja	ja
NA12763	ja	ja
NA12775	ja	ja
NA12776	ja	nein
NA12777	ja	ja
NA12778	ja	ja
NA12812	ja	ja
NA12813	ja	nein
NA12814	Ja	ja
NA12815	Ja	ja
NA12827	Ja	ja
NA12828	Ja	nein
NA12829	Ja	ja
NA12830	Ja	ja
NA12842	Ja	ja
NA12843	Ja	ja
NA12872	Ja	ja
NA12873	Ja	ja
NA12874	Ja	ja
NA12875	Ja	nein
NA12889	Ja	ja
NA12890	Ja	ja
NA12891	Ja	nein
NA12892	Ja	nein

Tab. 1 Zelllinien für die Trainingsstudie

2.12 Primer für Multiplex-PCR

rs-Nummer	PCR Primer, vorwärts (5'->3')	PCR Primer, rückwärts (5'->3')	FL (bp)	SNaPshot-Primer (5'->3')	µM
rs9411308	GTTTGGGTGTCTGCGTTGGGTAGA	TGAGCCCAGTGTTGCTCCTGATG	222	GAGCTGAGGGTGGCTGTGA	4
rs4294468	CACATCTCAAGTAGTGCCTGCCTCTGTAG	AATGTTGCTGCTTGATTGTTCCTCTAGAAC	302	ACTTTTGTCTCAGAGGACTACC	2
rs5007951	CCAGGGGTCCAAGAAAGGTGTGA	CTTTTGAGGGGTTCTCATTCTGGTTAGAAAG	310	TTTAGGTGTGTTACAGGAATGC	4
rs12606590	CTTTGCTGGGGGCTACTACGAGGT	CCGTCCTCTGAATCCATCCCTCTATG	92	CTTTGCTGGGGGCTACTACGAGGT	1
rs4236272	CCACAAGCGTCTGTGCCAGAATCTA	GCCGCCATCAGTCAGCAGTTG	72	CCACAAGCGTCTGTGCCAGAATCTA	1
rs1997735	AGAACTGGTCCATAAGAGGGAGCTTTG	AACCCACTGCTGAAATATGTTTAGCTTCTG	95	AACCCACTGCTGAAATATGTTTAGCTTCTG	1
rs7035616	GCATTAGCAGGGCGGAAGACATTC	CAGTTCTCAGCTATTTTGGCTTGACATGA	150	TCAATCAGCATCTATTAAAAGATCA	2
rs587503	GATAGAATGGGAGCCCAGACACTCTTC	CCAGTGTTTGTTTGGCTGATAGAGAAAGA	262	CTACACTTGAAAAATAAACTATGTTCTAAC	2
rs167677	CTAAAGCCTGGATGAGAGTCCCAGAGAG	CGCATTGAACTAAGTGACCCACAATGTAAC	262	GCATCTATAGTATCTGTAGAATGAGGCTAA	1
rs9648103	GACTGCCGCTGGAAGTCTTACTGATAATG	CCAAAGACACAAACAGGGTGAAAGTGAAG	497	GTCAACTATAATTGTTATATCTTTTGCTGT	10
rs4276397	TTCAACCAACGCAGGACCTGATTG	GGCTTGCCTGATAAGCATATGTGGATG	147	TGATTGAATTAAGGTGATCAGCC	2
rs1995016	TGGGCCAGAATAGCTTTGTTCCTCTTC	CCAGCAGCAACACCCAACAACCT	170	CAAACTTACCTCTTTTTTCTGAGTTTTTA	10
rs3951220	GCATAAATTTCACAGGGCCTATAAAACAG	GGATTGTATTATTTCCCTGTTGGACTTG	412	GTTCATCATGTTAGTTGTCTGAATAC	2
rs2144168	GCTGGGAAGAATAGGAAGAAGATGAAAAC	CCACTGACCTCCTTGGACTTGATATCTC	132	GGGATCTTCTGAGATGCAC	2
rs17164011	CAACCTCTATCTCACAGTTGCCAACATTC	TGAACATTAAAGGAGGCATTCTGACTGAG	278	CTAATGAAGAAACTGAAATTTGAAGT	2
rs4379359	AGGTCCCTGTGAACCTCGCTTGTAG	TGAGACGCCCGGAAAGTCTTTTG	129	AGTCTTTTGAAGTTGAAAACACTTTGAT	4
rs9379445	CCACCTTTGAGTTGAGTTTGAGCAAATG	GCTGGTGTAGCTGAAAGCTGTGATGTG	178	GGACAATAGCCACTACCCT	1
rs74382821	CTCCCACTCTGGCACTGAATAATGAAG	GGACTTTGCAGCCTCCAGAATTATTAGAAG	400	TGGACTTTTATTCCACACCTAG	2
rs1727893	CGGGAGGCTTGTGTGTGTTTATTGTG	GCAGGCTGGTGCCTAAGTAATGCTAAGTG	101	CAATCATGCTGCTTTCATTAAAT	2
rs9329099	GGGTAGCAACAGAAAAGTAATGCAATG	GTGGTTTGTTTATTCTCGCAGTTCTATC	1587	CTAAACAATCCAATTAAAAGGCAGA	10

Tab. 2 Primerliste für die Genotypisierung des Testsets mit PCR- und SNaPshot™-Primern. Die rs-Nummer der jeweiligen Genpolymorphismen bezieht sich auf die Datenbank dbSNP. Die Länge der jeweiligen PCR-Fragmente ist in Basenpaaren (bp) angegeben. Die für die SNaPshot-Primer genannte Konzentration [µM] bezieht sich auf den für die SNaPshot-Reaktion eingesetzten 10-fach konzentrierten Primermix.

2.13 Primer für qRT-PCR

Gen	Produktlänge [bp]	Primer, vorwärts	Primer, rückwärts	Quelle
Referenzgene				
B2MG	258	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC	CATGTCTCGATCCCACTTAAC	1
GAPDH	407	CCCTTCATTGACCTCAACTACAT	ACGATACCAAAGTTGTCATGGAT	2
HPRT1	93	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	2
UBC	123	CGGTGAACGCCGATGATTAT	ATCTGCATTGTCAAGTGACGA	3
Zielgene				
ATP7A	174	GACCTGCCATTCATGTACTAGC	ACAAATGCTGGAAAGCCCATA	4
ATP7B	105	AGCTGGTGTTCTCTCCGTGT	TCCTGGATGAACTGAGCTATCTC	4
ERCC2	94	GCCAAGGGTCATGGAGTCC	GCGGATATGCTCTCTGGTATGC	5
ERCC5	69	GAAGCGCTGGAAGGGAAGAT	GACTCCTTTAAGTGCTTGGTTTAACC	6
SLC31A1	151	GAATCTTCTGCTGACTCTCAACTTTTC	TGCTGTCTCCTCCACCATG	5

Tab. 3 PCR-Bedingungen für die einzelnen Gene der qRT-PCR. Links sind die untersuchten Referenzgene und Zielgene mit ihrer Basenpaarlänge (bp). Daneben befinden sich für die PCR die dazugehörigen Vorwärts- und Rückwärts-Primer in 5'->3'-Orientierung. Rechts sind die Quellen genannt: [1](Zembruski et al. 2011), [2] (Calcagno et al. 2006), [3](Cicinnati et al. 2008), [4]PrimerBank (http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html), [5]eigenes Design, [6](Bartolucci et al. 2009).

3 Methoden

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Dissertation angewandten Methoden beschrieben. Es werden dabei die Vorgehensweisen beschrieben, mit denen nach der Etablierungsphase die Messreihen durchgeführt wurden.

3.1 Lymphoblastoide Zelllinien (LCL)

Als Zellmodell für Zytotoxizität, Proliferationshemmung und DNA-Einlagerung von Oxaliplatin wurden LCLs verwendet. Die Zelllinien waren hinsichtlich des Zellzyklus asynchron, sodass die Färbung mit CFSE im FACS-Gerät einen breitbasigen Peak aufwies. Wie eine Studie über Proliferation von LCLs gezeigt hat, weisen LCL-Populationen eine erbliche und eine nicht-erblich bedingte individuelle Proliferationsgeschwindigkeit auf (Stark et al. 2010). Daher war es erforderlich, die basale Proliferationsrate ohne Zytostatikaeinfluss zu berücksichtigen.

3.2 Auftauen von LCLs

Die Zellen wurden bei -180 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Wegen des toxischen Effekts des 10%-igen DMSO im Einfriermedium auf die LCLs wurde beim Auftauen darauf geachtet, dass die Zellen, sobald der Inhalt des Kryoröhrchens mobil war, rasch in eine 50 ml-Kulturflasche mit 20 ml kaltem RPMI-Medium (4°C) überführt wurden. Anschließend wurden die LCLs für 7 min bei 300 g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in 10 ml warmes LCL-Medium resuspendiert und schließlich in kleine beschriftete Kulturflaschen überführt. Die Zellen wurden dann im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Abhängig vom Wachstum wurden die Zellen durch Zugabe von 10 ml LCL-Medium 1:1 passagiert, wobei die Passagenzahl notiert wurde. Wichtig war, dass eine Passagierung rechtzeitig vor Farbumschlag des roten Indikators im LCL-Medium erfolgte (eine Gelbfärbung weist auf einen sauren pH-Wert hin). Sobald die 20 ml Zellsuspension gut bewachsen waren, wurden diese in große 250 ml-Kulturflaschen überführt und durch Zugabe von 30 ml warmem LCL-Medium passagiert. Sobald in diesen Flaschen eine ausreichende Zellzahl erreicht war, konnte mit der Messreihe begonnen werden.

3.3 Zellzählung mit *Counting beads*

Die durchgeführten Versuche erforderten ca. 10 Millionen Zellen pro Zelllinie. Zur Bestimmung der Zelldichte wurden *Counting Beads* verwendet. Es handelt sich dabei um eine kalibrierte Menge von Mikrospheren in einer Lösung, von der eine vom Hersteller definierte Menge mit einer bestimmten Menge an Zellsuspension vermischt wird. Anschließend kann mit dem FACS-Gerät auf Basis der gezählten Beads und der lebenden Zellen die Zelldichte ermittelt werden.

Zunächst wurde die Zellsuspension in der Kulturflasche gut durchmischt, bis diese homogen war und dann sofort 150 µl davon in ein FACS-Röhrchen gegeben. Dann wurde 150 µl Färbelösung (enthielt 0,15 µl Vybrant Ruby® und 0,3 µl Sytox®) zu der 150 µl Zellsuspension hinzugefügt (Endfärbekonzentration für Vybrant Ruby® 1:2000 und für Sytox® 1:1000). Danach wurde diese Mischung bei 1400 rpm gevortext und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 20 µl *Counting Beads*-Lösung hinzugegeben. Dann erfolgte die Messung im FACS-Gerät, wobei solange Ereignisse gezählt wurden, bis 5000 Beads erreicht waren. Schließlich wurde die Zelldichte/ml mit folgender Formel abhängig von der Charge der Beads bestimmt: Zelldichte/ml = 2 x lebendige Zellen/5000 x Chargenspezifikations-zahl/300µl.

3.4 CFSE-Färbung

Die CFSE-Färbung wurde unmittelbar nach Zellzählung vorgenommen. Für die Bestimmung des erforderlichen Volumens der Zellsuspension wurde die benötigte Zellzahl durch die Zelldichte (Millionen Zellen/ml) dividiert. Das errechnete Volumen wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und 7 min lang bei 250 g zentrifugiert (Bremse/Beschleunigung 5), während die restliche Suspension weiter inkubiert wurde. Danach wurde der Überstand abgegossen, das Pellet in 3 ml PBS resuspendiert und mit 1 ml CFSE-Färbelösung (Konzentration 1:125; 1 ml PBS + 8 µl CFSE aus 10 mM-Stocklösung) gemischt, bei 1400 rpm für 5 s gevortext und sofort in den Brutschrank gestellt. Hier musste auf rasches Arbeiten und Lichtschutz geachtet werden. Nach 2,5 min Färbung wurde die Färbereaktion mit 10 ml kaltem LCL-Medium gestoppt. Nach erneutem Zentrifugieren für 7 min und Entnahme des Überstands wurde das Pellet in 50 ml LCL-Medium resuspendiert, dann in eine große Kulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37°C für 24 h inkubiert bevor die Zellen mit Oxaliplatin behandelt wurden.

3.5 Behandlung mit Oxaliplatin

Die Effekte von Oxaliplatin sollten in der exponentiellen Wachstumsphase der LCLs analysiert werden. Dazu wurden die LCLs 24 h nach der CSFE-Färbung nach erneuter Zellzählung (siehe Abschnitt 3.3) auf 200 000 Zellen/ml eingestellt. Davon wurde je 1 ml in die Wells einer 24-Well-Platte gegeben. Insgesamt wurden acht unterschiedliche Oxaliplatin-Konzentrationen und eine Kontrolle (nur mit LCL-Medium) angesetzt, jede Bedingung als Duplikat in zwei parallelen Ansätzen. Somit wurden pro Zelllinie 18 Wells auf der Platte benötigt. Für die acht Oxaliplatin-Konzentrationen wurden Vorverdünnungen entsprechend Tab. 4 angelegt. Daraus wurden jeweils 20 µl in die Wells mit der Zellsuspension pipettiert (in die Kontrolle 20µl PBS).

Verdünnung	Oxaliplatin [µM]	PBS (µl)	Oxaliplatin aus Verdünnung (µl)
Z8	25	63,6	21,7 aus 5 mM-Stocklösung
Z7	5,70	116	34,2 aus Z8
Z6	1,30	309	91,2 aus Z7
Z5	0,48	251	149 aus Z6
Z4	0,25	193	207 aus Z5
Z3	0,13	193	207 aus Z4
Z2	0,067	193	207 aus Z3
Z1	0,025	251	149 aus Z2

Tab. 4 Verdünnungsschema für die unterschiedlichen Oxaliplatin-Konzentrationen. Die Angabe der Oxaliplatin-Konzentration in der zweiten Spalte bezieht sich auf die Zielkonzentration auf der 24-Well-Platte, d.h. die Konzentrationen in den als Z1-Z8 bezeichneten Vorverdünnungen sind um den Faktor 51 höher (20 zu 1000 µl pipettiert).

3.6 FACS-Messung

3.6.1 Sytox® und Vybrant Ruby®-Färbung

Die mit CFSE und Zytostatikum behandelten LCLs wurden nach 48 h hinsichtlich der Oxaliplatin-bedingten Zytotoxizität und Proliferationshemmung analysiert. Zunächst wurden alle FACS-Röhrchen beschriftet. Jedes Well der 24-Well-Platte wurde mit einer sterilen und mit einem Filterstopfen versehenen 1000 µl-Spitze gut durchmischt, wobei Blasenbildung zu vermeiden war. Da sich die Färbung mit dem Farbstoff Vybrant Ruby® während der Etablierungsphase als von der Zelldichte abhängig erwies, wurden für die Behandlungsbedingungen unterschiedliche Zellsuspensions-Volumina von der 24-Well-Platte in die FACS-Röhrchen überführt. Für die Kontrolle und die beiden niedrigen Oxaliplatin-Konzentrationen Z1 und Z2 waren dies jeweils 200 µl, bei Z3 und Z4 250 µl, bei Z5 300 µl, bei Z6 und Z7 400 µl und bei Z8 500 µl. Die Proben im FACS-Röhrchen wurden sodann mit

4 ml PBS aufgefüllt und bei 250 g für 5 min zentrifugiert. Währenddessen wurde die Färbelösung mit Sytox® (Verdünnung 1:1000) und Vybrant Ruby® (Verdünnung: 1:2000) in LCL-Medium (auf Basis von farblosem RPMI-Medium) hergestellt. Wichtig war es, die Färbelösung vor Licht zu schützen (z.B. durch Alufolie), um eine lichtinduzierte Degeneration der Farbstoffe zu verhindern. Nach dem Fugen wurde der Überstand komplett abgesaugt, sofort 200 µl der Färbelösung dazugegeben, dann bei 1400 rpm für 10 s gevortext und schließlich 15 min bei 37°C inkubiert. Nun wurde die FACS-Messung durchgeführt.

3.6.2 Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting)

Dies ist eine Methode, mit der Eigenschaften von Zellen im Durchflussverfahren analysiert werden können. Damit können sowohl allgemeine Zellparameter wie Größe und Granularität bestimmt werden als auch spezifische Charakteristika durch Zugabe von Substanzen, über welche Fluoreszenz induziert werden kann. In Suspension gehaltene Zellen werden hydrodynamisch fokussiert und in einem Zellstrom nacheinander durch das FACS-Gerät geschleust, wobei sie einen monochromatischen Lichtstrahl passieren. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*) wird von einem Detektor erfasst, der sich auf der Achse des einfallenden Lichts befindet, womit die Zellgröße ermittelt werden kann. Das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*) von einem im 90°-Winkel zum einfallenden Licht befindlichen Detektor aufgenommen spiegelt u.a. den intrazellulären Aufbau bzw. die Granularität der Zellen wider. Bei zur Fluoreszenz fähigen Molekülen werden Elektronen durch Anregung auf ein höheres Energieniveau gebracht. Beim Abfallen auf den ursprünglichen Energiezustand werden Photonen emittiert, die mit Hilfe zweier Photodetektoren registriert werden. Hierzu wurden in meiner Dissertation die Fluorochrome CFSE, Vybrant Ruby® und Sytox® verwendet (siehe Abschnitt 2.8 in Materialien). Mit dem FACS-Gerät BD LSRII standen vier unterschiedliche Laser zur Exzitation und zehn Farbkanäle zur Emission zur Verfügung. Somit konnten die Fluoreszenzsignale der eingesetzten Farbstoffe unterschieden werden.

3.7 RNA-Analytik

3.7.1 RNA-Gewinnung

RNA wurde asserviert, um die zu Behandlungsbeginn vorhandene bzw. durch die Zytostatikagabe etwaig modulierte Expression bestimmter Transporter oder Reparatursysteme mit Bezug zur Oxaliplatin-Wirkung messen zu können. Die Asservierung von RNA (Zytostatika-freie Kontrolle, 0,067 und 1,3 µM Oxaliplatin) erfolgte 24 h nach Oxaliplatin-Zugabe aus jeweils 4 ml der am Vortag auf 200.000 Zellen /ml eingestellten Zellsuspension.

Dabei wurde auf gute Homogenisierung der Proben geachtet. Die Proben wurden für 5 min bei 500 g zentrifugiert und der Überstand anschließend vollständig als Zytostatikaabfall entsorgt. Dem Zellpellet wurden dann 350 µl RLT-plus-Puffer (Bestandteil des Qiagen RNeasy Kits) zugesetzt und der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann wurden die Zellen durch mehrmaliges, kräftiges Pipettieren lysiert und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur (5-10 min) wurden die Proben bei -80°C eingefroren. Nach Abschluss der zellbiologischen Messreihen wurde daraus RNA isoliert.

3.7.2 Isolierung und Quantifizierung von RNA

Die während der Messreihe asservierten und eingefrorenen Proben wurden auf Eis langsam aufgetaut und anschließend mit dem Roboter QiaCube (Firma Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers mit dem RNeasy Plus Mini Kit isoliert. Aufgrund der besonderen Sensibilität gegenüber RNAsen galten bei der Vorbereitung der Proben besondere Vorsichtsmaßnahmen. Hierzu wurde der Arbeitsplatz samt Geräten gründlich mit RNAse-Zap gereinigt. Nach der Isolierung wurden die Proben aus dem Roboter entnommen und sogleich auf Eis gelegt und nach der Quantifizierung bei -80°C gelagert, um mögliche Abbauprozesse durch RNAsen zu verhindern.

Die Quantifizierung der gewonnenen RNA erfolgte über ein Photometer der Firma Eppendorf (Biophotometer 6313), wobei hierfür eine Messzelle verwendet wurde, die für den Mikroliterbereich geeignet war (LabelGuard™, Firma Implen). Für die Messung genügten 3 µl des Probenvolumens. Das Messprinzip beruht auf der optischen Dichte (OD). Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Das Gerät ist nun so kalibriert, dass eine OD von 1 bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl entspricht. Dabei ist noch der Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen. Proteine weisen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm auf. Als Maß für den Reinheitsgrad der RNA wurde der Quotient aus OD260/280 bestimmt. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,3 liegen, was bei allen gemessenen Proben der Fall war. Als Leerwert wurde die Absorption von ddH_2O bestimmt.

3.7.3 cDNA-Synthese

Für die Amplifizierung der mRNA Transkripte über konventionelle PCR-Verfahren zur Genexpressionsuntersuchung muss RNA zunächst revers in cDNA transkribiert werden. Dafür wird die Basenabfolge der „Boten-RNA“ mittels eines besonderen Enzyms, der reversen Transkriptase, abgelesen und komplementär dazu ein cDNA-Strang synthetisiert.

Hierfür werden kurze, degenerierte Primer aus sechs Nukleotiden (dN6) aller möglichen Kombination verwendet, um möglichst das gesamte Kontingent an mRNA-Transkripten zu erfassen und umzuschreiben.

Für die Primeranlagerung wurden pro Reaktion 2 µl dN6-Primer mit dem 1 µg RNA entsprechenden Volumen vereinigt und mit ddH_2O auf ein Volumen von 18,5 µl ergänzt (Tab. 5). Anschließend wurde die Mischung in einem PCR-Gerät bei 72°C für 5 min zwecks Denaturierung der RNA inkubiert. Danach wurde der Ansatz sogleich auf Eis gelegt, um eine Renaturierung zu verhindern.

Reagenz	Volumen in µl pro Reaktion
RNA	1 µg
dN6	2
ddH_2O	auf 18,5 auffüllen

Tab. 5 Reaktionsansatz für die Primeranlagerung.

Als nächstes wurde der Reaktions-Mastermix entsprechend der Tab. 6 angesetzt und pro Reaktion 11, 5 µl davon nach kurzer Zentrifugation den Proben zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Ansätze wieder in das PCR-Gerät gestellt. Nach Äquilibrierung bei 25°C für 5 min erfolgte die reverse Transkription (mittels GoScript, Firma Promega) bei 42°C für 60 min mit anschließender Inaktivierung des Enzyms bei 70°C für 15 min. Anschließend wurden die Proben mit TE-Puffer versetzt, um eine Konzentration an cDNA von 2 ng/µl (bezogen auf die initial eingesetzte RNA) zu erhalten. Die cDNA-Proben wurden auf 96-Well-Platten ausgebracht und bei -20°C aufbewahrt. Diese Proben wurden für die nachfolgenden quantitativen *Real Time*-Messungen verwendet.

Reagenz	Volumen in µl pro Reaktion
5x Reaktionspuffer	6
$MgCl_2$ [25 mM]	3,5
Nukleotidmix: dNTPs [10 mM]	1,5
RNase-Inhibitor [40 U/µl]	0,5
GoScript reverse Transkriptase	0,25
Gesamtvolumen	11,75

Tab. 6 Reaktionsansatz für die reverse Transkription

3.7.4 Quantitative *Real Time*-PCR

Ein etabliertes Verfahren zur Messung der Expressionsstärke eines Gens ist die quantitative *Real Time*-PCR (qRT-PCR). Die Methode amplifiziert die einzelsträngige cDNA und ermöglicht während der PCR die quantitative Bestimmung des zu untersuchenden Gens. Daraus lässt sich der Expressionszustand von Genen ableiten. Als Gene, deren Expression im Rahmen dieser Dissertation am meisten interessierten („Zielgene“), wurden *SLC31A1, ATP7A, ATP7B, ERCC2* und *ERCC5* ausgewählt. Zur Kontrolle der Variabilitäten der reversen Transkription wurden *GAPDH, UBC, B2MG* und *HPRT1* als Referenzgene quantifiziert. Die qRT-PCR wurde mittels eines TaqMan® 7900HT-Geräts durchgeführt. Bei einer Polymerasekettenreaktion laufen nach einer initialen Denaturierung bei 95°C eine bestimmte Anzahl von Zyklen (in der Regel 30-40) ab, welche sich aus den drei Schritten Denaturierung, Annealing (Primeranlagerung) und Elongation (Kettenverlängerung) zusammensetzen. Die qRT-PCR läuft prinzipiell wie eine gewöhnliche PCR ab mit dem Unterschied, dass die Detektion der amplifizierten Produkte in Echtzeit, also während der Reaktion stattfindet.

Im hier verwendeten qRT-PCR-Mastermix ist die Polymerase ein so genanntes „*Hot Start*“-Enzym, d.h. die Aktivität ist durch spezifische Antikörper inhibiert. Erst nachdem diese Enzyme bei 90°C denaturiert wurden, werden die hitzestabilen Polymerasen enzymatisch aktiv. Auf diese Weise wird eine Amplifikation durch unspezifisches *Priming* bei Raumtemperatur und in der Erhitzungsphase verhindert (Bustin 2002; Newton 1994). Im ersten Zyklus der PCR wird die einzelsträngige cDNA in doppelsträngige DNA umgewandelt und jeder weitere Zyklus ermöglicht die Verdopplung der vorliegenden DNA-Moleküle. Die Signale während der einzelnen Elongationsphasen wurden mit dem ebenfalls im qRT-PCR-Mastermix enthaltenen EvaGreen® detektiert. EvaGreen® ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, der nur dann fluoresziert, wenn er nach Bindung an doppelsträngige DNA angeregt wird. Das in der Elongationsphase gemessene Signal ist proportional zum amplifizierten PCR-Produkt. Die Spezifität der Amplifikation eines Transkriptes beruht dabei auf dem jeweiligen Primerpaar. Für letzteres wurden bei der Assay-Etablierung folgende Kriterien angelegt: spezifische Bande auf Agarosegel ohne quantitativ bedeutsame Nebenbanden, gute Amplifikationsdynamik (näherungsweise Transkriptverdopplung pro Zyklus) sowie ein singulärer Peak in der Schmelzpunktkurve direkt im Anschluss an die qRT-PCR (Abb. 4). Die Schmelzpunktkurve wurde auch generell bei der Messung der einzelnen Proben aufgezeichnet, die im optimalen Fall einen scharfen Peak zeigen sollte. Ein singulärer,

scharfer Peak war ein Indiz dafür, dass tatsächlich nur der zu untersuchende Sequenzabschnitt vermehrt wurde.

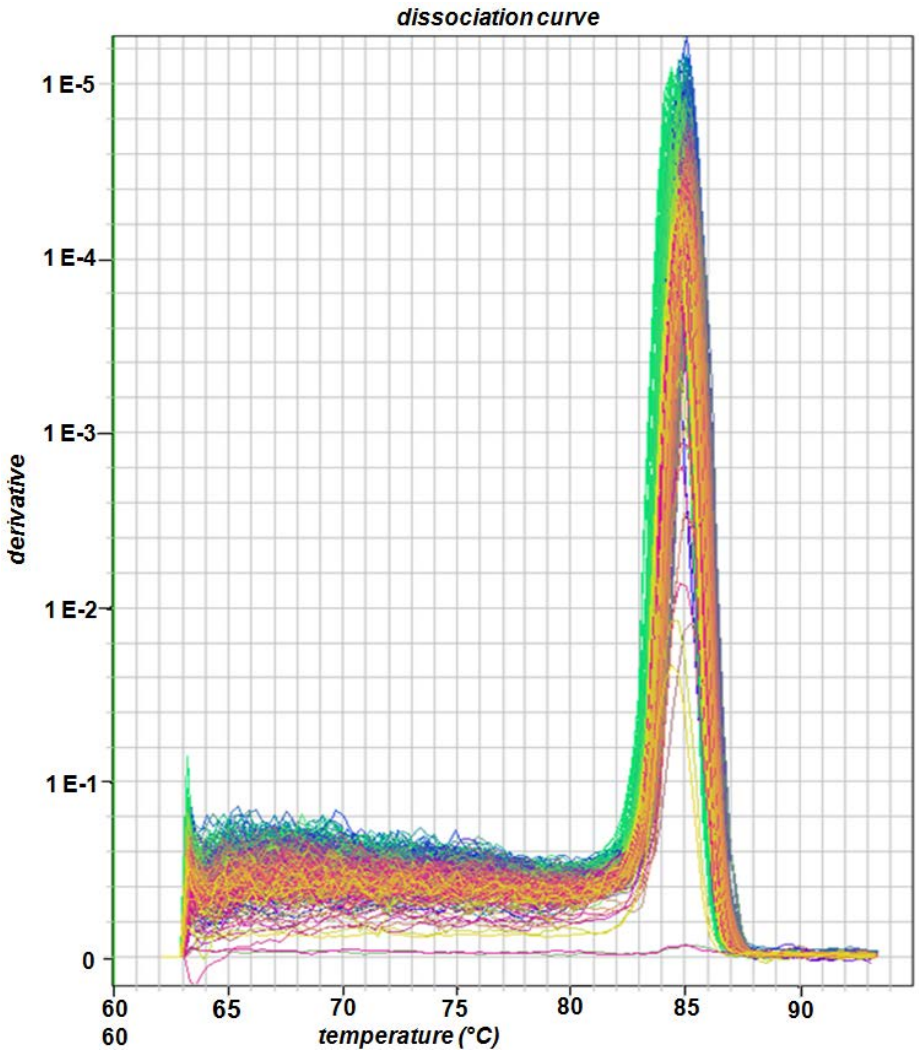


Abb. 4 Schmelzpunktkurve nach *Real Time*-PCR von *SLC31A1*. Es ist die erste Ableitung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Temperatur gezeigt. Die PCR-Produkte wurden zunächst kurz für 15 s bei 95°C denaturiert und dann auf 60°C für 15 s abgekühlt. Dann wurde allmählich die Temperatur erhöht (mit der minimalen *ramp rate* des TaqMan-7900HT von 2%). Ein singulärer Peak deutet auf das Vorhandensein von nur einem spezifischen Produkt hin.

Das in der Elongationsphase gemessene Fluoreszenzsignal verhält sich proportional zum amplifizierten PCR-Produkt. Um die mRNA-Expression der zu untersuchenden Gene miteinander vergleichen zu können, wird für das zu detektierende Fluoreszenzsignal ein definierter Grenzwert gesetzt, der Ct-Wert (*cycle threshold*). Dieser gibt die Zykluszahl an, bei der das Signal den Grenzwert erreicht. Je kleiner der Ct-Wert, desto weniger Zyklen wurden für die benötigte Signalstärke benötigt und desto größer war entsprechend die initial

exprimierte mRNA-Menge. Zur Auswertung der Daten wurde die gerätespezifische Software SDS 2.1 verwendet.

Die Messungen wurden auf 384-er Thermofast-Platten in einem Gesamtvolumen von 10 µl (3 µl cDNA und 7 µl Reaktionsmix, siehe Tab. 7) durchgeführt, wobei alle Proben doppelt bestimmt wurden.

Reagenz	Volumen in µl
ddH_2O	4,8
5x qRT-PCR-Mastermix	2
Primerpaar (1:10 verdünnt)	0,2
cDNA	3
Gesamtvolumen	10

Tab. 7 Reaktionsansatz für die qRT-PCR.

Die qRT-PCR wurde standardmäßig nach den in Tab. 8 genannten Bedingungen durchgeführt. Eine Ausnahme war lediglich GAPDH mit einem *Annealing* bei 60°C für 30 s und einer Elongation bei 72°C für 60 s.

Phase	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	15 min	1
Denaturierung	95	15 s	} 40-45x
Annealing	60	20 s	
Elongation	72	40 s	

Tab. 8 Reaktionsbedingungen der qRT-PCR

3.7.5 Referenzgene zur Normalisierung

Da insbesondere die Effizienz der reversen Transkription erheblich variieren kann, müssen die Expressionsdaten der interessierenden Zielgene normiert werden. Dazu bedient man sich so genannter Referenzgene, deren Expressionszustand möglichst wenig von den durchgeführten Behandlungen verändert wird und die daher auch als *Housekeeping*-Gene bezeichnet werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass es Expressionsunterschiede dieser Gene in unterschiedlichen Geweben gibt, was bei der Auswahl der Referenzgene zu berücksichtigen ist. Durch Verwendung mehrerer solcher Gene wird die Normalisierung robuster (Schulz et al. 2004). Als Referenzgene wurden für diese Arbeit *GAPDH*, *UBC*, *HPRT1* und *B2MG* getestet.

3.8 DNA-Analytik

An genomischer DNA der LCLs sollte die quantitative Einlagerung von Oxaliplatin gemessen und im Testset die Genotypisierung der Varianten mit der stärksten Assoziation aus dem Trainingsset vorgenommen werden.

3.8.1 DNA-Probengewinnung

Proben für die DNA-Analytik wurden zeitgleich und mit denselben Zellsuspensions-Volumina und Behandlungsbedingungen (Kontrolle, 0,067 und 1,3 µM Oxaliplatin nach 24 h Inkubation) wie die Proben für die RNA-Bestimmungen gewonnen (3.7.1). Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

3.8.2 DNA-Isolierung und -Quantifizierung

Die auf -20°C eingefrorenen Proben wurden mit dem QiaCube-Roboter nach Protokoll des Herstellers isoliert. Bei den Proben für die Quantifizierung des Platingehalts in der DNA (aus den Proben mit 1,3 µM Oxaliplatin für 24 h) wurde das kleinstmögliche Elutionsvolumen von 50 µl eingestellt.
Die Quantifizierung der isolierten DNA erfolgte mit denselben Gerätschaften wie bei der RNA (3.7.2). Der Unterschied besteht lediglich darin, dass eine OD von 1 bei der DNA einer Konzentration von 50 ng/µl entspricht.

3.8.3 Quantifizierung von DNA-gebundenem Platin

Diese Analysen wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Hilger (Universitätsklinikum Essen, Abteilung Innere Medizin, Arbeitsgruppe Pharmakologie antineoplastischer Substanzen) mit einem ICP-MS (*inductively coupled plasma mass spectrometry*) durchgeführt. Dazu wurden 150 µl DNA-Lösung mit 150 µl 2%-iger Salpetersäure versetzt und 24 h bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde davon 280 µl in ein 15 ml-Röhrchen überführt, in dem 1312 µl 1%-ige Salpetersäure und 8 µl Interner Standard (2 ppb Indium, Iridium und Rhodium in 1% Salpetersäure) vorgelegt wurden. Danach wurden die Proben am ICP-MS gemessen. Als validierter Bereich galt eine Platinkonzentration in der Messlösung von 5-2000 ng/l. Der Platingehalt wurde dann auf den DNA-Gehalt in der Messlösung bezogen. Auf die Bestimmung von Oxaliplatin-freien Kontrollproben wurde wegen der hohen Spezifität dieses Verfahrens verzichtet.

3.8.4 PCR

Die 20 stärksten Genotyp-Assoziationen des Trainingssets sollten im Testset überprüft werden. Dazu wurden die entsprechenden DNA-Sequenzabschnitte zunächst mittels PCR vervielfältigt und dann die interessierenden polymorphen Stellen mittels Primerextensionsverfahren analysiert. Von den 20 betreffenden Sequenzbereichen konnten 19 durch eine Multiplex-PCR amplifiziert werden, für rs9329099 wurde eine Einzel-PCR durchgeführt. Im Unterschied zur Einzel-PCR ermöglicht es die Multiplex-PCR, mehrere unterschiedliche Genbereiche der genomischen DNA simultan zu amplifizieren (Zusammensetzung der Reaktionsansätze siehe Tab. 9 und Tab. 10). Zur Ermittlung der optimalen PCR-Bedingungen wurden eine Gradienten-PCR und eine anschließende Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Assay-Etablierung wurden für die Gradienten-PCR im 96-Well-Thermocycler in einem Temperaturbereich von 57-70°C vier Temperaturpunkte ausgewählt (59,5, 63,4, 65,9 und 69,7°C). Die Ansätze wurden jeweils mit und ohne Q-Lösung pipettiert. Die Q-Lösung erleichtert die Amplifikation „schwieriger“ GC-reicher Templates durch Beeinflussung der Schmelzeigenschaft der DNA. Die PCR-Bedingungen sind Tab. 11 und Tab. 12 zu entnehmen. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese analysiert.

Reagenz	Volumen in µl
ddH_2O	1,6
Qiagen Multiplex PCR Master Mix	6
Q-Lösung	1,2
Primermix	1,2
gDNA [10 ng/µl]	2
Gesamtvolumen	12

Tab. 9 Reaktionslösung für die Multiplex-PCR. Im Ansatz ohne Q-Lösung wurden stattdessen zusätzlich 1,2 µl ddH_2O hinzugeben.

Reagenz	Volumen in µl
ddH_2O	6,32
10x PCR-Puffer	1,10
Q-Lösung	2,20
dNTPs [10 mM]	0,22
Primer-F [100 µM]	0,06
Primer-R [100 µM]	0,06
gDNA [10 ng/µl]	1
TopTaq-Polymerase [5 U/µl]	0,06
Gesamtvolumen	11

Tab. 10 Reaktionslösung für die Einzel-PCR. Im Ansatz ohne Q-Lösung wurden stattdessen zusätzlich 2,2 µl ddH_2O hinzugeben.

Phase	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	15 min	1
Denaturierung	94	30 s	} 40x
Annealing	57-70	1min 30 s	
Elongation	72	1 min 30 s	
Finale Elongation	72	10 min	1

Tab. 11 Reaktionsbedingungen für die Multiplex-PCR

Phase	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 min	1
Denaturierung	95	30 s	} 35x
Annealing	57-72	1min 30 s	
Elongation	72	1 min 30 s	
Finale Elongation	72	10 min	1

Tab. 12 Reaktionsbedingungen für die Einzel-PCR

3.8.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Die Auftrennung erfolgt dabei durch Agarose, welche Fäden aus Polymeren bildet, die sich zu einem Gel vernetzen. Entsprechend sind die Poren kleiner, wenn die Agarose höher konzentriert ist und umgekehrt. Auf diese Weise können kleinere Fragmente besser mit höher konzentrierter Agarose getrennt werden, während bei größeren Fragmenten eine niedrigere Konzentration zu bevorzugen ist. Für die Fragmentdarstellung der Gradienten-Multiplex-PCR wurde Agarose *ad* 2% mit 50 ml TBE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht. Danach erfolgte die Durchmischung mit dem Magnetrührer. Nach anschließender Abkühlung auf 40-50°C wurde 1 µl einer 1%-Stocklösung von Ethidiumbromid zugegeben. Nach Interkalation in die DNA nimmt die Fluoreszenz-Emission von Ethidiumbromid um ein

Vielfaches zu. Wird dieses nun mit UV-Licht bestrahlt, so fluoresziert es viel intensiver und erscheint in der Gelkammer hell im Gegensatz zum nicht interkalierten Ethidiumbromid.
War das Gel abgekühlt und verfestigt, wurden 12 µl des PCR-Produkts mit 3 µl Ladepuffer in die Taschen der Gelkammer pipettiert. Zur späteren Identifizierung der Fragmentgrößen wurden DNA-Längenmarker (100 kbp-Leiter) in die beiden äußeren Taschen der Gelkammer aufgetragen. Für die Elektrophorese wurde in einer „COm Phor L Mini“-Gelkammer eine elektrische Spannung (120 V) für ca. 30 min angelegt. Dadurch wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren von der Kathode zur Anode, wobei kleinere Fragmente schneller durch die Gelmatrix wandern als größere, sodass unterschiedliche Banden entstehen. Diese wurden schließlich unter UV-Licht mit dem Fluor-S™ Multiimager betrachtet und mittels der Software „Quantity One®S Version 4.2.1“ analysiert. Die Fragmente der Gradienten-Multiplex-PCR waren zur besseren Unterscheidung in zwei Primerpools aufgeteilt worden. Die entsprechenden Ergebnisse für die vier gewählten Temperaturpunkte ohne und mit Q-Lösung sind in Abb. 5 zu sehen. Für die Genotypisierung der Probenserie wurden beide Primerpools in einer Reaktion vereinigt; hierfür wurde auf Basis von Abb. 5 als PCR-Bedingung eine Temperatur von 63,4°C ohne Q-Lösung gewählt. Für die Einzel-PCR wurden nach Gradienten-PCR und Gelelektrophorese die Bedingungen mit einer *Annealing*-Temperatur von 62,6°C für 30 s und einer Elongation bei 72°C für 2 min ohne Verwendung von Q-Lösung festgelegt. Die Fragmentlänge belief sich hier auf 1587 bp.

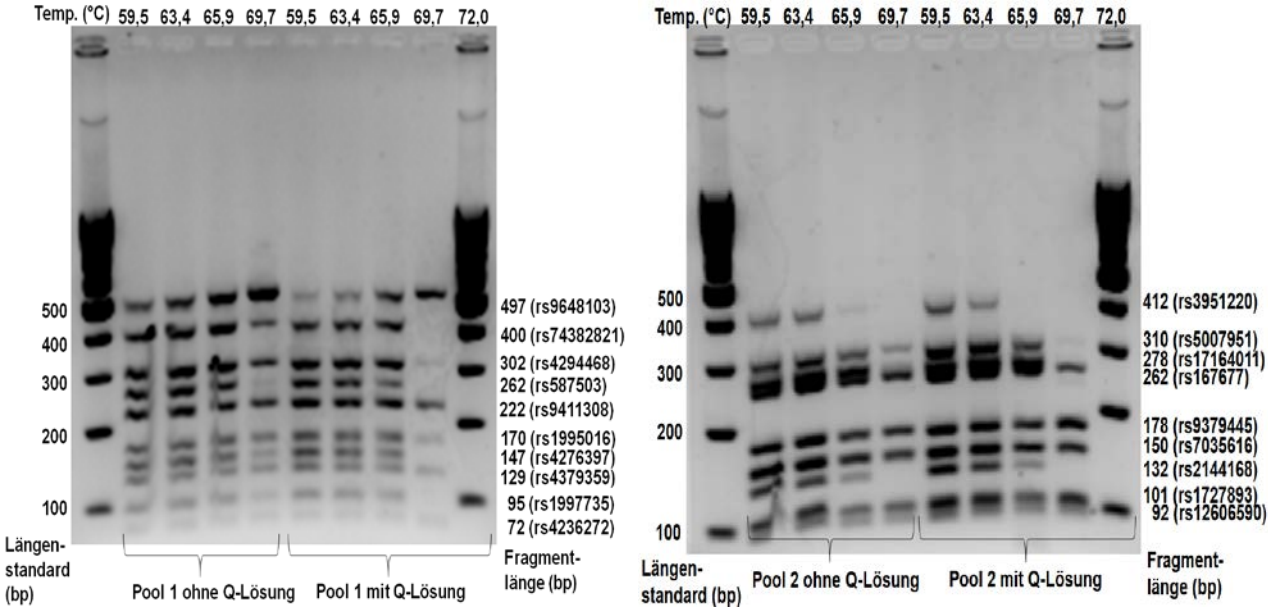


Abb. 5 Gelelektrophorese für die Etablierung der Multiplex-PCR. Das linke Bild zeigt die Amplifikation von zehn Fragmenten für die jeweiligen SNPs (Angabe von Fragmentlänge und rs-Nummer rechts vom Gel) in Pool 1 und das rechte von neun Fragmenten in Pool 2. In beiden Bildern sind zunächst die vier Temperaturen ohne und dann mit Q-Lösung aufgetragen. Am linken und rechten Bildrand sind jeweils die Banden eines Längenstandards (links vom Gel in bp angegeben) zu sehen. Die Annealing-Temperaturen sind oberhalb der Abbildungen dargestellt.

3.8.6 Genotypisierung mittels Primerextensionsmethode

Die Bestimmung der interessierenden 20 Einzelnukleotid-Polymorsphismen wurde mittels Primerextension (SNaPshot™) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass ein spezifischer Primer unmittelbar vor dem zu untersuchenden SNP bindet und um genau ein Nukleotid verlängert wird. Diesem Nukleotid fehlt am 3'-Ende eine Hydroxygruppe, sodass keine weitere Verlängerung stattfindet. Gleichzeitig sind diese fluoreszenzmarkiert (Adenin grün, Thymin rot, Guanin blau, und Cytosin schwarz) und können vom Sequenzierer detektiert werden. Durch unterschiedliche Länge der Primer können diese im Elektrophero-gramm unterschieden werden.

Vor der SNaPshot™-Reaktion erfolgte eine enzymatische Aufreinigung der Produkte der Einzel- und Multiplex-PCR, um nicht eingebaute Primer und dNTPs zu degradieren. Dazu wurden pro Probe 3 µl eines Verdaumixes entsprechend Tab. 13 auf einer 384-Well-Platte vorgelegt. Dazu wurden dann 1,5 bzw. 4,5 µl Produkt aus der Einzel- bzw. Multiplex-PCR gegeben. Die Proben wurden für 3 h bei 37°C inkubiert. Daran schloss sich zur Deaktivierung der Enzyme eine Inkubation bei 80°C für 15 min an.

Reagenz	Volumen in µl pro Probe
SAP-Puffer (10x)	0,95
Exonuklease I	0,35
SAP (1U/µl)	1,70
Summe Verdaumix	3
Produkt Einzel-PCR	1,5
Produkt Multiplex-PCR	4,5

Tab. 13 Reaktionsansatz für die erste enzymatische Aufreinigung vor der SNaPshot™-Reaktion.

Anschließend erfolgte die SNaPShot™-Reaktion. Hier bestand der Reaktionsansatz aus den in Tab. 14 aufgelisteten Komponenten. Die Reaktion fand in einer 384-Well-Platte in einem Thermocycler mit den in Tab. 15 genannten Bedingungen nach Angaben des Herstellers statt.

Reagenz	Volumen in µl pro Probe
ddH_2O	2
SNaPShot™-Mastermix	0,5
10x Primermix	0,5
aufgereinigte PCR-Produkte	2
Gesamtvolumen	5

Tab. 14 Reaktionsansatz für die SNaPshot™-Reaktion.

Phase	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	2 min	1
Denaturierung	96	10s	} 26x
Annealing	50	5s	
Elongation	60	30 s	

Tab. 15 Reaktionsbedingungen der SNaPShot™-Reaktion.

Dann wurden die Proben ein zweites Mal aufgereinigt, um die nicht gebundenen ddNTPs aus der SNaPShot™-Reaktion zu inaktivieren. Hierzu wurde eine 1:1 Mischung aus 0,5 µl SAP-Puffer und 0,5 µl SAP (aus 1 U/µl) zu den Reaktionsprodukten der SNaPShot™-Reaktion gegeben (Tab. 16) und bei 37°C für 30 min inkubiert. Unmittelbar danach wurde je 1 µl dieser Ansätze zu einer 1:200-Verdünnung des Längenstandards Genescan™-LIZ®120 in HiDi-Lösung gegeben und davon 10 µl in die Wells einer 96-Well-Sequenzierplatte gebracht und für 5 min bei 95°C im Thermocycler aufgekocht (dadurch wird auch die SAP aus der zweiten Aufreinigung inaktiviert). Sofort danach wurden die Proben für 10 min auf Eis gebracht. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Proben mit dem Sequenzierer analysiert (Tab. 17).

Reagenz	Volumen in µl pro Probe
SAP-Puffer (10x)	0,5
SAP (1U/µl)	0,5
SNaPShot™-Reaktions-Mischung	5

Tab. 16 Reaktionsansatz für die zweite enzymatische Aufreinigung.

Reagenz	Volumen in µl pro Probe
HiDi-Formamid	10
Genescan™-LIZ®120	0,05
Produkt nach zweiter Aufreinigung	1

Tab. 17 Reaktionsansatz zur Probenvorbereitung für die Sequenzierreaktion

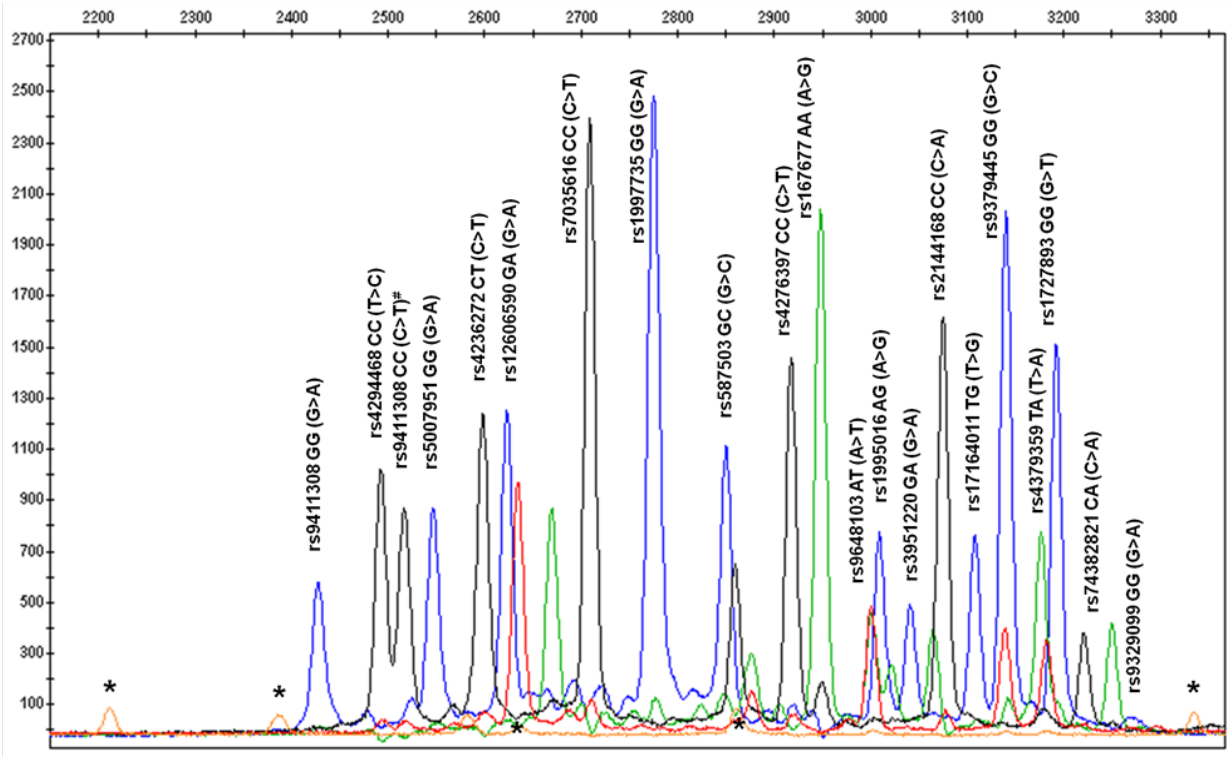


Abb. 6 Elektropherogramm für die 20 analysierten Genpolymorphismen. Es ist beispielhaft eine der 96 Proben dargestellt. Die Skala links gibt die Signalstärke (arbiträre Einheit) an. Die extendierten Primer sind von links nach rechts in aufsteigender Länge angeordnet. Es ist jeweils die rs-Nummer mit dem in dieser Probe vorliegenden Basenaustausch (in Klammer die potenziell an dieser Stelle vorkommenden Allele mit dem selteneren hinter dem „>“-Zeichen) angegeben. Die unterschiedliche Färbung der Peaks kennzeichnet die jeweilige Base: blau-Guanin (G), rot-Thymin (T), grün-Adenin (A), schwarz-Cytosin (C). Ein singulärer Signalpeak deutet auf Homozygotie hin, während zwei Peaks unterschiedlicher Farbe an einer Position für Heterozygotie sprechen. Der Längenstandard (orange-farbene Peaks) ist mit „*“ markiert. Der dritte, mit „#“ gekennzeichnete SNP von links stellt eine redundante, mit einem gegenläufigen Primer bestimmte Kontrolle des ersten dar (C>T- bzw. G>A-Austausch, identische rs-Nummer).

3.9 Bioinformatik

Bioinformatische Methoden wurden zur Nutzbarmachung umfangreicher genetischer Informationen aus Datenbanken sowie zum Primerdesign, zur genetischen bzw. funktionellen

Zuordnung bestimmter Genpolymorphismen und zur Beschreibung eines paarweisen genetischen Kopplungsungleichgewichts (*linkage disequilibrium*, LD) von Genvarianten verwendet. Die genetischen Informationen für die Zelllinien des Trainingssets stammten aus den Datenbanken HapMap (*release* #28, August 2010) und *1000 human genomes* (Version Februar 2012). Zum Primerdesign für quantitative *Real Time*-PCR und für genomische PCR der Teststudie wurde die Sequenzinformation aus NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) entnommen und mit den Software-Programmen CloneManager (Version 6.00) und Oligo (Version 6.58) dargestellt. Die positionsgenaue Zuordnung eines Polymorphismus zu einem genetischen Sequenzkontext erfolgte mittels der Datenbank dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP). Darüber hinaus wurde ein möglicher Bezug eines Genpolymorphismus zu funktionellen *Features* mit dem *UCSC Genome Browser* sowie den auf RNA-Einträgen fokussierenden Datenbanken NONCODE (http://www.noncode.org) und miRBase (www.mirbase.org) geprüft. Paarweises LD zwischen Genpolymorphismen wurde mit der Software HaploView (Version 4.2) visualisiert.

3.10 Statistik

3.10.1 *Deskriptive Statistik*

Mit Hilfe der deskriptiven Statistik werden gewonnene Messdaten geordnet und zusammengefasst. So können aus umfangreichem Datenmaterial statistische Kenngrößen wie Streuungs- und Lagemaß kalkuliert und die Verteilung der Messdaten in Form von Tabellen und Graphiken charakterisiert werden. Man spricht von einer parametrischen Verteilung von Messdaten, wenn diese durch mathematische Parameter beschrieben werden können. Zumeist handelt es sich hier um normalverteilte Messdaten. Nicht-parametrische Verteilungen erfüllen dieses Kriterium nicht.

Für die Veranschaulichung der Häufigkeitsverteilung von Daten wurden Histogramme erstellt. Boxplots wurden für die Darstellung des Lage- und Streuungsmaßes eines Messparameters als nicht-parametrische Verteilungsform verwendet. Der paarweise Vergleich von zwei Parametern wurde anhand von zweidimensionalen Scatterplots dargestellt.

3.10.2 Analytische Statistik

Die analytische Statistik testet, ob zwischen mehreren Messdatensätzen signifikante Unterschiede vorliegen.

Abhängig von der Art der Daten (Annahme einer Normalverteilung? Skalierung der Daten?) eignen sich nur bestimmte Tests. Ob eine Normalverteilung angenommen werden konnte,

wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test geprüft. War dies der Fall, kamen parametrische, ansonsten nicht-parametrische Testverfahren zur Anwendung.

Eine Korrelationsanalyse zweier stetiger Messparameter erfolgte parametrisch mittels des Koeffizienten nach Pearson, nicht-parametrisch mittels des Rangsummen-Korrelationskoeffizienten nach Spearman. Die Prüfung auf statistische Signifikanz von Behandlungsbedingten Veränderungen eines Messparameters wurde mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt. Der Einfluss von mehr als einer unabhängigen auf eine abhängige Messvariable wurde, wenn die Art der Verteilung dies zuließ, mit parametrischen linearen Regressionsmodellen untersucht. Gegebenenfalls konnte die Voraussetzung einer Vereinbarkeit mit einer Normalverteilung durch Logarithmieren der Messwerte erreicht werden.

Die durch diskrete Variablen (typischerweise Genotypen) definierten Subgruppen stetiger funktioneller Messparameter genügten typischerweise nicht in jeder Konfiguration einer Normalverteilung. Daher wurden hier generell nicht-parametrische Tests angewandt: bei zwei Ausprägungen der diskreten Variable mit dem Mann-Whitney-U-Test, bei drei mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test, welcher bei drei Genotyp-Konfigurationen einer biallelischen Genvariante einen möglichen Alleldosis-Effekt berücksichtigt. Letzterer Test kam auch beim Genom-weiten Trainingsset zum Einsatz, wobei hier nur solche Genvarianten berücksichtigt wurden, bei denen der heterozygote und homozygote Variantenallel-Trägerstatus zusammen mindestens 10% ausmachten.

Ein p-Wert < 0,05 wurde als nominaler Grenzwert der Irrtumswahrscheinlichkeit betrachtet; statistische Signifikanz wurde erst nach Berücksichtigung von Multiplem Testen proklamiert (standardmäßig durch Korrektur nach Bonferroni, bei der Genom-weiten Analyse durch Bestimmung der *false discovery rate*, FDR). Die Genom-weite Assoziationstestung von Genpolymorphismen in Bezug zur zellulären Empfindlichkeit gegenüber Oxaliplatin wurde von Herrn Prof. Beißbarth, Leiter der Arbeitsgruppe Statistische Bioinformatik am Institut für Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen, für das Trainingsset durchgeführt. Die dazu verwendeten bioinformatischen Algorithmen hat er mit dem Software-Paket R (Version 2.15) programmiert. Alle anderen statistischen Analysen einschließlich der Überprüfung der im Trainingsset identifizierten Kandidaten-Polymorphismen am Testset erfolgten mit der SPSS-Software (Version 12.0) durch Herrn Dr. Schirmer (Institut für Klinische Pharmakologie). Diese Daten habe ich nach Anleitung von Herrn Dr. Schirmer visualisiert. Als Darstellungsformen wurden die bereits oben beschriebenen (siehe „deskriptive Statistik“) gewählt.

4 Ergebnisse

Zur Simulation einer Hemmwirkung von Oxaliplatin auf neoplastische Zellen bedurfte es eines Modells für proliferierende Zellen. Für die durchzuführenden funktionellen Analysen standen insgesamt 198 lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) zur Verfügung. Diese wurden in zwei Gruppen eingeteilt: ein Trainingssatz von 104 LCLs (mit vorhandenen Genom-weiten Genotypen) und ein Testsatz mit 94 LCLs (von in Göttingen behandelten Patienten). Beide Gruppen setzten sich aus Personen kaukasischer Abstammung zusammen.

4.1 Basale Proliferationsrate

Damit sich eine LCL-Linie als Untersuchungsmodell eignet, muss deren Proliferation sichergestellt sein. Daher soll zunächst die Verteilung der basalen Proliferationsrate der 104 Zelllinien des Trainingssatzes ohne Zugabe von Oxaliplatin dargestellt werden. Dabei wurde die Dispersion des CFSE-Signals bei der Zellteilung als endogener Proliferationsmarker verwendet. Für die Kohorte des Trainingssatzes konnte dabei eine Normalverteilung angenommen werden (Abb. 7). Im Median teilten sich die Zellen in einem Zeitintervall von 24 h ca. 2,4 Mal. Für eine Zelllinie ergab sich ein Wert von 0,5; diese wurde im Weiteren nicht mehr berücksichtigt. Die übrigen hier betrachteten Zelllinien wiesen eine Proliferationsrate von mind. 1,3 in 24 h auf; als Maximum wurde ein Wert von 3,8 beobachtet.

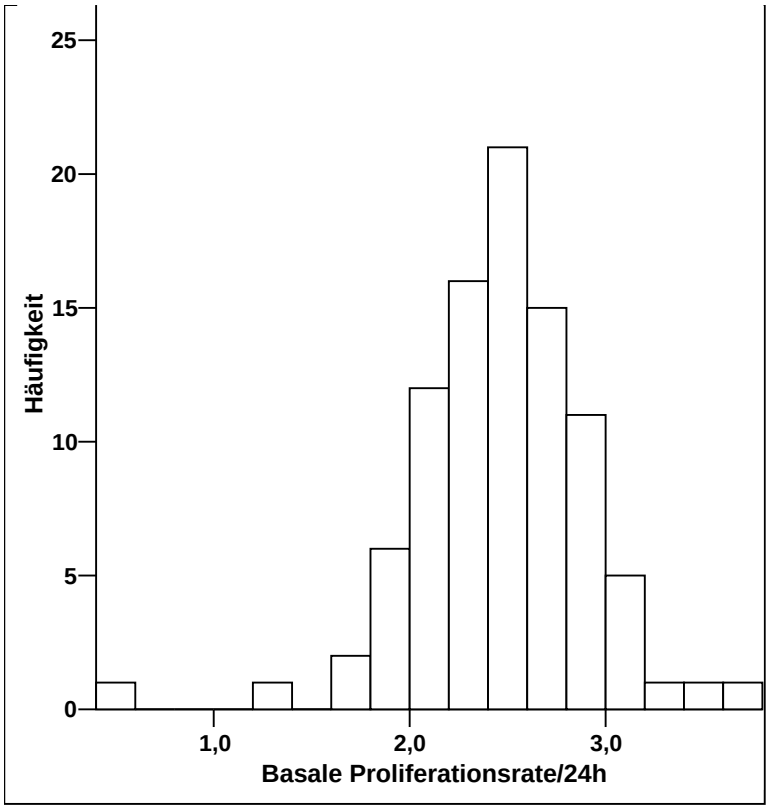


Abb. 7 Häufigkeitsverteilung der basalen Proliferationsrate der Zelllinien des Trainingssatzes. Die Zellen waren mit dem fluoreszierenden Farbstoff CFSE beladen worden. Die auf der X-Achse gezeigte Proliferationsrate ohne Zytostatikum bezieht sich auf das Verhältnis einer durchflusszytometrischen Zellzählung anhand des CFSE-Signals nach 48 bzw. 72 h Inkubation bei 37°C im Brutschrank.

4.2 Variabilität funktioneller Parameter der Oxaliplatin-Sensitivität

Um die Oxaliplatin-Sensitivität zu charakterisieren, wurden drei funktionelle Parameter erhoben:

1. der V50-Wert als Maß für die Konzentration an Oxaliplatin, bei welcher eine Halbierung der Zellvitalität eintrat
2. der P50-Wert für diejenige Oxaliplatin-Konzentration, bei welcher die Proliferation der LCLs binnen 24 h um den Faktor 2 gehemmt wird
3. die Menge des auf den DNA-Gehalt gebundenen Oxaliplatins

4.2.1 V50

Ein anderes Ziel der Untersuchung war die Bestimmung der Oxaliplatin-Konzentration, bei der die Hälfte der behandelten Zellen absterben, d.h. eine Reduktion der Vitalität im Vergleich zum Ausgangszustand um 50% (V50). Hierzu wurde die Vitalität der Zellen nach 48 h mit Hilfe der fluoreszierenden Farbstoffe Vybrant Ruby® und Sytox® gemessen. Dabei zeigte sich eine links-schiefe Verteilung der V50-Werte für Oxaliplatin mit einem Wert < 10 µM bei einem Großteil der Zelllinien. Nur neun der Zelllinien des Trainingssatzes wiesen einen V50-Wert > 10 µM auf (Abb. 8 links). Nach Logarithmieren ergab sich die in Abb. 8 rechts dargestellte Verteilung.

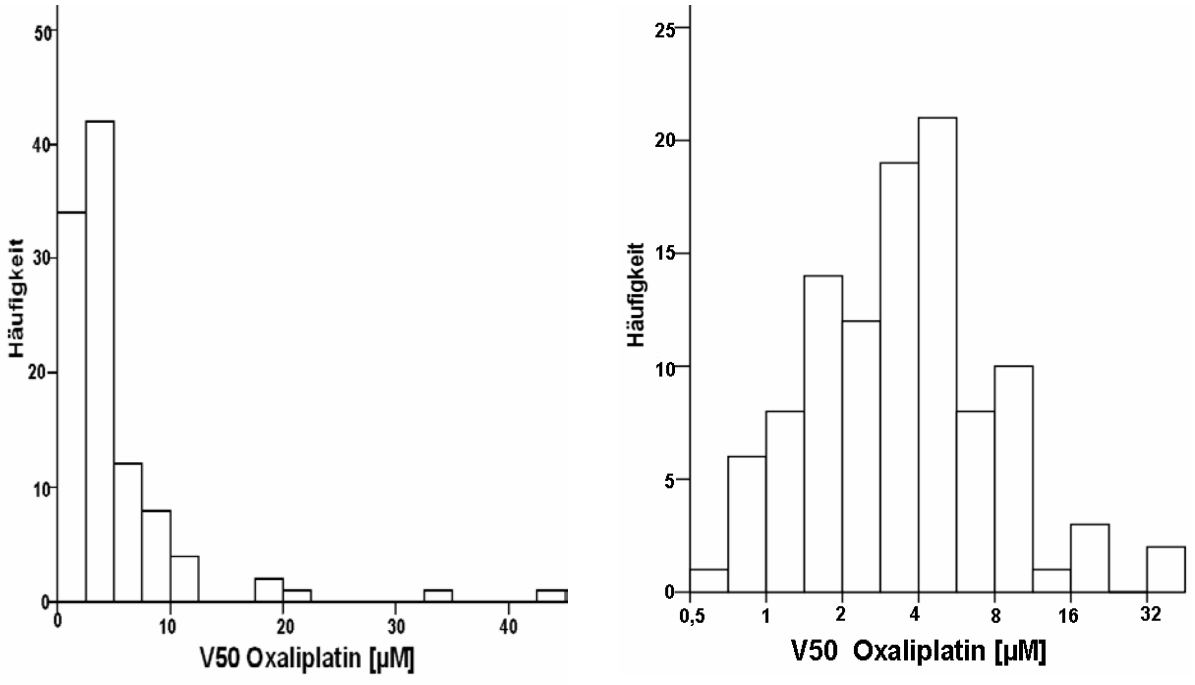


Abb. 8 Verteilung der V50-Oxaliplatin-Konzentration im Trainingssatz. V50 ist diejenige Konzentration, bei der eine Absterberate der LCLs von 50% nach 48 h bei 37°C auftrat. Links sind die V50-Werte in linearer Skalierung, rechts in logarithmischer aufgetragen.

4.2.2 Proliferationshemmung

Eine inhibierende Wirkung von Oxaliplatin auf die Zellteilung wurde durch die Dispersion des CFSE-Signals als endogenem Proliferationsmarker gemessen. Dabei zeigte sich eine Hemmung der Proliferationsrate um 50% bei 77 Zelllinien zwischen 0,13 und 7,9 µM Oxaliplatin (P50). Zwei Zelllinien wiesen einen 17-fach höheren P50-Wert auf, während eine sogar einen 35-fach höheren P50-Wert zeigte.

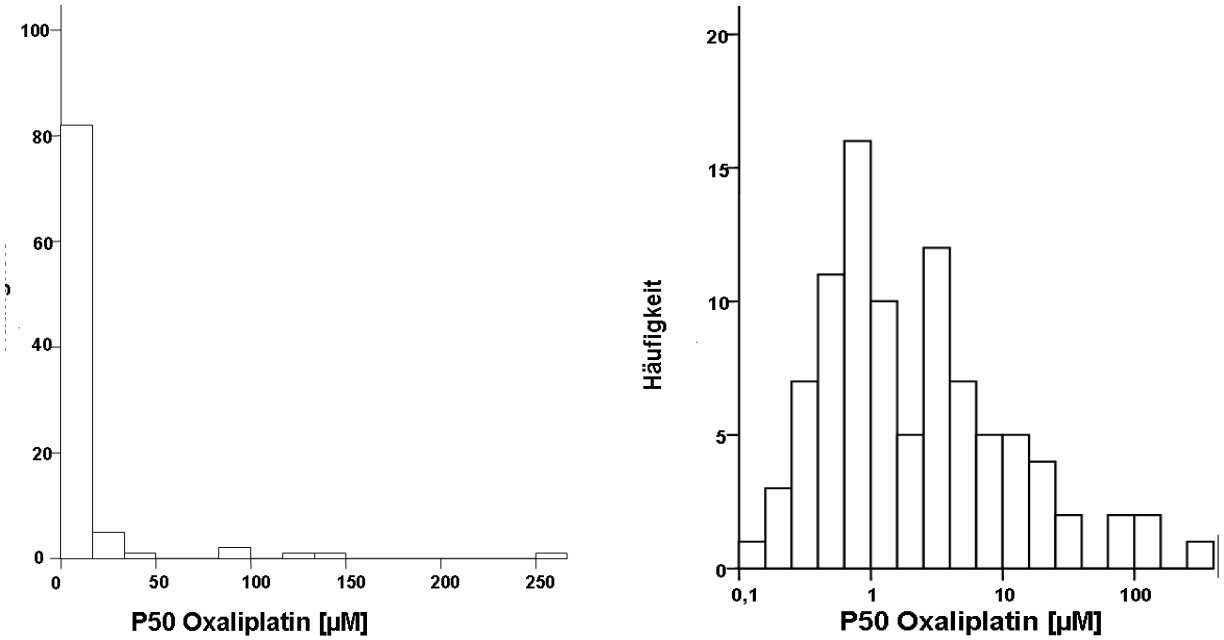


Abb. 9 Verteilung der P50-Oxaliplatin-Konzentration. P50 ist die Konzentration, bei der die Proliferation der Zelllinien um 50 % gehemmt wird. Diese konnte nur für 93 Zelllinien des Trainingssatzes bestimmt werden. Links ist die Häufigkeitsverteilung der entsprechenden P50-Werte in linearer, rechts in logarithmischer Skalierung veranschaulicht.

4.2.3 DNA-gebundenes Platin

Zytostatisch wirksam ist in erster Linie der DNA-gebundene Anteil des Oxaliplatins. Daher sollte dieser in meiner Studie quantifiziert werden. Die DNA der mit Oxaliplatin behandelten Zellen wurde nach 24 h isoliert und ihr Platingehalt mittels Atomabsorptionsspektrometrie gemessen (siehe 3.8.3). Diese Messungen wurden anhand der von mir isolierten DNA aus den Oxaliplatin-behandelten Zellen in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. R.-A. Hilger am Universitätsklinikum Essen durchgeführt. Hier wiesen die meisten der behandelten Zellen einen Platingehalt von 5-13 pg/µg DNA auf. Eine Zelllinie hatte sogar bis zu 28 pg Platin/µg DNA eingelagert. Sieben Proben, die unter 5 ng/l lagen, wurden für die statistische Auswertung nicht berücksichtigt.

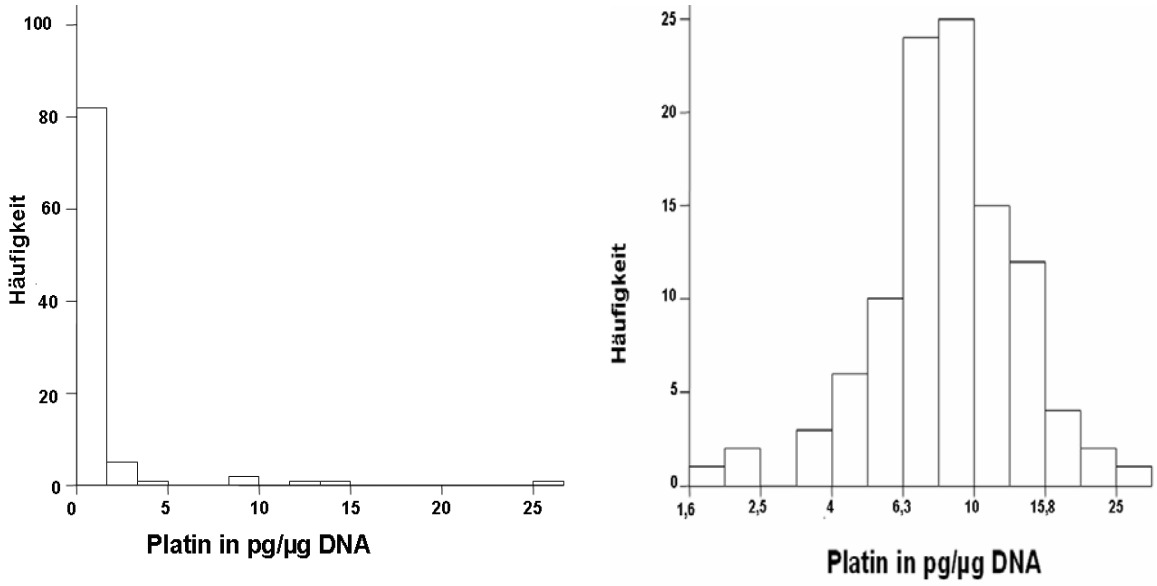


Abb. 10 Einlagerung von Oxaliplatin in die DNA. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C wurde die von der DNA aufgenommene Platinmenge mit Atomabsorptionsspektrometrie gemessen. Wie in Abb. 8 und Abb. 9 ist die Verteilung im linken Bild in linearer, im rechten in logarithmischer Achsenskalierung aufgetragen. Die Platinmessungen wurden freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. R.-A. Hilger am Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

4.2.4 Einfluss basaler Proliferationsrate auf V50, P50 und Platineinlagerung

Bei der Verwendung von LCLs spielen neben erblichen auch nicht-erbliche Komponenten eine wichtige Rolle (Stark et al. 2010). Eine wichtige Determinante bei der Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber zytotoxischen Substanzen ist die basale Proliferationsrate. Aus der klinischen Erfahrung weiß man, dass Zellen mit hoher Teilungsrate besser auf eine Chemotherapie ansprechen als solche mit geringer Teilungsrate. Entsprechend dieser Annahme wurde der Einfluss der basalen Proliferationsrate auf die Empfindlichkeit der LCLs gegenüber Oxaliplatin untersucht und die Stärke dieses Zusammenhangs eruiert. Hierzu verhalf eine univariate parametrische Korrelationsanalyse nach vorheriger Überprüfung auf Normalverteilung. Tatsächlich konnte ein erheblicher Einfluss der basalen Proliferationsrate auf die Empfindlichkeit der LCLs gegenüber Oxaliplatin gemessen werden. Dieser Zusammenhang war in Bezug auf die Proliferationshemmung (P50) und stärker noch hinsichtlich der Zellvitalität (V50) zu beobachten (Abb. 11).

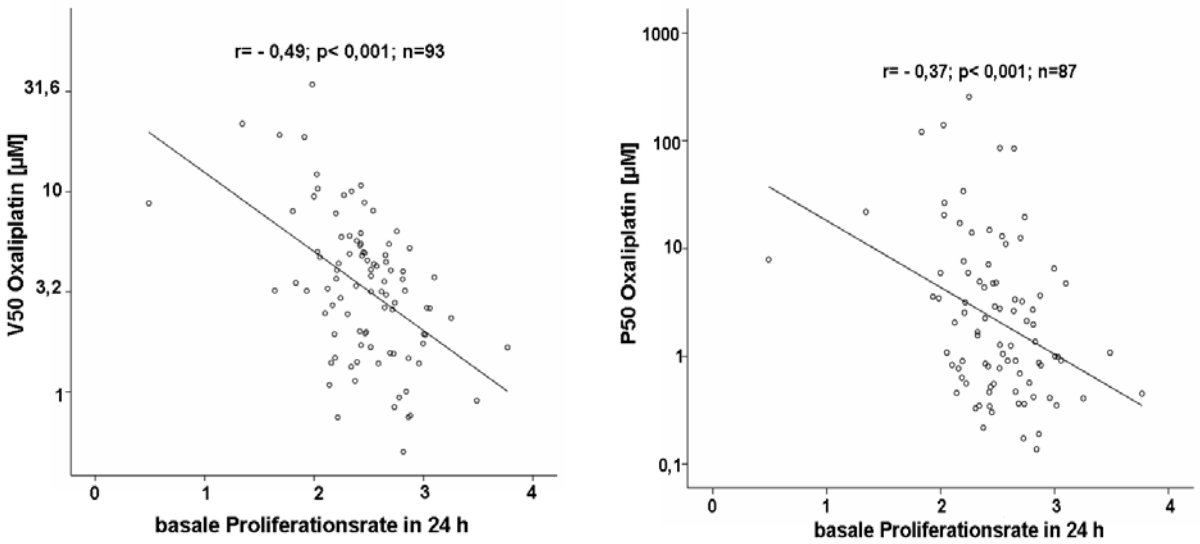


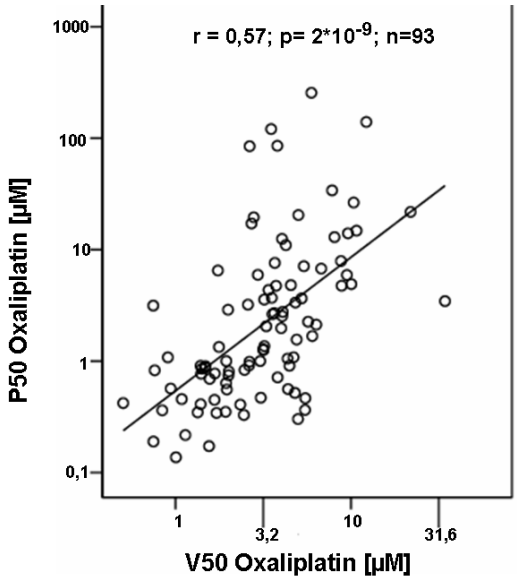
Abb. 11 Basale Proliferationsrate ($P_{basal, 24h}$) und Oxaliplatin-Empfindlichkeit. Links ist die Korrelation mit der Vitalitätsminderung (V50), rechts mit der Proliferationshemmung (P50) veranschaulicht. Angegeben sind jeweils der Korrelationskoeffizient r nach Pearson, die zugehörige statistische Signifikanz p und die Stichprobengröße n.

4.2.5 Korrelation von V50, P50 und Platineinlagerung

Als nächstes sollte untersucht werden, inwieweit die zuvor dargestellten Funktionsmessungen miteinander korrelieren. Nach Logarithmieren der Rohdaten konnte eine Normalverteilung dieser Parameter angenommen werden, was eine parametrische Korrelationsanalyse ermöglichte. Dabei war ein stark positiver Zusammenhang der Effekte von Oxaliplatin auf die Vitalitätsminderung und die Proliferationshemmung zu verzeichnen (r = 0,57, p = 2*10-9, Tab. 18 und Abb. 12 links). Eine schwächere Beziehung ergab sich zwischen der Platineinlagerung und der Vitalitätsminderung, d.h. mehr DNA-gebundenes Platin ging tendenziell mit einem niedrigeren V50-Wert und somit mit einer höheren Oxaliplatin-Sensitivität einher (Abb. 12 rechts). Keinerlei Korrelation war zwischen der Platineinlagerung und der Proliferationshemmung erkennbar. In der nicht-parametrischen Analyse zeigten sich sehr ähnliche Beziehungen.

	P50	Platin
V50	r=0,57; p<0,001	r=-0,17; p=0,08
P50		r=0,06; p=0,6

Tab. 18 Korrelation zwischen Vitalitätsminderung, Proliferationshemmung und Platineinlagerung. Diese Daten basieren jeweils auf den logarithmierten Rohdaten. Dies erlaubte eine parametrische Korrelationsanalyse; angegeben sind die entsprechenden Koeffizienten r nach Pearson mit der zugehörigen statistischen Signifikanz p.



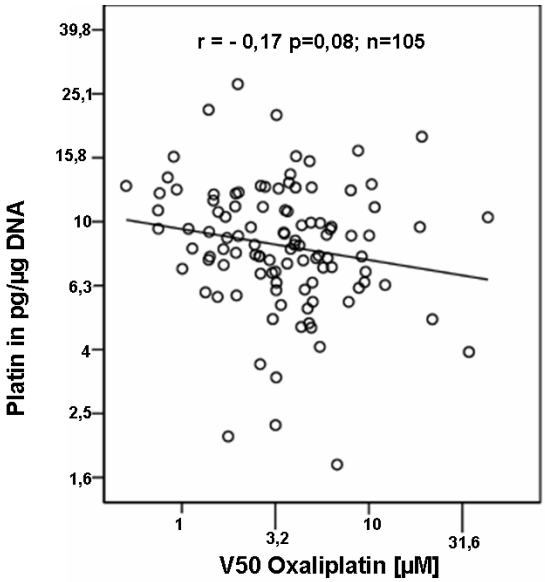


Abb. 12 Korrelation zwischen Proliferationshemmung (P50) bzw. Platineinlagerung mit der Vitalitätsminderung (V50). Links ist der Zusammenhang zwischen P50 und V50, rechts zwischen Platineinlagerung und V50 abgebildet. Angegeben sind jeweils der Korrelationskoeffizient r nach Pearson, die zugehörige statistische Signifikanz p und die Stichprobengröße n.

4.3 Expression ausgewählter Kandidatengene

Im Rahmen der Dissertation wurde in der Fachliteratur über Transporter und Zellreparatursysteme recherchiert, die für die Wirksamkeit für Oxaliplatin besonders wichtig sind. Dies scheinen neben den Nukleotidexzisions-Reparaturenzymen *ERCC2* und *ERCC5* vor allem Kupfer-Transporter zu sein (siehe Einleitung 1.6). Von den beiden humanen Kupfer-Einwärts-Transportern wurde der *SLC31A1* untersucht; der *SLC31A2* ist in LCLs kaum vorhanden. Bei den Kupfer-Auswärtstransportern wurden zunächst sowohl *ATP7A* als auch *ATP7B* untersucht. Da sich letzterer in der Pilotanalyse bei 16 LCLs vielfach als sehr schwach exprimiert herausstellte, wurde dieser im weiteren Verlauf nicht mehr berücksichtigt. Die Expression dieser Kandidatengene wurde nach Behandlung mit Oxaliplatin mittels *Real Time*-PCR gemessen, der postulierten Hypothese folgend, Zellen würden mit der Regulation spezifischer Gene den Effekten von Oxaliplatin entgegenwirken. Eine Normierung erfolgte außer der Quantifizierung des RNA-Gehalts vor der reversen Transkription durch die Messung der Expression von Referenzgenen.

4.3.1 Referenzgene

Zunächst sollten Referenzgene definiert werden, deren Expression sich bei Behandlung mit Oxaliplatin über 24 h weitgehend stabil verhält. Dazu wurde in einer Pilotstudie mit 16 LCLs die Expressionsstärke von *B2MG*, *GAPDH*, *HPRT1* und *UBC* unter Behandlung mit einer mittleren und höheren Oxaliplatin-Konzentration mit unbehandelten Kontrollen verglichen

(Abb. 13). Die deutlichste Veränderung durch Oxaliplatin war für *HPRT1* zu verzeichnen, welches stark signifikant supprimiert wurde. Demgegenüber waren die Effekte von Oxaliplatin – insbesondere bei der hohen Konzentration – auf die Expression der anderen drei Gene wesentlich schwächer ausgeprägt und es wurde ein gewichtetes Mittel aus diesen gebildet. Dabei zeigte sich in der Gesamtgruppe eine geringe Suppression durch Oxaliplatin im Vergleich zur Kontrolle, die aber statistisch nicht signifikant war (Abb. 14 links), so dass das gewichtete Mittel aus *B2MG*, *GAPDH* und *UBC* zur Normierung für die weiteren Analysen in Betracht kam.

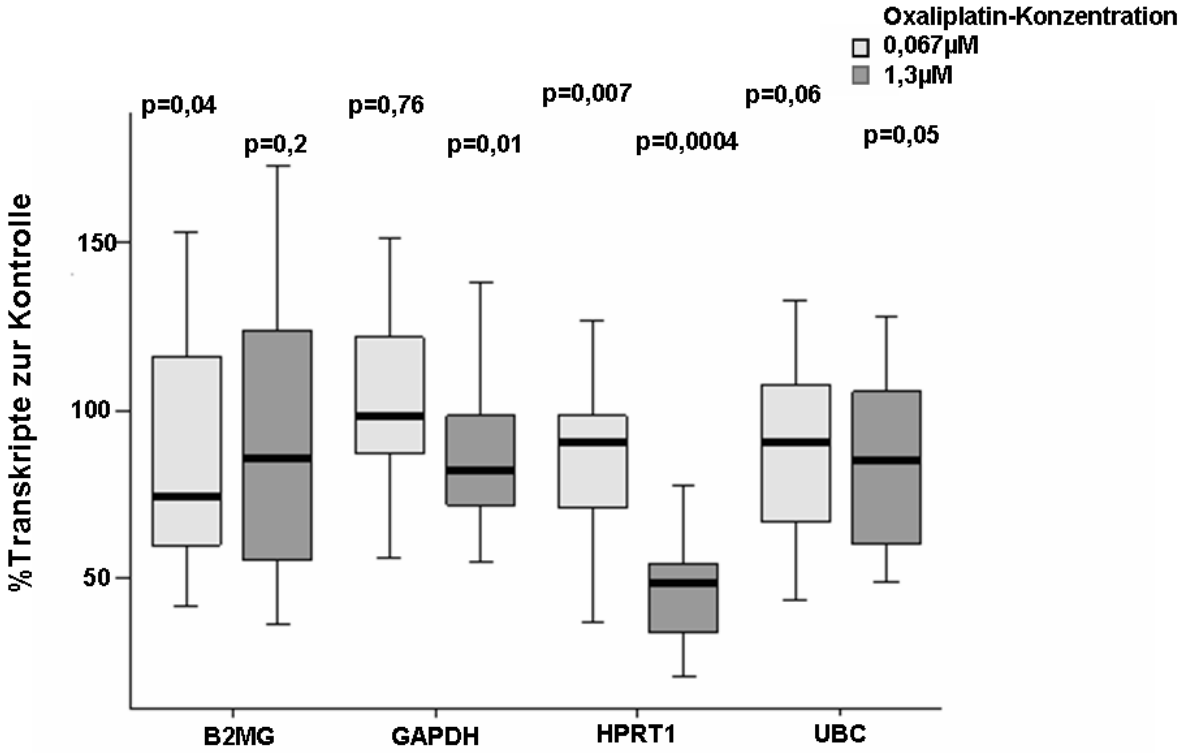


Abb. 13 Effekte von Oxaliplatin auf die Expression von vier Referenzgenen in 16 LCLs. Die Zellen wurden mit einer niedrigen (0,067 µM) und mittleren (1,3 µM) Oxaliplatin-Konzentration für 24 h bei 37°C behandelt. Der Messwert jeder Oxaliplatin-behandelten Probe wurde auf eine unbehandelte Kontrolle bezogen und die Verteilung der so erhaltenen prozentualen Werte für die 16 LCLs ist in der Grafik abgebildet. Die angegebenen p-Werte wurden mit dem gepaarten Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

4.3.2 Ausgewählte Kandidatengene für Oxaliplatin-Transport und DNA-Reparatur

Bei den Kandidatengenen war – ohne Normierung – insbesondere eine Reduktion der *SLC31A1*-Transkription bei der höheren Oxaliplatin-Konzentration zu verzeichnen. Die entsprechenden Daten für die Kandidatengene mit Bezug auf das gewichtete Mittel der Referenzgene ist in Abb. 15 dargestellt. Bei den für die Transporter kodierenden Gene war unter Inkubation mit 1,3 µM Oxaliplatin eine Induktion für *ATP7A* und eine Suppression für

SLC31A1 zu beobachten (jeweils p = 0,0004). Betreffend der Nukleotid-Exzisions-Gene zeigte sich bei *ERCC2* keine Veränderung bei Exposition gegenüber Oxaliplatin, während bei *ERCC5* mit beiden Konzentrationen eine Steigerung der Transkription eintrat (jeweils p = 0,001).

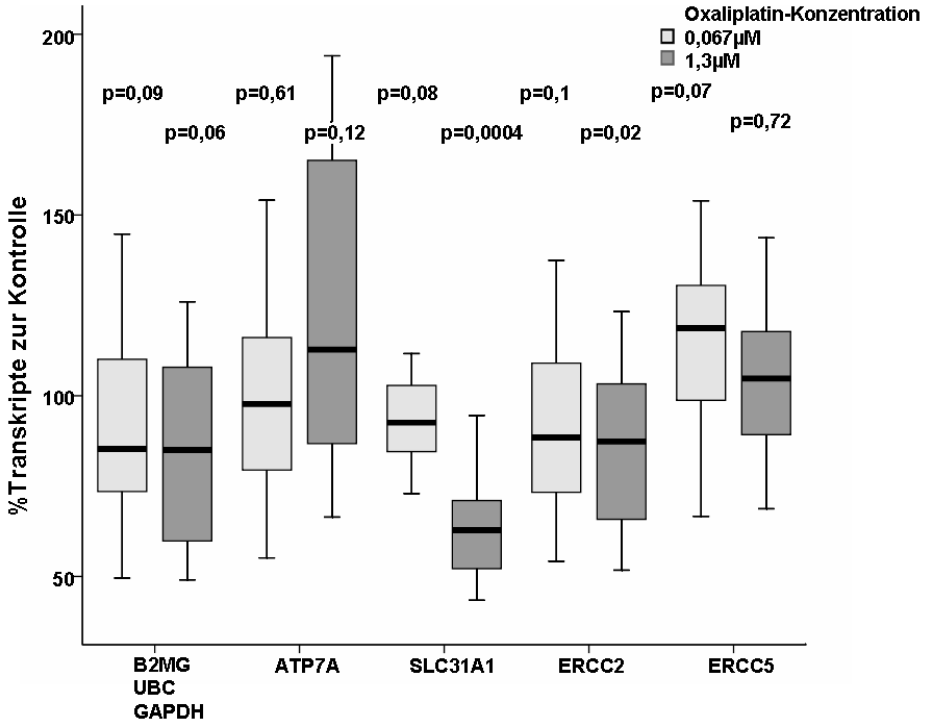


Abb. 14 Einfluss von Oxaliplatin auf die Expression der Kandidatengene in der Pilotstudie. Die Zellen wurden wie in Abb. 13 beschrieben behandelt. Die Grafik zeigt hier die Verteilung der prozentualen Werte bei Bezug auf die jeweilige Kontrolle ohne Oxaliplatin, wobei hier für *ATP7A, SLC31A1, ERCC2* und *ERCC5* die direkt gemessenen Werte, d.h. ohne Bezug auf Normierungsgene, dargestellt sind. Die p-Werte wurden mit dem gepaarten Wilcoxon-Rangsummentest errechnet.

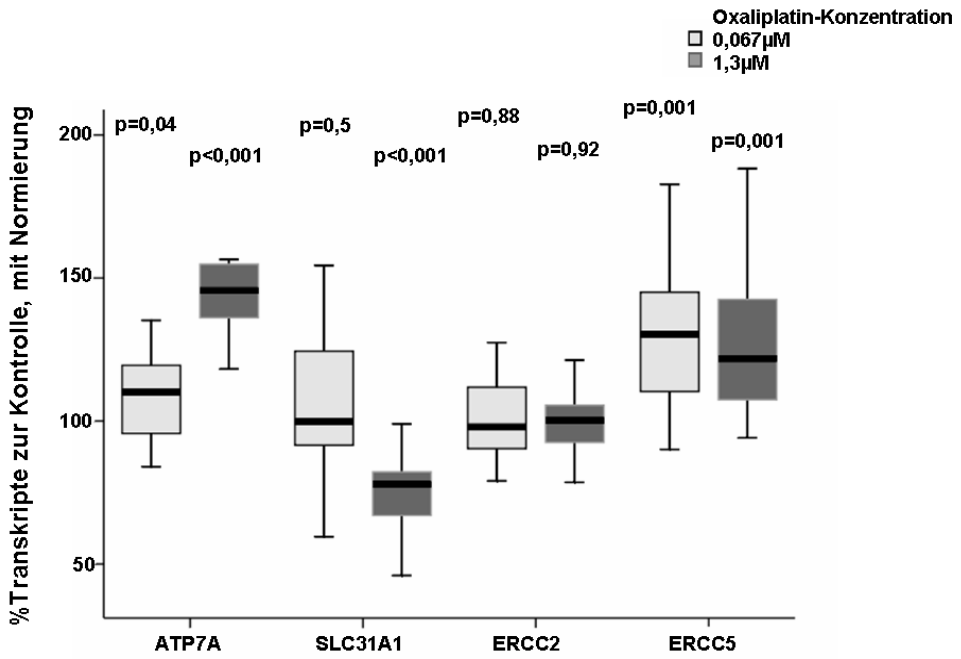


Abb. 15 Effekt von Oxaliplatin auf die Expression der Kandidatengene unter Bezug auf die Referenzgene. Die 16 hier verwendeten Zelllinien wurden wie in Abb. 13 behandelt. Dargestellt ist die Verteilung der prozentualen Werte bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, wobei jeweils Werte dargestellt sind, die auf das gewichtete Mittel aus *GAPDH, HPRT1* und *UBC* normiert sind. Zur Berechnung der p-Werte wurde der Wilcoxon-Rangsummentest angewandt.

Die zuvor an 16 Zelllinien gewonnen Daten über Expressionsänderungen von *ATP7A*, *SLC31A1* und *ERCC5* durch Oxaliplatin (Abb. 15) wurden am gesamten Trainingsset überprüft. Der stärkste Effekt war hier für die Suppression von *SLC31A1* zu verzeichnen, auch nach Normierung auf die Referenzgene ($p=1{,}4*10^{-14}$). Für *ATP7A* zeigte sich wie zuvor eine Induktion (Abb. 16 links), die jedoch nach Bezug auf die Referenzgene nur noch gering ausgeprägt war (Abb. 16 rechts). Für *ERCC5* war keine nennenswerte Veränderung durch Oxaliplatin festzustellen.

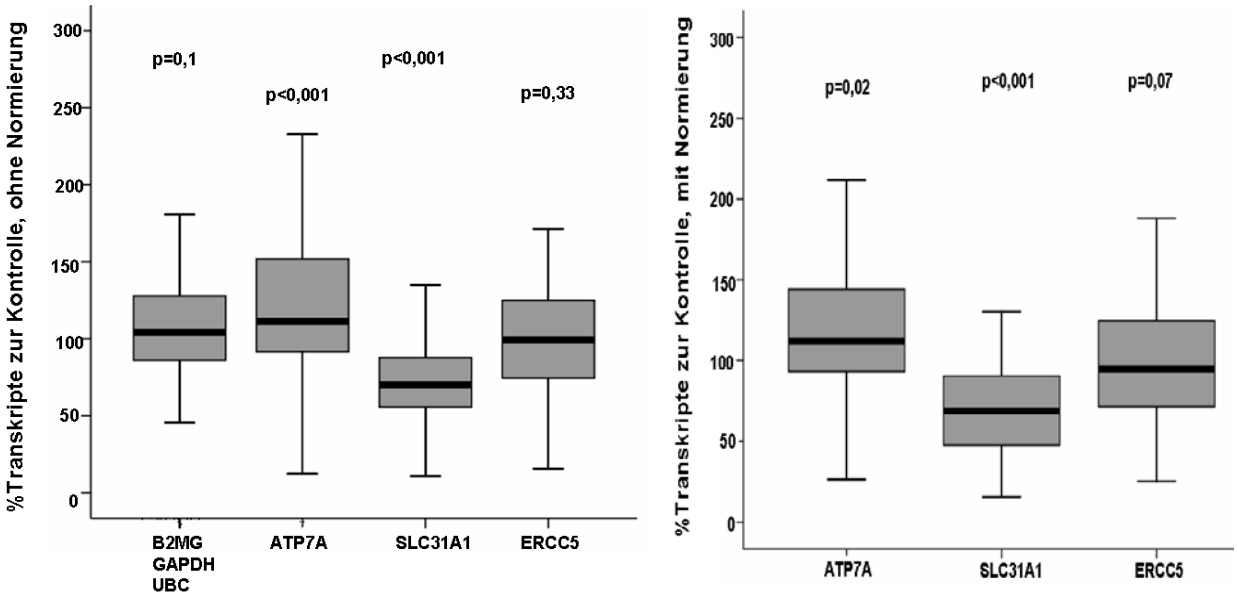


Abb. 16 Genexpression unter 1,3 µM Oxaliplatin in der Trainingsstudie. Links ist die prozentuale Verteilung zur unbehandelten Kontrolle für das gewichtete Mittel aus den Referenzgenen *B2MG, GAPDH* und UBC sowie für die Zielgene (nicht normiert) *ATP7A, SLC31A1* und *ERCC5* abgebildet. Im rechten Bild wurden die Expression der Zielgene auf das gewichtete Mittel der Referenzgene normiert. Die Inkubationsbedingungen entsprachen denen von Abb. 13, die p-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummentest ermittelt.

4.4 Korrelation Genexpression mit V50,P50 und DNA-gebundenem Platin

4.4.1 Vitalitätsminderung

Zur Klärung eines möglichen Zusammenhangs von V50 mit basaler und Oxaliplatin-modulierter Expression von *ATP7A, SLC31A1, ERCC2* (nur basal, da keine nennenswerte Veränderung wie oben gezeigt) und *ERCC5* wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Zuvor galt es zu überprüfen, ob der verwendete Parameter (V50, Expression) mit einer Normalverteilung vereinbar ist. Dies war der Fall für logarithmierte Werte für V50 und die auf die Referenzgene normierte basale Expression der Zielgene. Bei den Oxaliplatin-modulierten Expressionen traf diese Annahme näherungsweise zu. Eine höhere Expression von *ATP7A* und *SLC31A1* war univariat mit einem niedrigeren V50-Wert als Maß für eine höhere Oxaliplatin-Empfindlichkeit verbunden (Abb. 17). Oben war ein starker Einfluss der basalen Proliferationsrate $P_{basal,\ 24\,h}$ auf die Vitalitätsminderung V50 durch Oxaliplatin demonstriert worden (Abb. 11). Daher wurde in einem multivariaten Regressionsmodell V50 in Abhängigkeit von $P_{basal,\ 24\,h}$ und der basalen Expression von *ATP7A* bzw. *SLC31A1* analysiert. Dabei hatte neben $P_{basal,\ 24\,h}$ auch die basale Transkriptionsrate von *SLC31A1*, nicht aber diejenige von *ATP7A*, einen nominal statistisch signifikanten Einfluss auf P50. Zwischen

den durch Oxaliplatin induzierten Expressionsänderungen (siehe Abb. 16) und P50 bestand indes kein Zusammenhang (Abb. 17).

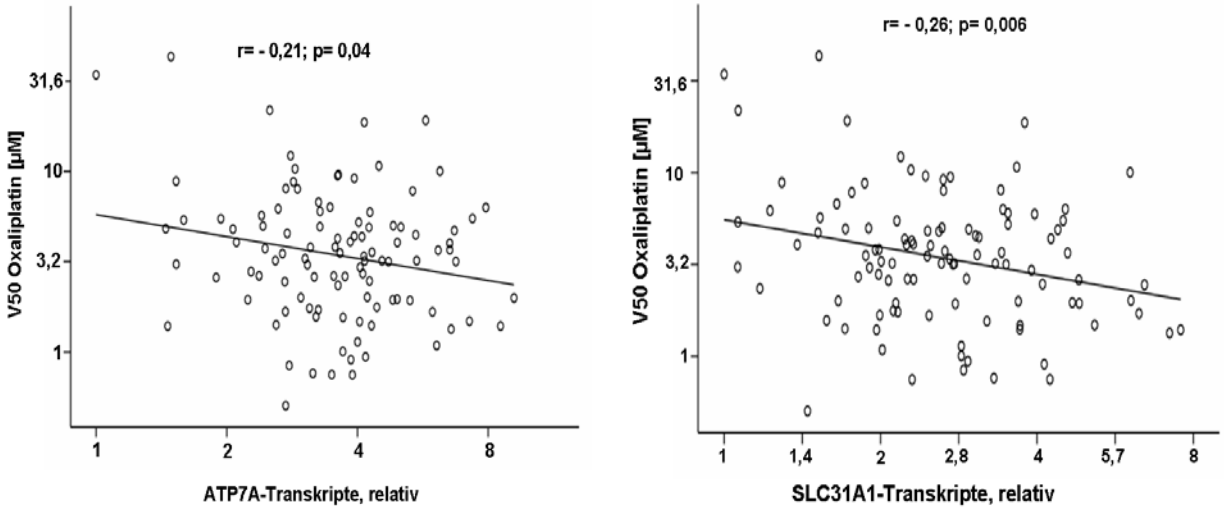


Abb. 17 Basale Expressionsrate von Oxaliplatin-Transportern und Vitalitätsminderung. Im linken Bild ist die Beziehung mit dem Auswärtstransporter *ATP7A*, im rechten mit dem Einwärtstransporter *SLC31A1* illustriert, in Bezug zu derjenigen Oxaliplatin-Konzentration, bei welcher der halbmaximale Effekt der Vitalitätsabnahme zu beobachten war (V50). Die Expressionsdaten wurden auf die Referenzgene *B2MG*, *GAPDH* und *UBC* normiert und dann in relativen Einheiten zum jeweils niedrigsten Wert aufgetragen. Die Stärke der Korrelation ist mit dem Koeffizienten r nach Pearson, die statistische Signifikanz als p-Wert angegeben.

4.4.2 Proliferationshemmung

Analog zur oben beschriebenen Vitalitätshemmung wurde auch für die Proliferationshemmung (P50) ein möglicher Einfluss der Expression der genannten Kandidatengene analysiert. Auf Basalniveau zeigte sich wie zuvor bei V50 (Abb. 17 rechts) ein Zusammenhang zwischen der basalen Transkription von *SLC31A1* und der Oxaliplatin-vermittelten Proliferationshemmung. Zelllinien mit einer höheren Zahl von *SLC31A1*-Transkripten waren dabei tendenziell empfindlicher gegenüber Oxaliplatin, d.h. wiesen einen niedrigeren P50-Wert auf (Abb. 18 links).

Insgesamt führte die Behandlung mit 1,3 µM Oxaliplatin bei den meisten Zelllinien zu einer Verminderung der *SLC31A1*-Expression und korrelierte mit den P50-Werten (Abb. 18 rechts): Eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Oxaliplatin-induzierter Proliferationshemmung war begleitet von einer Suppression der *SLC31A1*-Transkription. Auch nach Adjustierung auf die basale Proliferationsrate (Abb. 11 rechts) erwies sich diese Suppression als nominal signifikanter Prädiktor der Proliferationshemmung (p = 0,03).

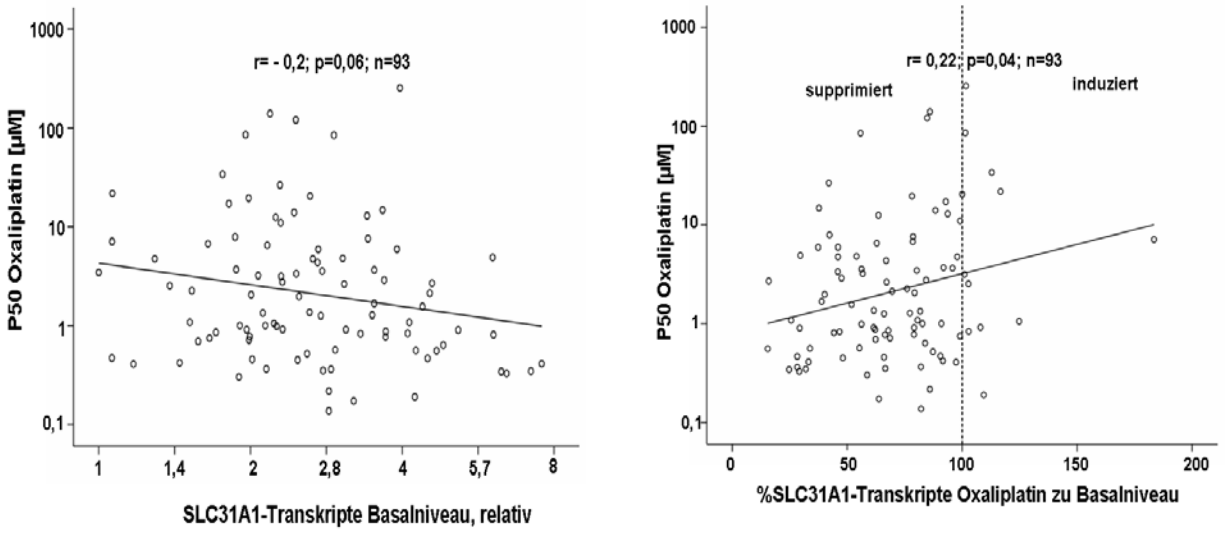


Abb. 18 Hemmung der Proliferationsrate in Abhängigkeit des Expressionsstatus von *SLC31A1*. Der P50-Wert als Maß für die durch Oxaliplatin hervorgerufene Proliferationshemmung ist links in Relation zur basalen *SLC31A1*-Expression, rechts zu derjenigen nach Behandlung mit 1,3 µM Oxaliplatin dargestellt. Die Expressionsdaten wurden wie üblich auf *B2MG, GAPDH* und *UBC* normiert. Die durchgezogene Linie entspricht der linearen Regression, wobei jeweils der Korrelationskoeffizient r nach Pearson, der p-Wert und der Stichprobenumfang n angegeben sind. Die gestrichelte vertikale Linie im rechten Bild stellt das Basalniveau der *SLC31A1*-Expression dar.

4.4.3 Platingehalt in DNA

Im weiteren Verlauf wurde die Beziehung zwischen Platin-gebundener DNA-Menge und der Expression von *SLC31A1*-Transkripten erforscht. Zwischen DNA-gebundenem Platin bestand kein Zusammenhang mit der basalen Expression von *SLC31A1*, wohl aber mit der Modulation durch Oxaliplatin: Eine verstärkte Platineinlagerung war insgesamt mit einer ausgeprägteren *SLC31A1*-Suppression verbunden (Abb. 19). Eine Adjustierung auf die basale Proliferationsrate war hier nicht angezeigt, da diese das DNA-gebundene Platin nicht beeinflusste.

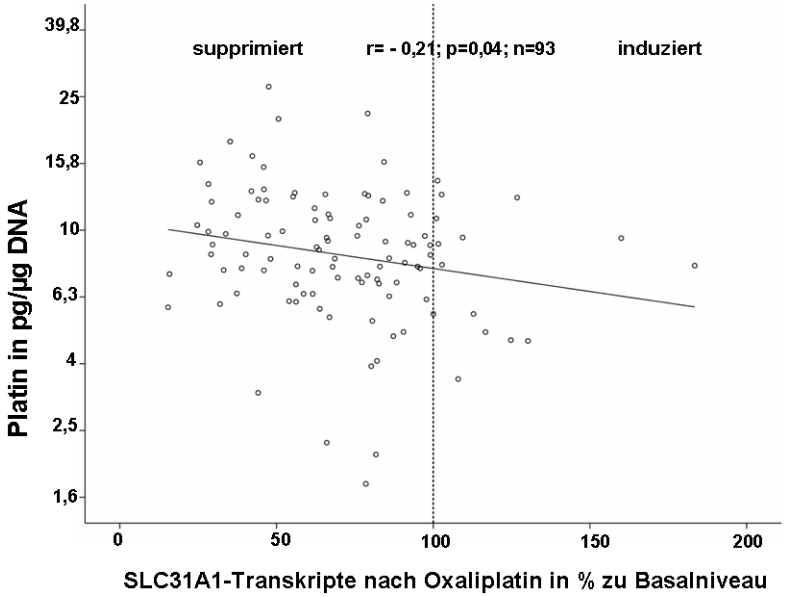


Abb. 19 Beziehung der Oxaliplatin-vermittelten Effekte auf die SLC31A1-Transkription zu DNA-gebundenem Platin. Die Darstellungsweise und statistische Bewertung ist analog zu derjenigen in Abb. 18, wobei auf der Ordinate anstelle der Proliferationshemmung der DNA-Platingehalt nach 24 h Inkubation mit 1,3 µM Oxaliplatin aufgetragen ist.

4.5 Polymorphismen im Kandidatengen SLC31A1

Für die Genregion des *SLC31A1* einschließlich flankierender Regionen (10 kbp im 5'-Bereich, 1 kbp im 3'-Bereich) wurden die mit den untersuchten LCLs korrespondierenden Genotypen aus den HapMap (http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/)- und den 1000 Genomes (http://www.1000genomes.org/)-Daten heruntergeladen. In dieser Region fanden sich 67 polymorphe Marker. Diese wurden anschließend univariat auf Assoziation mit den die global-zelluläre Oxaliplatin-Empfindlichkeit beschreibenden Parametern V50 und P50, mit dem DNA-Platingehalt und der *SLC31A1*-Expression getestet. Für letztere wurde zwischen dem Basalniveau, der Expression unter Oxaliplatin und den Oxaliplatin-induzierten Veränderungen (d.h. als Differenz zwischen der unter Oxaliplatin im Vergleich zum Basalniveau gemessenen Transkription) unterschieden.

Der in Intron 1 gelegene SNP rs11793978 war mit der durch Oxaliplatin modulierten *SLC31A1*-Expression assoziiert (Abb. 20). Bei der kaukasischen Bevölkerung kommt das Variantenallel dieses Polymorphismus mit einer Häufigkeit von etwa 16% vor. Wie oben dargestellt (Abb. 16), kommt es durch Oxaliplatin zumeist zu einer Suppression der *SLC31A1*-Expression. Bei Zelllinien mit Homozygotie für das Wildtyp-Allel A trat dieser Effekt stärker hervor. Andere Polymorphismen im Bereich des *SLC31A1*-Gens waren nicht mit den untersuchten Phänotypen assoziiert, d.h. weder mit den Expressions-, noch mit den Zellvitalitätsparametern oder der DNA-Platineinlagerung.

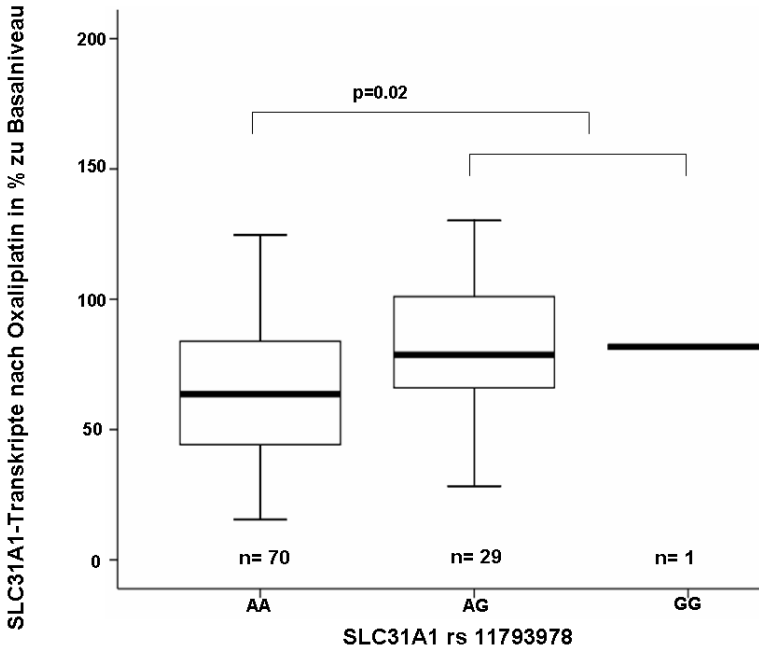


Abb. 20 *SLC31A1*-Expressionsänderung durch Oxaliplatin in Abhängigkeit der Genvariante rs11793978. Die statistische Testung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test, wobei die eine Zelllinie mit Homozygotie für das Variantenallel mit den heterozygoten Linien zusammengefasst wurde.

4.6 Trainingsset mit Genotyp-Daten aus dem Resequenzierungs-projekt

Diese LCLs waren in Bezug auf Genpolymorphismen Genom-weit analysiert (im Rahmen des HapMap-Projekts und des „1000 *human resequencing projects*“, in welchem eine komplette Resequenzierung erfolgte). Diese Genom-weiten Daten sollten nun mit den von mir erhobenen funktionellen Daten in Beziehung gesetzt werden. Voraussetzung für eine sinn-volle Prüfung eines Einflusses der invariaten Genotypen ist eine substanzielle Repro-duzierbarkeit der gemessenen Phänotypen innerhalb einer Zelllinie. Dazu wurde für 16 LCLs eine zweite Messung im Abstand von mindestens acht Wochen durchgeführt, bei welcher die gesamte Prozedur, beginnend mit der Entnahme der Zellen aus flüssigem Stickstoff, wiederholt wurde. Dabei zeigte sich eine deutliche Inter-Tag-Korrelation für die Parameter V50 und P50, nicht jedoch für die Platineinlagerung in DNA. Daher eigneten sich prinzipiell die beiden erst- genannten Parameter für eine Genom-weite Analyse. Allerdings war bei P50 im Gesamtset der LCLs nicht für alle Linien sinnvoll eine Oxaliplatin-Konzentration zu bestimmen, bei der ein halbmaximaler Effekt eintrat. Für die Assoziationsanalyse mit den Genotypen wurde deshalb V50 verwendet.

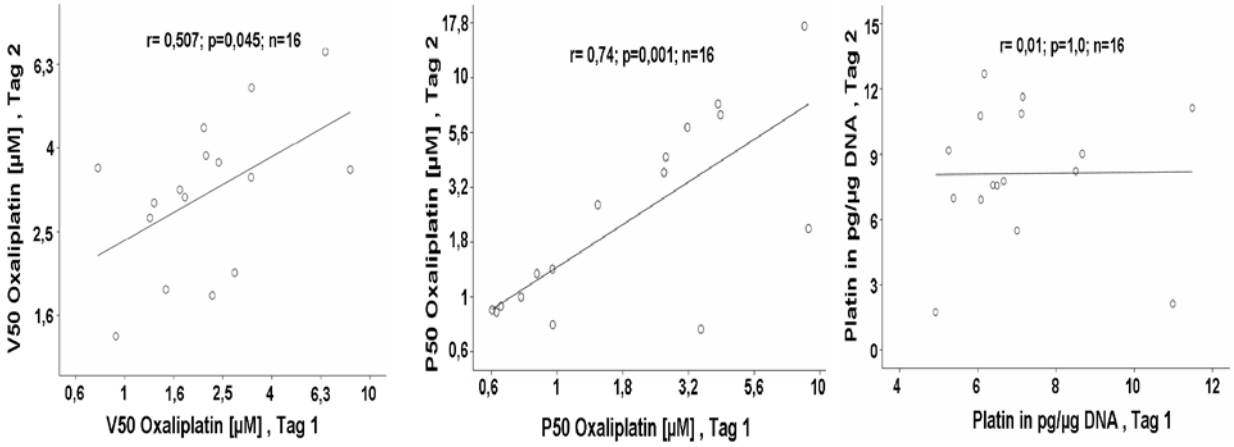
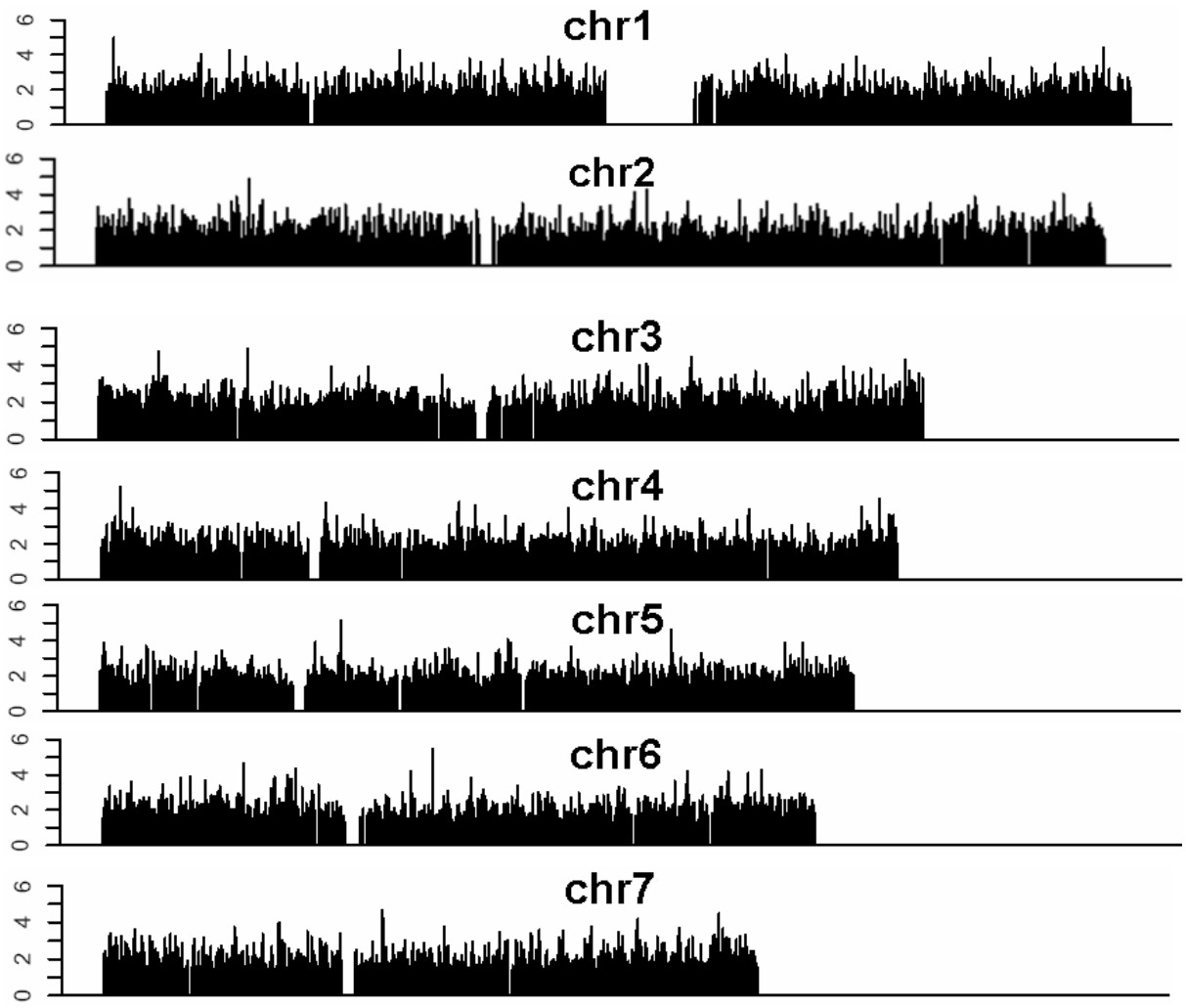


Abb. 21 Inter-Tag-Korrelationen der funktionellen Phänotypen. Aus dem Gesamtset der LCLs wurden 16 Zelllinien zweimal an unterschiedlichen Tagen gemessen. Für die Parameter V50 (links), P50 (Mitte) und DNA-gebundenes Platin (rechts) sind die Korrelationen der beiden Messtage (Tag 1 *versus* Tag 2) dargestellt. Angegeben ist jeweils der parametrische Korrelationskoeffizient r mit dem zugehörigen p-Wert für die statistische Signifikanz. Die eingezeichnete Linie stellt eine lineare Regressionsgerade dar.

Für V50 (die Oxaliplatin-Konzentration, bei welcher ein halbmaximaler Effekt auf die Zellvitalität eintrat) wurde univariat mit dem gesamten Satz der vorhandenen Genom-weiten Genotypen eine Assoziationsanalyse durchgeführt. Diese Analyse unter Verwendung von

etwa einer Million von Genvarianten (gefiltert so dass der heterozygote und der homozygote Variantenallel-Status zusammen mindestens 10% ausmachten) wurde von Herrn Prof. Beißbarth durchgeführt.

Für jedes Chromosom sind diese Daten als Manhattan-Plot dargestellt (Abb. 23). Dabei zeigten sich die beiden stärksten Signale auf Chromosom 9 (FDR jeweils 0,051) und sind mit Pfeilen markiert. Bei der Assoziation zu Beginn dieses Chromosoms handelt es sich um ein Cluster von sechs Varianten in engem genetischen Kopplungsungleichgewicht, wobei der im Plot eingezeichnete Pfeil die stärkste Assoziation (gemessen am p-Wert und der FDR) in diesem Bereich markiert (rs7035616). Die zweitstärkste, mit einem Pfeil versehene Stelle weiter rechts auf dem langen Arm dieses Chromosoms, Assoziation rs74382821 ist ebenfalls singulär, d.h. nicht Teil eines assoziierenden Clusters aus mehreren Genvarianten.



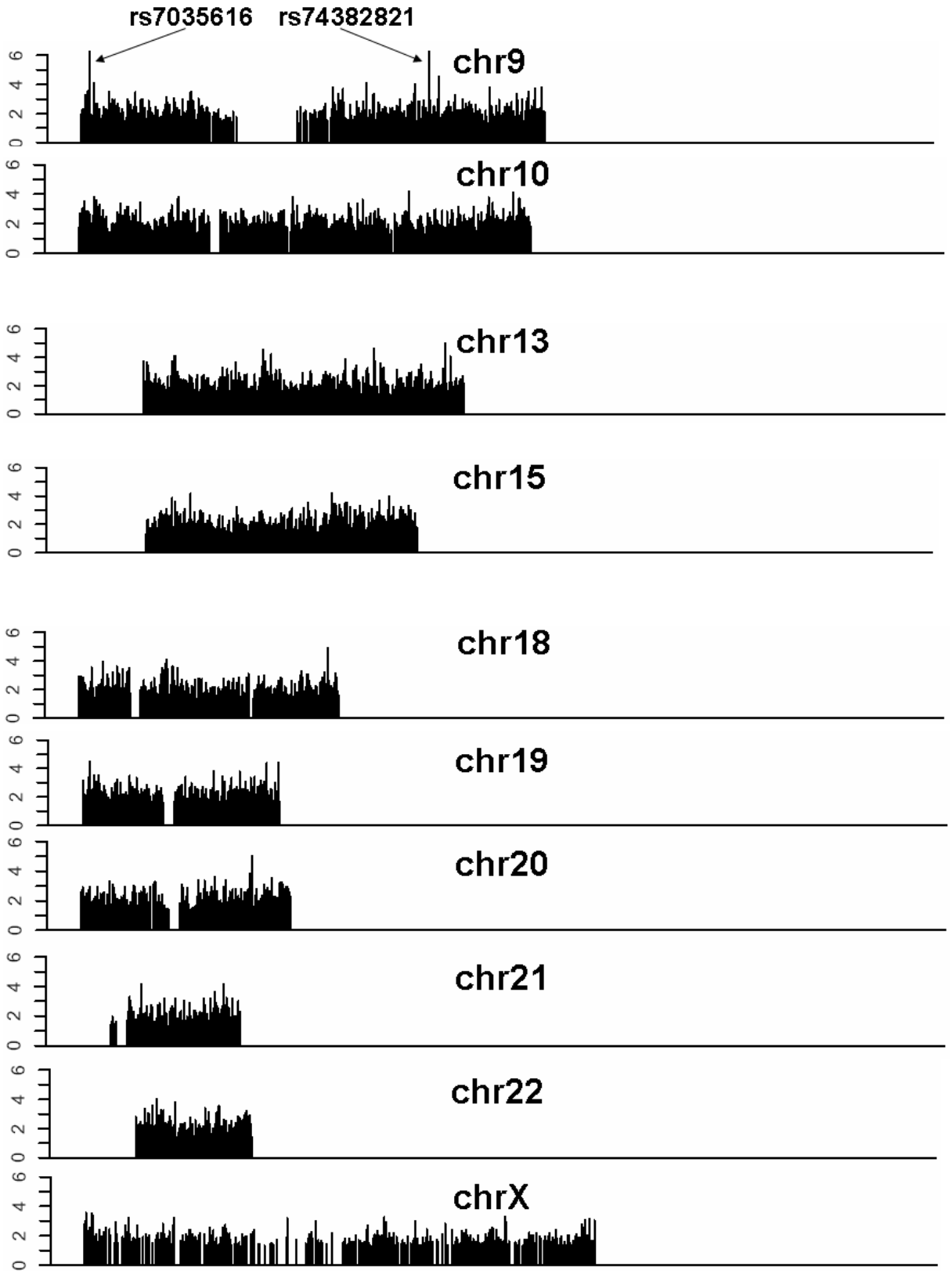

rs7035616
rs74382821
chr9
chr10
chr13
chr15
chr18
chr19
chr20
chr21
chr22
chrX
0 2 4 6

Abb. 22 Manhattan-Plots der Genom-weiten Assoziation mit V50. Auf der Abszisse sind für jedes Chromosom die untersuchten Polymorphismen aufgetragen, wobei Varianten mit mehr als 90% Homozygotie für das häufigere Allel von der Analyse ausgeschlossen wurden. Die Ordinate gibt den für jeden Polymorphismus den negativen dekadischen Logarithmus des p-Wertes der Assoziation mit dem V50-Wert an, welcher mittels des Jonckheere-Terpstra-Trend-Tests berechnet wurde. Diese Analysen und deren grafische Visualisierung erfolgten durch Herrn Prof. Beißbarth, Leiter der bioinformatischen Statistik am Institut für medizinische Statistik in Göttingen.

Die Genom-weiten Assoziationsdaten wurden entsprechend der statistischen Signifikanz auf Basis der p-Werte und der FDR (*false discovery rate*) als Maß für Korrektur auf Multiples Testen geordnet. Dabei wurde etwaiges paarweises genetisches Kopplungsungleichgewicht (LD) mit einem Grenzwert von $r^2 = 0{,}50$ berücksichtigt, d.h. wenn zwei genetische Marker ein LD > 0,50 aufwiesen, wurde nur einer davon ausgewählt. Die auf diese Weise identifizierten 20 stärksten Assoziationen sind nachfolgend aufgeführt und wurden im Testset genotypisiert (siehe Kap.4.7). Im Trainingsset waren zwei SNPs mit einer FDR von 0,051 im Bereich des statistischen Signifikanzniveaus. Eine davon ist im Gen für VLDLR lokalisiert, die andere befindet sich in einer Region ohne bekannte Genannotierung.

SNP	Chromosom:Position[1]	PoGen[2]	Genetisches Element[3]	Basen-Austausch	MAF[4]	p-Wert (roh)	FDR[5]
rs7035616	9:2636161	VLDLR	Intron 2	C>T	0,36	$5{,}5*10^{-7}$	0,051
rs74382821	9:105878263	n.a.	n.a.	C>A	0,08	$5{,}7*10^{-7}$	0,051
rs17164011	7:7163915	n.a.	n.a.	A>C	0,22	$1{,}1*10^{-6}$	0,064
rs4294468	1:170433781	n.a.	n.a.	A>G	0,42	$1{,}3*10^{-6}$	0,064
rs4236272	7:1890751	MAD1L1	Intron 18	C>T	0,39	$3{,}1*10^{-6}$	0,064
rs4379359	7:1864415	MAD1L1	Intron 18	A>T	0,43	$3{,}3*10^{-6}$	0,064
rs12606590	18:34171369	FHOD3	Intron 6	G>A	0,33	$3{,}3*10^{-6}$	0,064
rs587503	6:79257997	n.a.	n.a.	G>C	0,44	$3{,}4*10^{-6}$	0,088
rs3951220	7:13702647	n.a.	n.a.	C>T	0,49	$3{,}7*10^{-6}$	0,064
rs4276397	5:136329576	SPOCK1	Intron 6	C>T	0,15	$3{,}8*10^{-6}$	0,064
rs9648103	7:7245268	C1GALT1	Intron 1	A>T	0,26	$4{,}0*10^{-6}$	0,064
rs2144168	6:140196447	n.a.	n.a.	C>A	0,08	$4{,}2*10^{-6}$	0,064
rs9379445	6:22835186	LOC100996507	n.a.	G>C	0,41	$4{,}4*10^{-6}$	0,064
rs1995016	3:88753302	n.a.	n.a.	G>A	0,52	$4{,}7*10^{-6}$	0,064
rs1997735	6:22827106	LOC100996507	n.a.	C>T	0,23	$5{,}3*10^{-6}$	0,064
rs167677	1:96468117	n.a.	n.a.	A>G	0,35	$5{,}4*10^{-6}$	0,064
rs9411308	9:140000115	MAN1B1	Intron 8	C>T	0,36	$5{,}6*10^{-6}$	0,064
rs9329099	5:179611287	RASGEF1C	Intron 1	G>A	0,43	$6{,}3*10^{-6}$	0,064
rs5007951	1:34034649	CSMD2	Intron 53	G>A	0,13	$6{,}5*10^{-6}$	0,064
rs1727893	3:153849866	ARHGEF26	Intron 5	C>A	0,13	$7{,}2*10^{-6}$	0,064

Tab. 19 Die 20 stärksten SNP-Assoziationen bezüglich Oxaliplatin-Vitalitätshemmung im Trainingsset. [1]gemäß NCBI *Genome Build* 37.3, *Assembly* GRCh37.p5; [2]ein Genbezug ist angegeben, wenn sich der betreffende Marker innerhalb einer Gensequenz ± 10 kbp befindet; [3]bezogen auf die (Haupt-)Transkript-variante der mRNA; [4]MAF = *minor allele frequency* entsprechend HapMap- bzw. *1000 human genomes*-Datenbank für Kaukasier; [5]FDR = false discovery rate; n.a. = nicht anwendbar. Diese Analyse wurde von Herrn Prof. Beißbarth durchgeführt.

4.7 Testset an den LCLs mit eigenen Genotyp-Daten

Die 20 stärksten Assoziationen aus dem Trainingsset (Kapitel 4.6) sollten an LCLs, welche in der Universitätsmedizin Göttingen hergestellt wurden, überprüft werden (Testset). An diesen LCLs waren die Phänotypen in gleicher Weise wie an den LCLs des Trainingssets erhoben worden. Die 20 Genpolymorphismen wurden – wie im Methodenteil beschrieben – mittels Fluoreszenz-basierter Primerextensionsmethode bestimmt. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht war in allen Fällen mit $p > 0{,}01$ erfüllt. Eine Adjustierung auf Multiples Testen erfolgte hier schrittweise auf 20 Genvarianten entsprechend der Hierarchie in Tab. 19. Demzufolge wurde für die beiden stärksten Assoziationen mit einer FDR von 0,051 im Testset ein p-Wert von 0,025 für statistische Signifikanz gefordert. Für die weiteren Genvarianten erniedrigte sich diese Signifikanzschwelle entsprechend der einfachen Bonferroni-Korrektur (d.h. 0,0025 für SNP an Position 20 in Tab. 19).

Im Testset wurde das nominale statistische Signifikanzniveau von $p = 0{,}05$ für den SNP rs9329099 erreicht, zwei weitere SNPs (rs74382821 und rs3951220) waren mit einem Trend von jeweils $p = 0{,}07$ mit dem Phänotyp V50 assoziiert. Allerdings waren die Effekte der Genotypen von rs9329099 auf V50 denjenigen entgegen gesetzt, welche im Trainingsset beobachtet wurden, was eine tatsächliche Bedeutung dieses SNPs fraglich erscheinen lässt. Nach Adjustierung auf die Maximal-Effekte der Zytotoxizität (E_{max} im zu Grunde liegenden Michaelis-Menten-Modell) war für rs3951220 kein Einfluss mehr auf V50 zu sehen. Der Effekt von rs74382821 erwies sich gegenüber dieser Adjustierung als weitgehend robust und die Genotyp-Konfigurationen wirkten sich in gleicher Weise wie im Trainingsset aus. Einige Zelllinien des Testsets ließen sich sehr schwer kultivieren und zeigten bereits in den unbehandelten Kontrollen eine merkliche Minderung der Zellvitalität. Wurden diese Zelllinien aus der Analyse ausgeschlossen, zeigte der SNP rs74382821 eine Assoziation mit V50 von $p = 0{,}02$ ($n = 70$). In Abb. 23 ist der Zusammenhang zwischen V50 und diesem SNP als Boxplots veranschaulicht.

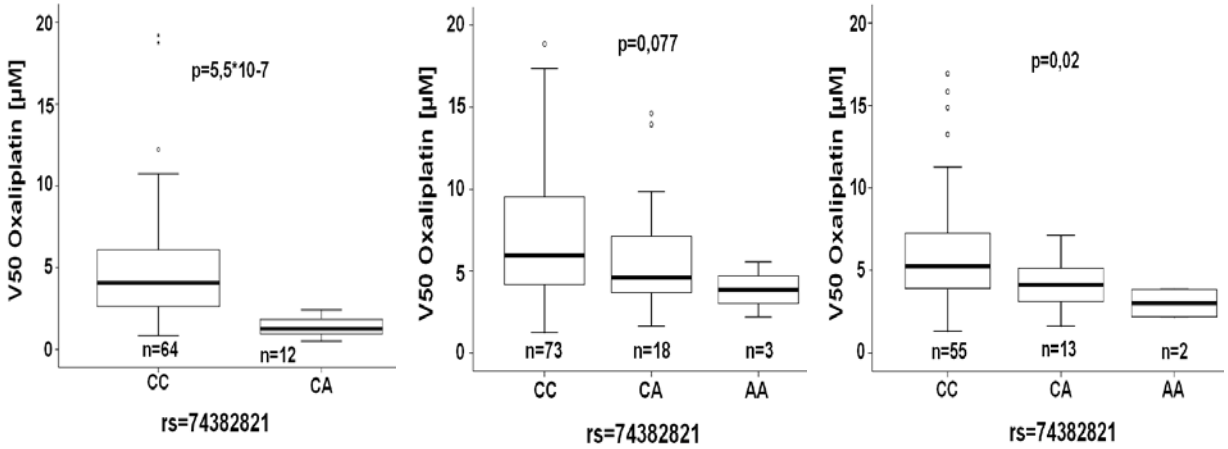


Abb. 23 Einfluss von SNP rs74382821 auf die Empfindlichkeit gegenüber Oxaliplatin. Für die jeweiligen Genotyp-Konfigurationen ist die Verteilung der V50-Werte illustriert, links für die Trainingsstudie, in der Mitte für die Teststudie und rechts für die Teststudie ohne Berücksichtigung von Zelllinien mit geringerer Ausgangsvitalität. In der Trainingsstudie waren keine Zellen mit Homozygotie für das Variantenallel enthalten. Die statistische Signifikanz wurde bei zwei Genotyp-Konfigurationen mit dem Mann-Whitney-U-Test, bei dreien mit dem Jonckheere-Terpstra-Trend-Test ermittelt.

5 Diskussion

In Bezug auf die Zielsetzung, funktionelle Biomarker für die Empfindlichkeit auf Oxaliplatin zu identifizieren, kristallisierten sich in meiner Dissertation zwei zentrale Befunde heraus: Der eine wurde über einen Kandidatengen-bezogenen, der andere über einen Genom-weiten Ansatz gefunden. Als interessantes Kandidatengen erwies sich dabei der Kupfertransporter *SLC31A1*. Die Genom-weite Analyse erbrachte für einen genetischen Polymorphismus auf Chromosom 9 einen reproduzierbaren Einfluss auf die Oxaliplatin-vermittelte Zytotoxizität. Diese Befunde werden in den nachfolgenden Kapiteln mit der aktuellen Datenlage in der Literatur verglichen und mögliche mechanistische Hypothesen dazu erörtert.

5.1 Korrelation der SLC31A1-Expression mit zytotoxischer Wirkung von Oxaliplatin

Einen wichtigen Befund meiner Dissertation stellt der Zusammenhang zwischen der basalen Expression des Kupfer-Transporters *SLC31A1* mit der zytotoxischen Wirkung von Oxaliplatin dar. Sowohl in Bezug auf die Vitalitätsminderung (Abb. 17, rechts) als auch die Proliferationshemmung (Abb. 18, links) gingen höhere Transkriptzahlen von *SLC31A1* mit einer gesteigerten Empfindlichkeit von Oxaliplatin einher. Darüber hinaus zeigte sich eine dosisabhängige Suppression von *SLC31A1* nach Oxaliplatinbehandlung (Abb. 14, Abb. 15, Abb. 16). Je stärker dabei das Ausmaß dieser Suppression war, desto empfindlicher waren die LCLs gegenüber der Oxaliplatin-induzierten Proliferationshemmung (Abb. 18, rechts) und desto mehr DNA gebundenes Platin lag vor (Abb. 19). Nachfolgend ist dieser Zusammenhang grafisch dargestellt (Abb. 24, links). Dass dieser für *SLC31A1* nicht spezifisch ist, wird durch einen analogen Vergleich mit *ERCC5* (Abb. 24, rechts) und *ATP7A* ($r = -0{,}41$, ohne Bild) deutlich. Daher ist es wahrscheinlich, dass die *SLC31A1*-Suppression durch Oxaliplatin Ausdruck einer generellen zellulären Schädigung ist, die u.a. Folge vermehrter Einlagerung von Platinaddukten in die DNA sein könnte (Abb. 19) und sich in einer verminderten Expression einer Reihe von Genen niederschlägt. Zudem scheint dieser Effekt umso stärker zu sein, je höher die basale *SLC31A1*-Expression ist, d.h. je mehr Oxaliplatin initial in die Zellen einströmen kann.

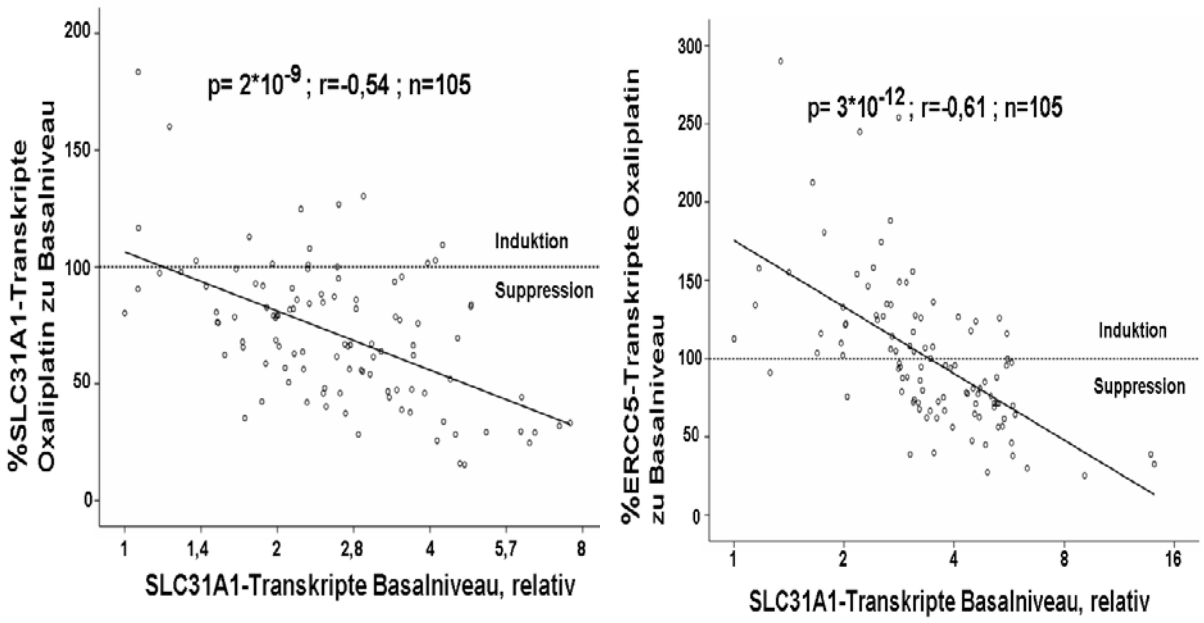


Abb. 24 Beziehung zwischen basaler Expression und den durch Oxaliplatin induzierten Veränderungen. Das linke Bild illustriert die Verhältnisse für *SLC31A1*, das rechte zum Vergleich für *ERCC5*. Die Normierung der Zielgene erfolgte wie zuvor auf *B2MG, GAPDH* und *UBC* als Referenzgene.

Der *SLC31A1*-Transporter wurde im Zusammenhang mit der Kupfer-Aufnahme erstmals beschrieben (Ishida et al. 2002) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9207117). Er bildet eine eigene innerhalb der ca. 50 Familien umfassenden Gruppe der SLC (*solute carrier family*)-Transportproteine. SLC-Proteine transportieren Substrate passiv ohne direkten Energieverbrauch, entweder sekundär aktiv durch Ausnutzung eines elektrochemischen Gradienten oder durch erleichterte Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten. Letzteres ist offenbar beim *SLC31A1* der Fall. In Einklang dazu steht, dass die mutmaßliche Pore für den Transport mehr derjenigen für Kanalproteine als für primär und sekundär aktive Transporter ähnelt (Ishida et al. 2002). Somit ist der Transport über den *SLC31A1* energie-unabhängig und wird von der Temperatur, dem pH-Wert und dem K^+-Gradienten beeinflusst (Lee et al. 2002). Neben den geschätzt 50% passiver Aufnahme von Oxaliplatin (Gately und Howell 1993) könnte die andere Hälfte über diesen Transporter in die Zellen gelangen (Ishida et al. 2002). Allerdings sind entsprechende Literaturdaten im Hinblick auf Oxaliplatin gegenwärtig noch sehr spärlich. Mehr ist bezüglich Cisplatin beschrieben. Hefezellen mit defektem *SLC31A1*-Gen zeigten eine verminderte intrazelluläre Akkumulation von Cisplatin mit konsekutiver Resistenz gegenüber diesem Chemotherapeutikum (Ishida et al. 2002). In humanen ovariellen Karzinomzellen bewirkte die Aufnahme von Cisplatin eine Herunterregulation des *SLC31A1*-Transporters (Holzer et al. 2004b) ähnlich der eigenen Beobachtung, die jedoch – wie oben ausgeführt – nicht spezifisch war. Eine erniedrigte basale Expression des *SLC31A1*-Transporters in Ovarialkarzinomzellen ging mit einer erhöhten

Resistenz gegenüber Cisplatin einher (Kalayda et al. 2012), ähnlich wie in meiner Studie bei Oxaliplatin. Expressionsarrays zufolge findet sich eine besonders starke Expression von *SLC31A1* in endothelialen Zellen (http://biogps.org/).

5.2 Einfluss eines SLC31A1-Genpolymorphismus

Insgesamt wurden hier 67 genetische Marker auf Assoziation mit den Funktionsmessungen getestet. Diese Marker beruhten auf der kompletten Resequenzierung im Rahmen des *1000 human genome*-Projekts und umfassten den Genbereich von *SLC31A1* einschließlich 10 kbp vor dem Transkriptionsstart in der 5'-Region und 1 kbp hinter dem 3'-Transkriptionsende. Dabei war der SNP rs11793978 mit der Oxaliplatin-modulierten, jedoch nicht mit der basalen Expression von *SLC31A*1 assoziiert. Der insgesamt supprimierende Effekt von Oxaliplatin auf die *SLC31A1*-Transkription wurde durch das Variantenallel dieses SNPs abgeschwächt (Abb. 20). Die mutmaßlich unspezifische Herunterregulation des *SLC31A1* durch Oxaliplatin könnte in einer über diesen Genpolymorphismus definierten Untergruppe moduliert sein. Möglicherweise sprechen Patienten mit dieser genetischen Konstellation klinisch besser an, da in diesem Fall auch unter Oxaliplatin-Exposition offenbar eine höhere Zahl an Proteinen für die zelluläre Aufnahme von Oxaliplatin zur Verfügung steht. Auf die funktionellen Endpunkte Platineinlagerung oder Zytotoxizität wirkte sich diese Genvariante jedoch nicht aus. Rs11793978 ist im Intron 1 lokalisiert. Über eine klinische oder funktionelle Bedeutung wurde in der Literatur bislang nicht berichtet.

Die kodierende Sequenz des *SLC31A1* ist innerhalb der menschlichen Spezies hoch konserviert, es ist hier in der europäischen Bevölkerung kein Genpolymorphismus mit einer Frequenz von über 1% bekannt. Bislang wurden auch keine Transkriptvarianten beschrieben. Jedoch könnten Polymorphismen in regulierenden Genelementen das quantitative Ausmaß der *SLC31A1*-Expression beeinflussen. Im *SLC31A1*-Gen finden sich fünf Exone, wobei der zu Protein translatierte Bereich erst innerhalb von Exon 2 beginnt. Zwischen erstem und zweitem Exon befindet sich ein sehr großes Intron mit etwa 34,5 kbp. Neben der Promotorregion vor dem Transkriptionsstart können nach heutiger Sicht auch die 5'-und 3'-nichttranslatierenden Regionen sowie die intronischen Bereiche, hiervon insbesondere das erste Intron, regulatorische Elemente für die Transkription enthalten.

Es wurde in Datenbanken nach Hinweisen auf eine mögliche Funktionalität von rs11793978 gesucht. Im *UCSC Genome Browser* (http://genome-euro.ucsc.edu), welcher eine Fülle von funktionellen Annotationen enthält, findet sich um die Region dieses SNPs kein entsprechender Eintrag, d.h. es gibt bislang keinen Anhalt für regulatorische Elemente an

dieser Stelle. Denkbar ist auch, dass es in Abhängigkeit der Allele von rs11793978 zu einer differenziellen Bindung von micro-RNAs (miRNAs) kommt. Dazu wurden Sequenzähnlichkeiten der Region um rs11793978 zu bekannten humanen miRNAs mit Hilfe der Datenbank miRBase (http://www.mirbase.org/) geprüft. Eine signifikante Übereinstimmung fand sich für drei miRNAs bei beiden Allelen von rs11793978, für eine weitere miRNA allerdings nur bei Vorliegen des Wildtyp-Allels. Bei letzterer handelt es sich um hsa-miR-1277-3p, wozu es noch keine funktionellen Daten in der Literatur gibt. Eine Hypothese könnte wie folgt lauten: Da miRNAs in der Mehrzahl der Fälle zu einer Degradierung von mRNA führen, könnte die selektive Bindung von hsa-miR-1277-3p an das Wildtyp-Allel von rs11793978 der Expression von SLC31A1 entgegen wirken. Dazu würde meine Beobachtung passen, dass die unter Oxaliplatin aufgetretene Suppression von SLC31A1 beim Wildtyp-Allel von rs11793978 stärker ausgeprägt war. Diese Hypothese könnte z.B. durch eine Transfektion von miR-1277-3p entsprechenden Sequenzen in geeignete Zelllinien weiter untersucht werden. Die Effekte von Oxaliplatin auf die Herunterregulation von SLC31A1 sollten dann entsprechend stärker sein. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass die typische Interferenz von miRNAs mit der Expressionsregulation von Genen in deren 3'-Region stattfindet. Bis auf weiteres bleibt es somit eine zu klärende Hypothese, ob hier auch eine relevante Interaktion im Intron 1, ein Bereich mit nicht seltenem Vorkommen von regulatorischen Elementen, auftritt.

Von den anderen betrachteten Genpolymorphismen im Bereich von *SLC31A1* modulierte keiner die Genexpression, die DNA-Platineinlagerung oder die Zytotoxizität von Oxaliplatin. In der Literatur sind Beziehungen zwischen *SLC31A1* und Oxaliplatin-Wirkungen noch nicht untersucht. Während der Entstehung dieser Dissertation wurden zum ersten Mal zwei Studien über Genpolymorphismen in *SLC31A1* in Zusammenhang mit einer Cisplatin-Therapie publiziert. Die erste bezieht sich auf die Überlebenszeit von mit Cisplatin behandelten Patienten mit NSCLC. Dabei zeigte sich eine Kombination von zwei, in Intron 1 lokalisierten SNPs (rs7851395 und rs12686377) prädiktiv (Xu et al. 2012a). Zwischen dem in meiner Studie identifizierten, die *SLC31A1*-Expression nach Oxaliplatin-Exposition modulierenden SNP rs11793978 besteht in Kaukasiern mit rs7851395 eine mäßige ($r^2 = 0{,}23$ als statistisches Maß für Kopplungsungleichgewicht, *linkage disequilibrium*), mit rs12686377 keine nennenswerte ($r^2 = 0{,}02$) genetische Kopplung. Die zweite Studie bezieht sich auf die Toxizität von Cisplatin. Dabei wurde ein Einfluss von rs10981694 auf die Ototoxizität postuliert (Xu et al. 2012b). Dieser SNP befindet sich am Beginn von Intron 1, eine Beziehung im Sinne einer genetischen Kopplung zu rs11793978 liegt nicht vor ($r^2 = 0{,}006$).

5.3 Gene für ATP-Transporter und für Basenexzisions-Reparatur

Für die Kandidatengene aus dem Bereich der Basenexzisions-Reparatur sowie für *ATP7A* konnte in Bezug auf die erhobenen funktionellen Parameter in LCLs kein statistisch signifikanter Zusammenhang beobachtet werden. Dies galt sowohl für die Genexpression als auch für die Genpolymorphismen.

In univariater Analyse war eine höhere basale Expression des Efflux-Transporter *ATP7A* entgegen der Erwartung mit einer gesteigerten Empfindlichkeit auf Oxaliplatin verbunden (Abb. 17, links). In einem kombinierten Modell der basalen Proliferationsrate war jedoch kein statistisch signifikanter Einfluss des *ATP7A* auf die zytotoxische Wirkung von Oxaliplatin mehr zu erkennen. Die in den Rohdaten beobachtete geringe Induktion der *ATP7A*-Expression durch Oxaliplatin war nach Normierung auf Referenzgene kaum noch zu sehen (vergleiche Abb. 16 links und rechts); vermutlich lag hier kein spezifischer Effekt in nennenswerter Größenordnung vor. Diesen Befunden zufolge wurde dem *ATP7A* in meinem LCL-Modell unter den gewählten Versuchsbedingungen keine größere Bedeutung für die Wirkung von Oxaliplatin beigemessen.

In der Literatur wurde eine vermehrte *ATP7A*-Expression in humanen Ovarialkarzinomzellen mit einer Resistenz gegenüber Oxaliplatin, Cisplatin und Carboplatin in Verbindung gebracht (Samimi et al. 2004b). Andere Studien fanden – dem auswärts gerichteten Transport von *ATP7A* entsprechend – einen Zusammenhang zwischen hoher Expression dieses Transporters und geringer Akkumulation von Platinderivaten in der Zelle (Chen et al. 2007; Kitada et al. 2008).

Die Akkumulation von Platinderivaten in der DNA kann auch durch Reparatursysteme moduliert werden. Das Nukleotidexzisionsreparatursystem (NER) spielt eine besondere Rolle in der Reparatur von Oxaliplatin-bedingten DNA-Schäden (Rabik und Dolan 2007). In meiner Studie wurden die zum NER gehörenden Proteine *ERCC1*, *ERCC2* und *ERCC5* betrachtet. Ein Bezug zur Wirkung von Oxaliplatin konnte dabei nicht festgestellt werden. Die initial beobachtete Induktion von *ERCC5* unter Oxaliplatin in der Pilotstudie mit 16 LCLs (Abb. 15) ließ sich am Gesamtkollektiv des Trainingssatzes nicht replizieren (Abb. 16). Demnach scheinen diese Proteine bei der Wirkung von Oxaliplatin unter den für diese Arbeit festgelegten Parametern in LCLs keine wesentliche Rolle zu spielen.

Eine Beziehung zwischen dem NER-System und Oxaliplatin ist in der Literatur gut dokumentiert. So machen Mutationen, die zu einer Insuffizienz des *ERCC2*-Protein führen, die Zelle anfälliger für Oxaliplatin-Schäden (Yin et al. 2011). Auch bei Mutationen des *ERCC5*-Proteins ist die Zelle sensitiver für durch Oxaliplatin bedingte DNA-Schäden (Chen

et al. 2009). Die Bedeutung des *ERCC1*-Proteins für die Therapie mit Oxaliplatin wird durch eine Reihe aktueller Publikationen belegt. In kultivierten Tumorzellen (NCI-60 *panel*, www.cancer.sanger.ac.uk/cell_lines/cbrowse/nci) war eine höhere Expression des *ERCC1*-Proteins mit einer gesteigerten Resistenz gegenüber Oxaliplatin korreliert (Baba et al. 2012). In derselben Studie konnte in Tumorgewebe von Patienten mit kolorektalem Karzinom eine vermehrte Expression von *ERCC1* nach Vorbehandlung mit Oxaliplatin im Vergleich zu Patienten ohne Oxaliplatin-Exposition nachgewiesen werden. Ein analoger Zusammenhang wurde auch bei Magenkrebs gefunden (Liu et al. 2013a). Die Expression von *ERCC1* könnte einen wichtigen Biomarker für den Therapieverlauf darstellen: Wurden Patienten mit relativ viel *ERCC1* im Tumorgewebe mit Oxaliplatin behandelt, so war bei diesen sowohl das Krankheits-spezifische als auch das Gesamtüberleben verkürzt gegenüber Patienten mit geringerem Nachweis von *ERCC1 (Li et al. 2013).*

Hinsichtlich genetischer Varianten für Gene der Basenexzisions-Reparatur wurde für den SNP *ERCC1* rs11615 ein Einfluss auf Oxaliplatin-verursachte Neurotoxizität beschrieben (Oguri et al. 2013). In meinen Analysen gab es jedoch keinen Zusammenhang dieses Genpolymorphismus. Dies könnte u.a. auch an einem unterschiedlichen Zeitfenster liegen. da sich der genannte klinische Befund auf die zeitliche Latenz bis zum Auftreten der Neurotoxizität und weniger auf deren Intensität bezieht. Ähnliches könnte auch für die Assoziation dieses Genpolymorphismus bei Patienten mit Magenkrebs gelten. Auch hier zeigte sich eine Auswirkung im langfristigen Verlauf (Liu et al. 2013b), was durch Zellkulturexperimente nur bedingt abbildbar ist.

5.4 Potenzieller genetischer Biomarker auf Chromosom 9

Nach einer Genom-weiten Analyse als Trainingsset und der Überprüfung der stärksten Assoziationen in einem Testset wurde ein signifikanter und konsistenter Effekt auf die Oxaliplatin-vermittelte Zytotoxizität einzig für den SNP rs74382821 festgestellt. Dieser Polymorphismus findet sich im mittleren Bereich von Chromosom 9 (Abb. 22). In der Literatur ist dieser SNP noch nicht beschrieben. Er wurde in der zentralen Datenbank für humane Genvarianten, der dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP), erstmals im Juli 2011 eingetragen. Aktuellen Datenbankeinträgen zufolge kann kein Gen oder Transkript zugeordnet werden. Der *UCSC Genome Browser* liefert keine Hinweise auf regulatorische Elemente an dieser Stelle. Eine andere Hypothese ist die Expression nicht-kodierender RNA (ncRNA) im Bereich von rs74382821. Eine entsprechende Sequenzanalyse für lange ncRNA (lncRNA) wurde mittels der Datenbank NONCODE mit den Standardeinstellungen (u.a.

BLOSUM-Matrix62) durchgeführt. Dabei fielen Allel-spezifische Unterschiede auf: Während der Blast-Algorithmus für das Wildtyp-Allel von rs74382821 keine signifikanten Sequenz-Übereinstimmungen mit humanen lncRNAs fand, waren dies drei für das Varianten-Allel, wobei zwei davon als mRNA-ähnliche lncRNAs bezeichnet sind. Einschränkend muss jedoch angemerkt werden, dass die Bereiche mit Sequenzidentität mit nur 16 bzw. 17 Basenpaaren sehr kurz sind und es sich daher auch um zufällige Befunde handeln könnte. In analoger Weise wurde auch eine Allel-spezifische Suche für den Bereich um rs74382821 nach Sequenzähnlichkeiten mit bekannten miRNAs, wieder unter Verwendung von miRBase, durchgeführt. Bei Vorliegen des Wildtyp-Allels ergaben sich hier vier zusätzliche Treffer gegenüber dem Varianten-Allel. Allerdings beziehen sich diese vier miRNAs sämtlich auf nicht-humane Spezies wie Reis, Saubohne, Vögel und Zebrafisch. Eine Erklärung für die Beeinflussung der Oxaliplatin-Empfindlichkeit menschlicher Zellen lässt sich daraus nicht ableiten.

Assoziationen außerhalb bekannter Gensequenzen sind bei Genom-weiten Untersuchungen nicht gewöhnlich. Ähnliches war der Fall als vor einigen Jahren reproduzierbar genetische Loci mit Bedeutung für das Risiko für koronare Herzkrankheit und Diabetes mellitus identifiziert wurden (Helgadottir et al. 2007; McPherson et al. 2007; Sladek et al. 2007; Zeggini et al. 2007), (Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of et al. 2007; Scott et al. 2007).

Einschränkend muss berücksichtigt werden, dass im Testsatz nur die 20 stärksten Assoziationen der Trainingsstudie überprüft wurden. Die statistischen Unterschiede waren dabei eher marginal; das galt auch für die nachfolgenden, in der Tab. 19 nicht mehr aufgelisteten Marker. Möglicherweise hätten sich weitere Assoziationen replizieren lassen, wenn diese Anzahl an Markern erhöht worden wäre. Diese wäre aber mit einem großen zusätzlichen Aufwand für die Genotypisierung verbunden gewesen und hätte auch hinsichtlich des Multiplen Testens strengere Adjustierungen erfordert.

5.5 Kritische Betrachtung der eigenen Ergebnisse

Den Kern dieser Dissertation stellt die Identifizierung von Genpolymorphismen für die Wirkung von Oxaliplatin dar. Dabei waren die genetischen Daten entweder vorhanden (Trainingssatz) oder wurden selbst erhoben (Testsatz). In beiden Fällen kann in der Regel von einer zuverlässigen Bestimmung dieser diskreten Daten ausgegangen werden. Für die Qualität dieser Untersuchung sind die funktionellen Messdaten, welche ihrer Art nach stetig sind, entscheidend.

Um den die Zytotoxizität beschreibenden Parameter (EC50) möglichst präzise zu erfassen, wurden für einzelne LCLs acht Konzentrationen und eine Kontrolle jeweils in Doppelbestimmung gemessen. Einen potenziellen Einflussfaktor stellt die basale Proliferationsrate dar. Je höher diese war, desto empfindlicher erwiesen sich die Zelllinien, sowohl in Bezug auf die Vitalitätsminderung als auch die Proliferationshemmung durch Oxaliplatin (Abb. 11). Dieser Zusammenhang ist nicht erstaunlich, da schnell wachsende Zellen einen höheren Metabolismus haben und dementsprechend sensitiver auf Zytostatika reagieren. Aus der Klinik ist bekannt, dass Neoplasien mit besonders hoher Proliferationsrate (z.B. die akut lymphoblastische Leukämie) besonders gut auf eine Zytostatika-Therapie ansprechen. Für LCLs ist dieses Phänomen ebenfalls beschrieben (Stark et al. 2010). Daher wurde für den in der Genom-weiten Analyse identifizierten und replizierten Einfluss des SNPs rs74382821 auf die Zytotoxizität von Oxaliplatin in einem linearen Regressionsmodell eine Adjustierung auf die basale Proliferationsrate vorgenommen. Letztere beeinflusste die Assoziation dieses SNPs nicht. Der Befund für rs74382821 ist somit zumindest nicht durch eine zufällige Stratifizierung bezüglich der basalen Proliferationsrate bedingt.

Im Verhältnis zur Zahl von mehreren Millionen Genom-weiter Polymorphismen ist der Stichprobenumfang der verwendeten LCLs in der Trainingsstudie mit 104 Zelllinien sehr klein. Dies limitierte die Aussagekraft sowohl in Bezug darauf, einen Befund – nach Adjustierung auf Multiples Testen – als statistisch signifikant bewerten zu können als auch eine tatsächlich funktionelle Variante als solche zu identifizieren. Ein ausgewogenes Verhältnis zwischen dem Stichprobenumfang, an welchem Funktionsparameter erhoben werden, und Genom-weiten Polymorphismen ist naturgemäß nicht realistisch. In meiner Dissertation wurde diesem Problem auf zwei Arten begegnet: Einerseits erfolgte eine Überprüfung der Genotyp-Phänotyp-Assoziationen an einem Testset. Andererseits wurde durch Anwendung des Kandidatengenansatzes in diesem Fall die Zahl der Genpolymorphismen massiv begrenzt, wodurch die Problematik des Multiplen Testens vermindert, wenngleich nicht gänzlich beseitigt wurde. Die durch die Genom-weite Analyse identifizierte Variante rs74382821 kann, da die Teststudie hierarchisch ausgewertet wurde, auch unter den Kriterien des Multiplen Testens als statistisch signifikanter Befund mit einem α-Fehler von 0,05 postuliert werden. Eher ist davon auszugehen, dass durch die limitierte Zahl an Zelllinien in der Trainingsstudie funktionell tatsächlich bedeutsame Genvarianten unerkannt blieben.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob lymphoblastoide Zellen ein geeignetes Modell für die Untersuchung der Wirkung von Oxaliplatin sind. Der Vorteil von LCLs ist, dass bei diesen

eine große Anzahl genetisch verschiedener Zelllinien mit den entsprechenden genetischen Daten verfügbar ist. Dies ist bei Zelllinien als Modell für Malignome mit typischer Indikation für Oxaliplatin, wie z.B. kolorektale Zelllinien, nicht der Fall. Ein weiterer Vorteil besteht in der vergleichsweise einfachen Kultivierung von LCLs, wodurch ein großer Probendurchsatz in überschaubaren Zeiträumen möglich ist. Hinsichtlich der zytotoxischen Wirkung von Oxaliplatin auf LCLs lag die Konzentration, mit welcher sich die Vitalität bzw. Proliferation um 50% reduzieren ließ, für die Masse der Zelllinien im Bereich von 1-5 µM (Abb. 8), was in etwa der nach Oxaliplatin-Infusion im Blut erreichten Spiegeln entspricht (siehe Abschnitt 1.5: „Pharmakokinetik“ in der Einleitung). Unter diesem Aspekt könnten LCLs ein durchaus valides Modell für die klinische Situation darstellen. Dennoch bleiben Bedenken bestehen, ob die gewonnenen Erkenntnisse von LCLs auf andere Tumorarten übertragbar sind, insbesondere wegen der sehr unterschiedlichen Zellbiologie. LCLs proliferieren in der Regel wesentlich schneller als Zellen der meisten soliden Tumore. Die an LCLs hier erhobenen Befunde stellen jedoch zumindest interessante Kandidaten dar, deren Überprüfung auf klinische Aussagekraft an entsprechenden Kollektiven lohnenswert erscheint.

5.6 Ausblick

Die zentralen Befunde meiner Dissertation stellen potenzielle Biomarker für die Therapie mit Oxaliplatin dar. Um dies zu prüfen, sollte deren Einfluss auf Tumorregression, Toxizität und das langfristige Ergebnis der Therapie an entsprechenden klinischen Kollektiven untersucht werden. Dies gilt für den durch die Genom-weite Analyse identifizierten SNP rs74382821 als auch für den SNP rs11793978 im Kandidatengen *SLC31A1*. Dabei könnte zunächst mit einer retrospektiven Untersuchung begonnen werden. Im positiven Fall müsste dann eine prospektive Bestätigung erfolgen, bevor ein klinischer Einsatz als Biomarker in Frage kommt. Weiterhin bietet sich die Messung des Expressionszustandes von *SLC31A1* als möglichem Parameter für die Prädiktion der Wirkung einer Oxaliplatin-Therapie an. Dies könnte sowohl an Tumorgewebe als auch im Blut interessant sein; letzteres auch im Hinblick auf die Toxizität der Therapie. Da allgemein der *SLC31A1* noch vergleichsweise wenig im Zusammenhang mit Oxaliplatin untersucht wurde, könnten funktionelle Untersuchungen, z.B. durch Überexpressionsstudien in geeigneten Zellmodellen, zu weiteren wichtigen Erkenntnissen führen. Dazu gehören auch Transportmessungen, welche bei Oxaliplatin mittels Atomabsorptionsspektrometrie mit hoher Präzision durchgeführt werden können. Perspektivisch ist zu wünschen, dass die hier gewonnenen Daten zu einer Optimierung der Therapie durch Individualisierung auf Basis genetischer Variation beitragen.

6 Zusammenfassung

Oxaliplatin wird als antineoplastische Substanz vor allem bei metastasiertem kolorektalem Karzinom angewandt. Dabei ist ein variables Ansprechen zu beobachten, wofür auch ein Einfluss genetischer Variabilität vermutet wird. Diesbezügliche Untersuchungen sind für die älteren Platinderivate Cisplatin und Carboplatin sowohl Genom-weit als auch Kandidatengen-bezogen durchgeführt worden, für Oxaliplatin gibt es hierzu jedoch noch kaum Daten. Über Genotyp-Phänotyp-Analysen sollten im Rahmen dieser Dissertation genetische Marker für Oxaliplatin-Sensitivität identifiziert werden, welche dann später als potenzielle klinische Biomarker getestet werden können.

Als Zellmodell standen 198 lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) zur Verfügung, 104 davon als Trainingsset und 94 als Testset. An den LCLs wurde durchflusszytometrisch die Variabilität in der Empfindlichkeit auf Oxaliplatin anhand von Dosis-Wirkungskurven gemessen. Daraus wurde für jede Zelllinie die Substrat-Konzentrationen für halbmaximale Effekte (EC50) bezüglich der funktionellen Messparameter Zellvitalitätsminderung und Proliferations-hemmung mittels mathematischer Kurvenanpassung ermittelt. Für das Trainingsset erfolgte eine Genom-weite Assoziationsanalyse mit den Genotypen aus den Datenbanken von HapMap und *1000 human genomes*. Die 20 stärksten Assoziationssignale des Trainingssets wurden durch eigene Genotypisierung mittels Primerextensionsverfahren im Testset überprüft. Die Expression von Kandidatengenen für Transport von Oxaliplatin (*SLC31A1* und *ATP7A*) und Reparatur Oxaliplatin-induzierter DNA-Schäden *(ERCC1*, *ERCC2* und *ERCC5*) wurde auf Basalniveau und nach Oxaliplatin-Exposition durch quantitative *Real Time*-PCR gemessen. Bei den genannten Genen wurde eine spezifische Analyse eines Einflusses darin enthaltener genetischer Varianten auf die funktionellen Parameter analysiert.

Die Genom-weite Analyse lieferte eine reproduzierbare Modulierung der Oxaliplatin-Sensitivität durch den singulären Nukleotid-Polymorphismus (SNP) rs74382821. Die Empfindlichkeit gegenüber Oxaliplatin wurde durch das Variantenallel erhöht. Im Bereich dieses SNPs ist bislang kein Gen oder Transkript in den Datenbanken annotiert. Weiterhin ist nichts über eine Funktion bekannt, auch bioinformatische Analysen ergaben hierzu keinen klaren Hinweis. Von den untersuchten Kandidatengenen war ein konsistenter Einfluss auf die Oxaliplatin-Sensitivität nur für den Kupfer-Transporter *SLC31A1* erkennbar: So ging eine höhere basale Expression mit einer höheren Empfindlichkeit gegenüber Oxaliplatin einher; eine Modulation durch einen genetischen Polymorphismus im Bereich von *SLC31A1* war dabei jedoch nicht zu beobachten. Darüber hinaus war eine deutliche Suppression der

SLC31A1-Transkription nach Exposition gegenüber Oxaliplatin zu konstatieren. Ein Vergleich mit anderen Genen ergab, dass diese Suppression eher unspezifisch zu sein scheint und daher vermutlich eher Folge als Ursache der durch Oxaliplatin vermittelten zytotoxischen Effekte ist. Diese Oxaliplatin-bedingte *SLC31A1*-Suppression wurde interessanterweise durch den SNP rs11793978 im Intron 1 des *SLC31A1*-Gens modifiziert: In Gegenwart des Variantenallels war diese im Vergleich zum Wildtyp-Allel weniger stark ausgeprägt. Über eine funktionelle Bedeutung dieses SNPs ist in der Literatur noch nichts bekannt. Es besteht eine mäßige gemeinsame Vererbung mit einem anderen SNP, der sich in Bezug auf die Überlebenszeit bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs auswirkte, welche mit Cisplatin behandelt wurden. *In silico*-Analysen ergaben nur im Falle des Wildtyp-Allels dieses SNPs eine Bindung der micro-RNA hsa-miR-1277-3p. Da sich diese Interaktion außerhalb der typischen Interferenz von micro-RNAs in der 3'-Region eines Gens befindet, bleibt die Relevanz dieses Befundes zu klären. Die Expression der Gene *ATP7A*, *ERCC1*, *ERCC2* und *ERCC5* zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem von mir bestimmten Parameter der Oxaliplatin-Sensitivität.

Zur Erhärtung der Befunde dieser Dissertation sollten weitere funktionelle und klinische Studien durchgeführt werden, letztere zunächst aus praktischen Gründen retrospektiv, dann ggf. prospektiv. Einen weiteren interessanten Ansatzpunkt zur Abschätzung der Effektivität einer Oxaliplatin-Therapie stellt die basale, somit vor Therapiebeginn messbare *SLC31A1*-Expression, dar. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob es unter klinischen Bedingungen tatsächlich zu einer relevanten Herunterregulation von *SLC31A1* durch Oxaliplatin als möglichem Resistenzmechanismus kommt und ggf. Strategien entwickelt werden, diesem entgegenzuwirken. Die hier erfolgte Identifizierung von genetischen und Expressions-Markern für die Oxaliplatin-Empfindlichkeit könnte einen wichtigen Baustein für die Etablierung von Biomarkern für eine zukünftig individualisiertere Therapie mit besseren Chancen für ein Ansprechen und weniger Nebenwirkungen darstellen.

7 Literatur

Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, Chadwick RB, Kaariainen H, Eskelinen M, Jarvinen H et al. (1998): Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 338 (21), 1481-1487

Abada PB, Larson CA, Manorek G, Adams P, Howell SB (2012): Sec61beta controls sensitivity to platinum-containing chemotherapeutic agents through modulation of the copper-transporting ATPase ATP7A. *Mol Pharmacol* 82 (3), 510-520

Aboussekhra A, Biggerstaff M, Shivji MK, Vilpo JA, Moncollin V, Podust VN, Protic M, Hubscher U, Egly JM, Wood RD (1995): Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* 80 (6), 859-868

Alcindor T, Beauger N (2011): Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol* 18 (1), 18-25

Aller SG, Eng ET, De Feo CJ, Unger VM (2004): Eukaryotic CTR copper uptake transporters require two faces of the third transmembrane domain for helix packing, oligomerization, and function. *J Biol Chem* 279 (51), 53435-53441

Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J et al. (2004): Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 350 (23), 2343-2351

Arango D, Wilson AJ, Shi Q, Corner GA, Aranes MJ, Nicholas C, Lesser M, Mariadason JM, Augenlicht LH (2004): Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 91 (11), 1931-1946

Arnould S, Hennebelle I, Canal P, Bugat R, Guichard S (2003): Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. *Eur J Cancer* 39 (1), 112-119

Assenat E, Desseigne F, Thezenas S, Viret F, Mineur L, Kramar A, Samalin E, Portales F, Bibeau F, Crapez-Lopez E et al. (2011): Cetuximab plus FOLFIRINOX (ERBIRINOX) as first-line treatment for unresectable metastatic colorectal cancer: a phase II trial. *Oncologist* 16 (11), 1557-1564

Baba H, Watanabe M, Okabe H, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Baba Y, Iwatsuki M, Chikamoto A, Beppu T (2012): Upregulation of ERCC1 and DPD expressions after oxaliplatin-based first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 107 (12), 1950-1955

Bartolucci R, Wei J, Sanchez JJ, Perez-Roca L, Chaib I, Puma F, Farabi R, Mendez P, Roila F, Okamoto T et al. (2009): XPG mRNA expression levels modulate prognosis in resected non-small-cell lung cancer in conjunction with BRCA1 and ERCC1 expression. *Clin Lung Cancer* 10 (1), 47-52

Binks SP, Dobrota M (1990): Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine. *Biochem Pharmacol* 40 (6), 1329-1336

Blair BG, Larson CA, Safaei R, Howell SB (2009): Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin. *Clin Cancer Res* 15 (13), 4312-4321

Blair BG, Larson CA, Adams PL, Abada PB, Pesce CE, Safaei R, Howell SB (2011): Copper transporter 2 regulates endocytosis and controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in vivo. *Mol Pharmacol* 79 (1), 157-166

Burz C, Berindan-Neagoe IB, Balacescu O, Tanaselia C, Ursu M, Gog A, Vlase L, Chintoanu M, Balacescu L, Leucuta SE et al. (2009): Clinical and pharmacokinetics study of oxaliplatin in colon cancer patients. *J Gastrointestin Liver Dis* 18 (1), 39-43

Bustin SA (2002): Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*

Calcagno AM, Chewning KJ, Wu CP, Ambudkar SV (2006): Plasma membrane calcium ATPase (PMCA4): a housekeeper for RT-PCR relative quantification of polytopic membrane proteins. *BMC Mol Biol* 7 29

Chen CC, Chen LT, Tsou TC, Pan WY, Kuo CC, Liu JF, Yeh SC, Tsai FY, Hsieh HP, Chang JY (2007): Combined modalities of resistance in an oxaliplatin-resistant human gastric cancer cell line with enhanced sensitivity to 5-fluorouracil. *Br J Cancer* 97 (3), 334-344

Chen J, Xie F, Chen K, Wang D, Jiang H, Li J, Pan F, Chen S, Zhang Y, Ruan Z et al. (2009): ERCC5 promoter polymorphisms at -763 and +25 predict the response to oxaliplatin-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 8 (14), 1424-1430

Cicinnati VR, Shen Q, Sotiropoulos GC, Radtke A, Gerken G, Beckebaum S (2008): Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer* 8 350

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardiere C et al. (2011): FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 364 (19), 1817-1825

Crider SE, Holbrook RJ, Franz KJ (2010): Coordination of platinum therapeutic agents to met-rich motifs of human copper transport protein1. *Metallomics* 2 (1), 74-83

Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of H, Mit LU, Novartis Institutes of BioMedical R, Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burtt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ et al. (2007): Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316 (5829), 1331-1336

Dunand-Sauthier I, Hohl M, Thorel F, Jaquier-Gubler P, Clarkson SG, Scharer OD (2005): The spacer region of XPG mediates recruitment to nucleotide excision repair complexes and determines substrate specificity. *J Biol Chem* 280 (8), 7030-7037

Extra JM, Marty M, Brienza S, Misset JL (1998): Pharmacokinetics and safety profile of oxaliplatin. *Semin Oncol* 25 (2 Suppl 5), 13-22

Faivre S, Chan D, Salinas R, Woynarowska B, Woynarowski JM (2003): DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 66 (2), 225-237

Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, Crino L, Benedetti G, Evangelista W, Fanchini L et al. (2007): Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 25 (13), 1670-1676

Farina Sarasqueta A, van Lijnschoten G, Lemmens VE, Rutten HJ, van den Brule AJ (2011): Pharmacogenetics of oxaliplatin as adjuvant treatment in colon carcinoma: are single nucleotide polymorphisms in GSTP1, ERCC1, and ERCC2 good predictive markers? *Mol Diagn Ther* 15 (5), 277-283

Fernandez-Rozadilla C, Cazier JB, Moreno V, Crous-Bou M, Guino E, Duran G, Lamas MJ, Lopez R, Candamio S, Gallardo E et al. (2013): Pharmacogenomics in colorectal cancer: a genome-wide association study to predict toxicity after 5-fluorouracil or FOLFOX administration. *Pharmacogenomics J* 13 (3), 209-217

Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehme A, Christen RD, Howell SB (1996): The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* 56 (21), 4881-4886

Fink D, Nebel S, Aebi S, Nehme A, Howell S (1997): Loss of DNA mismatch repair due to knockout of MSH2 or PMS2 results in resistance to cisplatin and carboplatin. *Int J Oncol* 11 (3), 539-542

Gamelin E, Bouil AL, Boisdron-Celle M, Turcant A, Delva R, Cailleux A, Krikorian A, Brienza S, Cvitkovic E, Robert J et al. (1997): Cumulative pharmacokinetic study of oxaliplatin, administered every three weeks, combined with 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 3 (6), 891-899

Gamelin E, Gamelin L, Bossi L, Quasthoff S (2002): Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures. *Semin Oncol* 29 (5 Suppl 15), 21-33

Gately DP, Howell SB (1993): Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 67 (6), 1171-1176

Gerard JP, Azria D, Gourgou-Bourgade S, Martel-Laffay I, Hennequin C, Etienne PL, Vendrely V, Francois E, de La Roche G, Bouche O et al. (2010): Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the phase III trial ACCORD 12/0405-Prodige 2. *J Clin Oncol* 28 (10), 1638-1644

Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Pitot HC, Alberts SR (2004): A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22 (1), 23-30

Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber I, Karbach U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch AE, Koepsell H (1997): Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol* 16 (7), 871-881

Gourdier I, Del Rio M, Crabbe L, Candeil L, Copois V, Ychou M, Auffray C, Martineau P, Mechti N, Pommier Y et al. (2002): Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. *FEBS Lett* 529 (2-3), 232-236

Gourgou-Bourgade S, Bascoul-Mollevi C, Desseigne F, Ychou M, Bouche O, Guimbaud R, Becouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Boige V et al. (2013): Impact of FOLFIRINOX compared with gemcitabine on quality of life in patients with metastatic pancreatic cancer: results from the PRODIGE 4/ACCORD 11 randomized trial. *J Clin Oncol* 31 (1), 23-29

Grothey A (2003): Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity. *Semin Oncol* 30 (4 Suppl 15), 5-13

Guo Y, Smith K, Petris MJ (2004): Cisplatin stabilizes a multimeric complex of the human Ctr1 copper transporter: requirement for the extracellular methionine-rich clusters. *J Biol Chem* 279 (45), 46393-46399

Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Nakagawa H, Sotamaa K, Prior TW, Westman J et al. (2005): Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 352 (18), 1851-1860

Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdottir S, Blondal T, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Sigurdsson A, Baker A, Palsson A et al. (2007): A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 316 (5830), 1491-1493

Hind D, Tappenden P, Tumur I, Eggington S, Sutcliffe P, Ryan A (2008): The use of irinotecan, oxaliplatin and raltitrexed for the treatment of advanced colorectal cancer: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 12 (15), iii-ix, xi-162

Hohl M, Dunand-Sauthier I, Staresincic L, Jaquier-Gubler P, Thorel F, Modesti M, Clarkson SG, Scharer OD (2007): Domain swapping between FEN-1 and XPG defines regions in XPG that mediate nucleotide excision repair activity and substrate specificity. *Nucleic Acids Res* 35 (9), 3053-3063

Holzer AK, Katano K, Klomp LW, Howell SB (2004a): Cisplatin rapidly down-regulates its own influx transporter hCTR1 in cultured human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 10 (19), 6744-6749

Holzer AK, Samimi G, Katano K, Naerdemann W, Lin X, Safaei R, Howell SB (2004b): The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 66 (4), 817-823

Holzer AK, Manorek GH, Howell SB (2006): Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 70 (4), 1390-1394

Hosein PJ, Macintyre J, Kawamura C, Maldonado JC, Ernani V, Loaiza-Bonilla A, Narayanan G, Ribeiro A, Portelance L, Merchan JR et al. (2012): A retrospective study of neoadjuvant FOLFIRINOX in unresectable or borderline-resectable locally advanced pancreatic adenocarcinoma. *BMC Cancer* 12 199

Hromas RA, North JA, Burns CP (1987): Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells. *Cancer Lett* 36 (2), 197-201

Huang MY, Huang ML, Chen MJ, Lu CY, Chen CF, Tsai PC, Chuang SC, Hou MF, Lin SR, Wang JY (2011): Multiple genetic polymorphisms in the prediction of clinical outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *Pharmacogenet Genomics* 21 (1), 18-25

Huang RS, Duan S, Shukla SJ, Kistner EO, Clark TA, Chen TX, Schweitzer AC, Blume JE, Dolan ME (2007): Identification of genetic variants contributing to cisplatin-induced cytotoxicity by use of a genomewide approach. *Am J Hum Genet* 81 (3), 427-437

Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I (2002): Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (22), 14298-14302

James E, Podoltsev N, Salehi E, Curtis BR, Saif MW (2009): Oxaliplatin-induced immune thrombocytopenia: another cumulative dose-dependent side effect? *Clin Colorectal Cancer* 8 (4), 220-224

Joel SP, Papamichael D, Richards F, Davis T, Aslanis V, Chatelut E, Locke K, Slevin ML, Seymour MT (2004): Lack of pharmacokinetic interaction between 5-fluorouracil and oxaliplatin. *Clin Pharmacol Ther* 76 (1), 45-54

Kalayda GV, Wagner CH, Jaehde U (2012): Relevance of copper transporter 1 for cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *J Inorg Biochem* 116 1-10

Kawazoe H, Kawazoe H, Sugishita H, Watanabe S, Tanaka A, Morioka J, Suemaru K, Watanabe Y, Kawachi K, Araki H (2010): [Nephrotoxicity induced by repeated cycles of oxaliplatin in a Japanese colorectal cancer patient with moderate renal impairment]. *Gan To Kagaku Ryoho* 37 (6), 1153-1157

Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V (1998): Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem* 273 (26), 15971-15979

Kelland LR, Farrell NP (2000): Platinum-based Drugs in Cancer Therapy.

Kim JC, Kim SY, Cho DH, Roh SA, Choi EY, Jo YK, Jung SH, Na YS, Kim TW, Kim YS (2010): Genome-wide identification of chemosensitive single nucleotide polymorphism markers in colorectal cancers. *Cancer Sci* 101 (4), 1007-1013

Kitada N, Takara K, Minegaki T, Itoh C, Tsujimoto M, Sakaeda T, Yokoyama T (2008): Factors affecting sensitivity to antitumor platinum derivatives of human colorectal tumor cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 62 (4), 577-584

Klomp AE, Tops BB, Van Denberg IE, Berger R, Klomp LW (2002): Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCTR1). *Biochem J* 364 (Pt 2), 497-505

Komatsu T, Hiasa M, Miyaji T, Kanamoto T, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y, Omote H (2011): Characterization of the human MATE2 proton-coupled polyspecific organic cation exporter. *Int J Biochem Cell Biol* 43 (6), 913-918

Kurian S, Macintyre J, Mushtaq M, Rocha-Lima CM, Ahn Y (2012): Oxaliplatin induced disseminated intravascular coagulation: A case report and review of literature. *World J Gastrointest Oncol* 4 (7), 181-183

Larson CA, Blair BG, Safaei R, Howell SB (2009): The role of the mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of platinum-based drugs. *Mol Pharmacol* 75 (2), 324-330

Lee J, Pena MM, Nose Y, Thiele DJ (2002): Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J Biol Chem* 277 (6), 4380-4387

Li L, Peterson CA, Lu X, Legerski RJ (1995): Mutations in XPA that prevent association with ERCC1 are defective in nucleotide excision repair. *Mol Cell Biol* 15 (4), 1993-1998

Li P, Fang YJ, Li F, Ou QJ, Chen G, Ma G (2013): ERCC1, defective mismatch repair status as predictive biomarkers of survival for stage III colon cancer patients receiving oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy. *Br J Cancer* 108 (6), 1238-1244

Lin X, Okuda T, Holzer A, Howell SB (2002): The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Pharmacol* 62 (5), 1154-1159

Liu YP, Ling Y, Qi QF, Zhang YP, Zhang CS, Zhu CT, Wang MH, Pan YD (2013a): The effects of ERCC1 expression levels on the chemosensitivity of gastric cancer cells to platinum agents and survival in gastric cancer patients treated with oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy. *Oncol Lett* 5 (3), 935-942

Liu YP, Ling Y, Qi QF, Zhang YP, Zhang CS, Zhu CT, Wang MH, Pan YD (2013b): Genetic polymorphisms of ERCC1118, XRCC1399 and GSTP1105 are associated with the clinical outcome of gastric cancer patients receiving oxaliplatinbased adjuvant chemotherapy. *Mol Med Rep* 7 (6), 1904-1911

Marchetti P, Galla DA, Russo FP, Ricevuto E, Flati V, Porzio G, Ficorella C, Cifone MG (2004): Apoptosis induced by oxaliplatin in human colon cancer HCT15 cell line. *Anticancer Res* 24 (1), 219-226

McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR et al. (2007): A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. *Science* 316 (5830), 1488-1491

Moller LB, Petersen C, Lund C, Horn N (2000): Characterization of the hCTR1 gene: genomic organization, functional expression, and identification of a highly homologous processed gene. *Gene* 257 (1), 13-22

Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, Miyazaki K, Neamati N, Takebayashi Y (2002): Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. *Int J Cancer* 101 (5), 488-495

Newton CR, Graham, A. (1994): Introduction to biotechniques. *Bios Scientific*

Oguri T, Mitsuma A, Inada-Inoue M, Morita S, Shibata T, Shimokata T, Sugishita M, Nakayama G, Uehara K, Hasegawa Y et al. (2013): Genetic polymorphisms associated with oxaliplatin-induced peripheral neurotoxicity in Japanese patients with colorectal cancer. *Int J Clin Pharmacol Ther* 51 (6), 475-481

Park DJ, Stoehlmacher J, Zhang W, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lenz HJ (2001): A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 61 (24), 8654-8658

Peddi PF, Lubner S, McWilliams R, Tan BR, Picus J, Sorscher SM, Suresh R, Lockhart AC, Wang J, Menias C et al. (2012): Multi-institutional experience with FOLFIRINOX in pancreatic adenocarcinoma. *JOP* 13 (5), 497-501

Rabik CA, Dolan ME (2007): Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 33 (1), 9-23

Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E (2002): Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther* 1 (3), 227-235

Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo T (1996): Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem Pharmacol* 52 (12), 1855-1865

Rodel C, Liersch T, Becker H, Fietkau R, Hohenberger W, Hothorn T, Graeven U, Arnold D, Lang-Welzenbach M, Raab HR et al. (2012): Preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy with fluorouracil and oxaliplatin versus fluorouracil alone in locally advanced rectal cancer: initial results of the German CAO/ARO/AIO-04 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13 (7), 679-687

Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, Rulli E, Canestrari E, Santini D, Catalano V, Ficarelli R, Maltese P, Bisonni R et al. (2007): Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol* 25 (10), 1247-1254

Safaei R (2006): Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett* 234 (1), 34-39

Safaei R, Howell SB (2005): Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Crit Rev Oncol Hematol* 53 (1), 13-23

Saif MW, Reardon J (2005): Management of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Ther Clin Risk Manag* 1 (4), 249-258

Samimi G, Katano K, Holzer AK, Safaei R, Howell SB (2004a): Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B. *Mol Pharmacol* 66 (1), 25-32

Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M, Goodman M, Howell SB (2004b): Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 10 (14), 4661-4669

Sandman KE, Marla SS, Zlokarnik G, Lippard SJ (1999): Rapid fluorescence-based reporter-gene assays to evaluate the cytotoxicity and antitumor drug potential of platinum complexes. *Chem Biol* 6 (8), 541-551

Scheeff ED, Briggs JM, Howell SB (1999): Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 56 (3), 633-643

Schmidt W, Chaney SG (1993): Role of carrier ligand in platinum resistance of human carcinoma cell lines. *Cancer Res* 53 (4), 799-805

Schulz HL, Weber BHF, Wiedman C (2004): Quantitative Real-Time PCR - Eine Frage der Normalisierung *BIOspektrum*

Schulze C, McGowan M, Jordt SE, Ehrlich BE (2011): Prolonged oxaliplatin exposure alters intracellular calcium signaling: a new mechanism to explain oxaliplatin-associated peripheral neuropathy. *Clin Colorectal Cancer* 10 (2), 126-133

Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, Erdos MR, Stringham HM, Chines PS, Jackson AU et al. (2007): A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316 (5829), 1341-1345

Sharma S, Gong P, Temple B, Bhattacharyya D, Dokholyan NV, Chaney SG (2007): Molecular dynamic simulations of cisplatin- and oxaliplatin-d(GG) intrastand cross-links reveal differences in their conformational dynamics. *J Mol Biol* 373 (5), 1123-1140

Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD, Groshen S, Tsao-Wei DD, Danenberg PV, Lenz HJ (2001): ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 19 (23), 4298-4304

Shuck SC, Short EA, Turchi JJ (2008): Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res* 18 (1), 64-72

Simpson D, Dunn C, Curran M, Goa KL (2003): Oxaliplatin: a review of its use in combination therapy for advanced metastatic colorectal cancer. *Drugs* 63 (19), 2127-2156

Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S et al. (2007): A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445 (7130), 881-885

Stark AL, Zhang W, Mi S, Duan S, O'Donnell PH, Huang RS, Dolan ME (2010): Heritable and non-genetic factors as variables of pharmacologic phenotypes in lymphoblastoid cell lines. *Pharmacogenomics J* 10 (6), 505-512

Stoehlmacher J, Ghaderi V, Iobal S, Groshen S, Tsao-Wei D, Park D, Lenz HJ (2001): A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 21 (4B), 3075-3079

Takimoto CH, Remick SC, Sharma S, Mani S, Ramanathan RK, Doroshow JH, Hamilton A, Mulkerin D, Graham M, Lockwood GF et al. (2003): Administration of oxaliplatin to patients with renal dysfunction: a preliminary report of the national cancer institute organ dysfunction working group. *Semin Oncol* 30 (4 Suppl 15), 20-25

Todd RC, Lippard SJ (2009): Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* 1 (4), 280-291

van den Berghe PV, Folmer DE, Malingre HE, van Beurden E, Klomp AE, van de Sluis B, Merkx M, Berger R, Klomp LW (2007): Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake. *Biochem J* 407 (1), 49-59

Wheeler HE, Gamazon ER, Stark AL, O'Donnell PH, Gorsic LK, Huang RS, Cox NJ, Dolan ME (2013): Genome-wide meta-analysis identifies variants associated with platinating agent susceptibility across populations. *Pharmacogenomics J* 13 (1), 35-43

Wu HI, Brown JA, Dorie MJ, Lazzeroni L, Brown JM (2004): Genome-wide identification of genes conferring resistance to the anticancer agents cisplatin, oxaliplatin, and mitomycin C. *Cancer Res* 64 (11), 3940-3948

Xu X, Duan L, Zhou B, Ma R, Zhou H, Liu Z (2012a): Genetic polymorphism of copper transporter protein 1 is related to platinum resistance in Chinese non-small cell lung carcinoma patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39 (9), 786-792

Xu X, Ren H, Zhou B, Zhao Y, Yuan R, Ma R, Zhou H, Liu Z (2012b): Prediction of copper transport protein 1 (CTR1) genotype on severe cisplatin induced toxicity in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Lung Cancer* 77 (2), 438-442

Ychou M, Viret F, Kramar A, Desseigne F, Mitry E, Guimbaud R, Delpero JR, Rivoire M, Quenet F, Portier G et al. (2008): Tritherapy with fluorouracil/leucovorin, irinotecan and oxaliplatin (FOLFIRINOX): a phase II study in colorectal cancer patients with non-resectable liver metastases. *Cancer Chemother Pharmacol* 62 (2), 195-201

Yin M, Yan J, Martinez-Balibrea E, Graziano F, Lenz HJ, Kim HJ, Robert J, Im SA, Wang WS, Etienne-Grimaldi MC et al. (2011): ERCC1 and ERCC2 polymorphisms predict clinical outcomes of oxaliplatin-based chemotherapies in gastric and colorectal cancer: a systemic review and meta-analysis. *Clin Cancer Res* 17 (6), 1632-1640

Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K (2006): Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *J Pharmacol Exp Ther* 319 (2), 879-886

Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, Timpson NJ, Perry JR, Rayner NW, Freathy RM et al. (2007): Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316 (5829), 1336-1341

Zembruski NC, Buchel G, Jodicke L, Herzog M, Haefeli WE, Weiss J (2011): Potential of novel antiretrovirals to modulate expression and function of drug transporters in vitro. *J Antimicrob Chemother* 66 (4), 802-812

Zhou B, Gitschier J (1997): hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (14), 7481-7486

Danksagung:

Ich möchte an dieser Stelle allen Personen, die mich im Rahmen meiner Dissertation unterstützt haben, herzlich danken. Ohne ihre Hilfe wäre die Arbeit bei weitem viel schwieriger und nahezu unmöglich gewesen.

Prof. Dr. J. Brockmüller schätze ich sehr und danke für die Vergabe des hochinteressanten Dissertationsthemas. Die Promotionsarbeit verstärkte mein Verständnis, Wissen und Interesse für die Wirkungsweisen und Verwendung von Arzneimitteln, was im Studium ein großer Vorteil war.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. MSc. M. Schirmer, der mich von Anfang an mit seinen hilfreichen Ideen und seinem umfassenden Wissen unterstützte. Er war mein direkter Ansprechpartner während der Dissertation und hat – zusammen mit Herrn Prof. Dr. Beißbarth – die statistischen Analysen durchgeführt. Ich habe sehr viel von ihm lernen können, sodass ich den Begriff „Wissenschaftler“ zunächst mit ihm assoziiere. Zugleich war es ein großes Vergnügen, mit ihm über alle möglichen Themen, zu diskutieren. Lieber Markus, du bist ein großes wissenschaftliches Vorbild!

Herrn Prof. Beißbarth (Institut für Medizinische Statistik) danke ich sehr für die Durchführung der komplexen Genom-weiten statistischen Analysen. Herrn Dr. R.-A. Hilger, Universitätsklinikum Essen, danke ich vielmals für die Durchführung der atomabsorptionsspektrometrischen Messungen zum DNA-gebundenen Platin.

Ein ganz besonderer Dank gebührt auch Herrn cand. rer.nat. Sebastian Roppel, der zur gleichen Zeit in der Abteilung Klinische Pharmakologie seine Promotion machte. Ohne ihn wären die Laborarbeit und die langen Arbeitszeiten nicht so schön gewesen.

Ebenso möchte ich hier Herrn cand. med. Ruben Pflüger für seine tatkräftige Arbeit bei der Kultivierung der LCLs danken. Sein waches Gespür für Feinheiten war in vielerlei Hinsicht bei der Arbeit hilfreich.

Den Mitarbeitern der Abteilung Klinische Pharmakologie, vor allem Dr. Mladen Tzvetkov, Karolin Jobst und Sven Müller danke ich für ihre organisatorische und technische Unterstützung. Auch bei Herrn Dr. med. Malte und Prof. Dr. med. Zimmermann aus der Abteilung Klinische Pharmakologie möchte ich mich für die Benutzung des FACS-Geräts herzlich bedanken.

Lebenslauf:

Ich wurde am 30.08.1988 als Kind der Eheleute Ramazan Saman und Kadriye Saman in Idil, dem kurdischen Teil der Türkei, geboren. Im Alter von 7 Jahren musste ich mit meiner Familie wegen unserer kurdischen Identität nach Deutschland emigrieren. Zwischen 1995 und 1999 besuchte ich zunächst die Grundschule in Villingen-Schwenningen, dann in Erolzheim und schließlich in Söhnstetten. Von 1999-2008 besuchte ich das Max-Planck-Gymnasium in Lahr. Im Oktober 2008 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen, wo ich im September 2010 das Physikum und im Mai 2014 den schriftlichen Teil der Zweiten Ärztlichen Prüfung ablegte. Seit Februar 2011 bin ich mit meiner Dissertation beschäftigt.