



Untersuchungen zur Rolle des humanen Kupfertransporters 2 bei Tumorresistenzen gegen Platinkomplexe

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Susanne Eberle
aus Mannheim

Düsseldorf, Dezember 2011

Aus dem Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Matthias U. Kassack
Koreferent: Prof. Dr. Ulrich Jaehde

Tag der mündlichen Prüfung:

Die vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Sie wurde in dieser oder ähnlicher Form bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 21. Dezember 2011

(Susanne Eberle)

I. ZUSAMMENFASSUNG

Platinkomplexe wie Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin sind klinisch eingesetzte potente Zytostatika. Häufig wird ihre Wirksamkeit durch Resistenzen der behandelten Tumoren eingeschränkt. Diese Resistenzen können u.a. durch eine verminderte Aufnahme in die Zelle, einen vermehrten Efflux oder eine veränderte intrazelluläre Sequestrierung hervorgerufen werden. Seit einigen Jahren werden in diesem Zusammenhang die Kupfertransporter hCtr1, ATP7A und ATP7B untersucht, da diese auch Platinkomplexe transportieren können. Veränderungen in der Expression dieser Transporter sind ein potentieller Mechanismus für Resistenzen gegen zytostatische Platinkomplexe. In Vorarbeiten wurde in Cisplatin-behandelten resistenten Zellen eine erhöhte Expression des humanen Kupfertransporters 2 (hCtr2) gefunden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Beitrag von hCtr2 zur Chemoresistenz gegen Platinkomplexe zu untersuchen. Dazu wurde hCtr2 rekombinant in Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen überexprimiert. Als Kontrollen dienten mit dem Leervektor transfizierte und hCtr1 überexprimierende Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen. Die rekombinanten hCtr2-Zellen erwiesen sich als signifikant weniger sensitiv gegenüber Cis- und Carboplatin als die Kontrollzellen. hCtr2 hatte hier also einen *resistenzfördernden* Effekt. Dies ist ein gegenläufiger Effekt zu hCtr1. Veränderungen des Cisplatin-Uptake oder der DNA-Platinierung konnten in hCtr2-Zellen nicht als Ursache für die verminderte Sensitivität nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich jedoch auf Cisplatininkubation hin eine Anreicherung von hCtr2 in Nucleoli, die bisher nicht beschrieben wurde. In hCtr1-überexprimierenden Zellen war trotz erhöhter Sensitivität und eines verstärkten Cisplatin-Uptake im Vergleich zu Kontrollzellen keine Erhöhung der DNA-Platinierung festzustellen. Dies bedeutet, dass für die Wirkung zytostatischer Platinkomplexe andere Wirkmechanismen als die DNA-Platin-Adduktbildung eine größere Rolle spielen könnten als bisher angenommen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die physiologische und klinische Relevanz des im rekombinanten System beobachteten resistenzfördernden hCtr2-Effekts in Tumorzellen verschiedener Cisplatinsensitivität sowie in Gewebeproben aus Ovarialtumoren untersucht. Zwischen der hCtr2-Expression und der Cisplatinsensitivität bzw. klinischen/prognostischen Parametern war keine Korrelation festzustellen. So scheint der resistenzfördernde Effekt von hCtr2 nur bei einer sehr hohen Expression, wie sie im rekombinanten System vorhanden ist, aufzutreten. Expressionsniveaus von hCtr2 wie sie in Tumoren vorkommen scheinen für diesen Effekt nicht auszureichen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen also gegen die Hypothese, dass hCtr2 eine klinische Relevanz für das Auftreten von Tumorresistenzen besitzt. Diese Arbeit gibt ferner Einblicke in die Bedeutung von hCtr2 für die intrazelluläre Pharmakokinetik von Cisplatin und die hCtr2-Lokalisation nach Cisplatin-Behandlung.

II. ABSTRACT

Platinum complexes like cisplatin, carboplatin and oxaliplatin are potent cytostatic drugs used in tumour therapy. The occurrence of chemoresistance in treated tumours, however, often restricts the efficacy of these cytostatics. This can be due to reduced uptake, enhanced efflux or altered intracellular sequestration. The copper transporters hCtr1, ATP7A and ATP7B have been studied in this context for a couple of years by now, since they are also able to transport platinum complexes. Altered expression of these transport proteins is a potential mechanism of resistance to cytotoxic platinum compounds. In a previous work the expression of the human copper transporter 2 (hCtr2) was found to be increased in resistant cells upon cisplatin treatment.

The aim of this thesis was to investigate the role of hCtr2 in chemoresistance to platinum complexes. Recombinant overexpression of hCtr2 was performed in Flp-InTM T-RExTM-293-cells. As controls served Flp-InTM T-RExTM-293-cells transfected with the empty vector as well as hCtr1 overexpressing Flp-InTM T-RExTM-293-cells. Compared to the controls, hCtr2 overexpressing cells revealed significantly reduced sensitivity to cisplatin as well as to carboplatin. Thus, hCtr2 *induces resistance* to platinum complexes. This is opposite to the effect of hCtr1. Despite the reduced platinum sensitivity, no changes of cisplatin-uptake or DNA-adduct formation in hCtr2-overexpressing cells could be found. Interestingly however, hCtr2-accumulation was observed in nucleoli upon treatment with cisplatin, which has not been described before. Furthermore, despite of enhanced cisplatin-uptake and sensitivity, hCtr1-overexpressing cells did not show increased DNA-adduct formation compared to control cells. Hence, for the cytotoxic effect of platinum complexes, mechanisms of action other than DNA-adduct formation might be more important than assumed so far.

In the second part of this thesis the physiological and clinical relevance of the resistance inducing effect of hCtr2 was investigated in several tumour cell lines differing in their cisplatin-sensitivity, as well as in tissue samples of human ovarian carcinomas. No correlation could be found between the hCtr2-expression and either cisplatin-sensitivity or clinical/prognostic parameters. Apparently, in order to affect sensitivity to platinum compounds, the expression of hCtr2 needs to be very high, as it was the case in the hCtr2-transfected recombinant cells. And probably, expression levels of hCtr2 that occur in tumours are not sufficiently high to reduce platinum sensitivity. Hence, from these findings, no clinical relevance of hCtr2 to tumour resistance in patients can be inferred. Furthermore, this study provides an insight into the role hCtr2 plays in intracellular pharmacokinetics of cisplatin and the localization of hCtr2 upon cisplatin treatment.

III. INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Tumoren – Definition und Systematik | 1 |
| 1.2 | Epidemiologie | 2 |
| 1.3 | Tumorentstehung | 2 |
| 1.4 | Ovarialkarzinom..... | 3 |
| 1.5 | Tumorthherapie | 4 |
| 1.5.1 | Zytostatisch wirksame Platinkomplexe | 5 |
| 1.5.2 | Andere Zytostatika | 12 |
| 1.6 | Kupfertransporter..... | 14 |
| 1.6.1 | Physiologische Rolle der Kupfertransporter | 15 |
| 1.6.2 | Kupfertransporter und Platinkomplexe | 21 |
| 1.7 | Zielsetzung der Arbeit..... | 28 |
| 2 | Material und Methoden..... | 31 |
| 2.1 | Materialien | 31 |
| 2.1.1 | Reagenzien, Chemikalien und Medien | 31 |
| 2.1.2 | Kits..... | 35 |
| 2.1.3 | Antikörper | 36 |
| 2.1.4 | Verbrauchsmaterialien | 36 |
| 2.1.5 | Primer | 38 |
| 2.1.6 | Plasmide | 40 |
| 2.1.7 | Geräte..... | 40 |
| 2.1.8 | Programme/Software | 42 |
| 2.1.9 | Puffer und Lösungen..... | 43 |
| 2.1.10 | Zelllinien und Nährmedien..... | 54 |
| 2.2 | Methoden | 58 |
| 2.2.1 | Zellkultivierung | 58 |
| 2.2.2 | Überexpression von hCtr1 und hCtr2 in Flp-In TM T-REx TM -293-Zellen | 60 |
| 2.2.3 | Bestimmung der Sensitivität gegen Zytostatika mittels MTT-Assay..... | 72 |
| 2.2.4 | DNA-Platinierung und Uptake-Studien in Flp-In TM T-REx TM -293-Zellen | 76 |
| 2.2.5 | Expressionsstudien auf Transkriptionsebene mittels RT-qPCR..... | 78 |
| 2.2.6 | Agarose-Elektrophoresen mit Nucleinsäuren | 88 |
| 2.2.7 | SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot ... | 90 |
| 2.2.8 | Statistik | 95 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 3 | Ergebnisse | 97 |
| 3.1 | Überexpression und funktionelle Untersuchungen von hCtr1 und hCtr2 | 97 |
| 3.1.1 | Nachweis der Überexpression von hCtr1 und hCtr2..... | 97 |
| 3.1.2 | Oligomerbildung von hCtr2..... | 106 |
| 3.1.3 | Einfluss der Überexpression von hCtr1 und hCtr2 auf die Expression von ATP7A und ATP7B sowie von CCS und HAH1 | 107 |
| 3.1.4 | Einfluss der Überexpression auf die Sensitivität gegen Zytostatika | 110 |
| 3.1.5 | cDDP-Uptake und DNA-Platinierung..... | 119 |
| 3.1.6 | Lokalisation von hCtr2 nach Behandlung mit Cisplatin | 121 |
| 3.2 | Expression von hCtr1, hCtr2, ATP7A und ATP7B in Tumorzelllinien unterschiedlicher Cisplatinsensitivität..... | 122 |
| 3.3 | Expression der vier Kupfertransporter in Gewebe aus Ovarialkarzinomen..... | 128 |
| 4 | Diskussion..... | 137 |
| 4.1 | Funktionelle Untersuchungen von hCtr1 und hCtr2 in Überexpressions-Zellen..... | 137 |
| 4.1.1 | Nachweis der Überexpression von hCtr1 und hCtr2..... | 137 |
| 4.1.2 | Untersuchung der Lokalisation von hCtr2..... | 138 |
| 4.1.3 | Einfluss von hCtr1 und hCtr2 auf die Toxizität von Platinkomplexen | 139 |
| 4.1.4 | Einfluss von hCtr1 und hCtr2 auf die Toxizität anderer Zytostatika..... | 140 |
| 4.1.5 | Vergleich der Auswirkungen der Überexpression von hCtr1 bzw. hCtr2 auf die Sensitivität gegen Kupfersulfat und Cisplatin | 141 |
| 4.1.6 | Oligomerbildung von hCtr2..... | 143 |
| 4.1.7 | Einfluss der hCtr1- bzw. hCtr2-Überexpression auf die Expression der Kupfer-ATPasen sowie CCS und HAH1 | 144 |
| 4.1.8 | Einfluss der hCtr1- bzw. hCtr2-Überexpression auf Cisplatin-Uptake und DNA-Platinierung..... | 144 |
| 4.1.9 | Einfluss von hCtr1 und hCtr2 auf die Toxizität von liposomalem Cisplatin | 146 |
| 4.2 | Untersuchungen zur klinischen Relevanz der im rekombinanten System gefundenen Effekte von hCtr2 | 147 |
| 4.2.1 | Expressionsuntersuchungen in Tumorzellen unterschiedlicher Platinsensitivität | 148 |
| 4.2.2 | Expressionsuntersuchungen in Gewebe aus Ovarialtumoren | 150 |
| 4.3 | Schlussfolgerung | 155 |
| 5 | Literaturverzeichnis..... | 157 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 6 | Anhang | 169 |
| 6.1 | Abkürzungsverzeichnis | 169 |
| 6.2 | Sequenzierungsergebnisse für die Plasmide zur Überexpression von hCtr1 und hCtr2..... | 172 |
| 6.3 | Vektorkarte von pcDNA TM 5/FRT/TO | 173 |
| 6.4 | Gegenüberstellung der Zellvitalität für die wirkstofffreien Kontrolllösungen in MTT-Assays mit Kupfersulfat und Cisplatin..... | 174 |
| 6.5 | Mittlere IC ₅₀ -Werte aus den MTT-Assays mit Liposomen..... | 174 |
| 6.6 | Ergebnisse für Cisplatin-Uptake und DNA-Platinierung | 174 |
| 6.7 | Normalisierte Expressionen der vier Kupfertransporter in Tumorzellen..... | 175 |
| 6.8 | Normalisierte Expressionen der vier Kupfertransporter in den einzelnen Gewebeproben | 176 |
| 6.9 | Test der Primereffizienz | 177 |
| 6.10 | Publikationen | 178 |
| 6.11 | Danksagung | 179 |

1 EINLEITUNG

Trotz der ständigen Weiterentwicklung von Therapien wird Krebs weltweit zu einem immer größeren Problem. Dies hängt sowohl mit der steigenden Anzahl an Neuerkrankungen zusammen, als auch mit einem verminderten Ansprechen vieler Tumoren gegen die eingesetzten Therapien. So sind z.B. Platinkomplexe wirkungsvolle Chemotherapeutika, ihre Effizienz wird jedoch häufig durch das Auftreten von Resistenzen vermindert. Die Mechanismen, die zu einer Tumoresistenz führen können, sind vielfältig und beinhalten an zentraler Stelle die Beteiligung verschiedener Transportproteine. Diese Arbeit befasst sich mit der möglichen Rolle von Kupfertransportern – insbesondere der von hCtr2 – bei der Resistenz von Tumoren gegen zytostatisch wirksame Platinkomplexe. Daher werden in diesem Kapitel Grundlagen sowie der derzeitige wissenschaftliche Erkenntnisstand zu diesem Thema zusammengefasst.

1.1 Tumoren – Definition und Systematik

Der Begriff „Tumor“ beschreibt ganz grundsätzlich eine Schwellung im Gewebe. Zumeist wird darunter aber eine Neoplasie, also eine abnorme Gewebeneubildung verstanden, wobei gutartige (benigne) und bösartige (maligne) Tumoren unterschieden werden. Weiterhin werden Neoplasien nach ihrem Ursprungsgewebe in epitheliale, mesenchymale und dysontogenetische Tumoren gruppiert. *Epitheliale Tumoren* gehen von Platten- oder Drüsenepithel aus. Dabei enden die Bezeichnungen benigner Formen auf –om (*Papillome* ausgehend von Plattenepithelien, *Adenome* ausgehend von Drüsenepithel), die maligner epithelialer Tumoren auf –karzinom. Hierbei werden wiederum *Plattenepithelkarzinome* und die von Drüsengewebe ausgehenden *Adenokarzinome* unterschieden. Eine weitere Gruppe stellen die *Urothelkarzinome* dar, die in Harnblase und ableitenden Harnwegen auftreten. *Mesenchymale Tumoren* entstehen aus Muskel-, Binde- und Gefäßgewebe oder aus Blutzellen. Maligne mesenchymale Tumoren werden meist mit der Endsilbe -sarkom benannt. Blastome stammen von mesenchymalen *Vorläuferzellen* ab. Die Bezeichnung *Dysontogenetische Tumoren* beinhaltet alle durch embryonale und fetale Entwicklungsstörungen hervorgerufenen Neoplasien. Sie werden in die Gruppen *Teratome*, *embryonale Tumoren* und *Hamartome* eingeteilt (Leischner 2007).

In der Diagnostik werden maligne Tumoren durch *Staging* und *Grading* charakterisiert. Das Staging beschreibt dabei das Tumorstadium, das Grading den Malignitätsgrad der Tumorzellen. Letzterer wird an Hand von histologischen und zytologischen Untersuchungen festgestellt und in die Stufen G1 (geringster Malignitätsgrad, Zellen hoch differenziert) bis G4 (höchster Malignitätsgrad, Zellen entdifferenziert) eingestuft. Eine Unterscheidung der

Tumorstadien kann mit Hilfe der Richtlinien des American Joint Cancer Committee (AJCC) oder der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) vorgenommen werden. Beide stützen sich auf das TNM-Klassifizierungssystem und weitere Kriterien wie das oben beschriebene Grading. Die TNM-Klassifizierung schließt die Ausdehnung des Primärtumors (T), den Befall von Lymphknoten (N) sowie das Auftreten von Fernmetastasen (M) ein. Diese werden durch Anfügen von Zahlen oder Prä- und Suffixen weiter charakterisiert (Leischner 2007; Pschyrembel/259. Auflage 2002).

1.2 Epidemiologie

Die Anzahl an Krebsneuerkrankungen beläuft sich in Deutschland auf ca. 450'000 pro Jahr, die Anzahl der pro Jahr auf eine Krebserkrankung zurückzuführenden Todesfälle auf ca. 216'000. Die Häufigkeit verschiedener Tumorarten ist u.a. von Alter, Geschlecht und Lebensgewohnheiten abhängig. In Industrieländern tritt bei Männern das Prostatakarzinom am häufigsten auf, bei Frauen das Mammakarzinom. Bei beiden Geschlechtern liegen Lungen- und Bronchialkarzinome sowie kolorektale Karzinome an zweiter oder dritter Stelle der am häufigsten auftretenden Krebsneuerkrankungen (Jemal et al. 2011; www.krebshilfe.de). Im Kindes- und Jugendalter sind Leukämien, Tumoren des zentralen Nervensystems sowie der Lymphknoten häufig auftretende Krebsarten (www.krebshilfe.de/krebszahlen.html). Der Anstieg der Krebsinzidenz mit zunehmender Entwicklung eines Landes hängt mit der höheren Lebenserwartung sowie der Veränderung der Lebensweise (Rauchen, Bewegungsarmut und ungesunde Ernährung) zusammen. So ist Krebs in Industrieländern die häufigste, in Entwicklungsländern bereits die zweithäufigste Todesursache (Jemal et al. 2011).

1.3 Tumorentstehung

Die Entstehung eines Tumors beginnt mit der Phase der *Initiierung*, in der es zu einem irreparablen Schaden der chromosomalen DNA kommt. Ursache können vererbte Mutationen sein oder aber exogene Faktoren wie mutagene Substanzen, UV-Strahlung oder onkogene Viren. Chronische Entzündungen können die Entstehung von DNA-Veränderungen begünstigen, da sie zu einer erhöhten Mitoserate führen, wobei die Zellen besonders empfänglich für Mutationen werden. Schaffen es die zellulären Reparaturmechanismen nicht, den Schaden zu beheben, kann es zur dauerhaften Veränderung der Zelle kommen. Wird die entartete Zelle daraufhin auch nicht vom Immunsystem erkannt und eliminiert, kommt es in der so genannten *Latenzphase* zur Proliferation und zu weiteren DNA-Veränderungen. Bei der Initiierung spielen *Onkogene* und *Tumorsuppressorgene* bzw. deren

Genprodukte eine wichtige Rolle. So genannte *Protoonkogene* codieren in gesunden Zellen für Proteine, die mit der Regulation von Zellproliferation und Differenzierung in Zusammenhang stehen, z.B. Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren oder Transkriptionsfaktoren. Mutationen können Protoonkogene jedoch in *Onkogene* verwandeln, so dass die resultierenden Genprodukte eine verstärkte Aktivität aufweisen. Auch eine gesteigerte Expression des nativen Proteins kann zu einer solchen Aktivitätserhöhung führen. Tumorsuppressorgene hingegen sorgen durch ihre Expressionsprodukte für eine Kontrolle bzw. Hemmung der Zellproliferation. Eines der bekanntesten Beispiele ist das Protein p53 (der „Hüter des Genoms“), welches im Fall eines DNA-Schadens den Zellzyklus bis zu einer erfolgreichen Reparatur anhält und bei irreparablen Schäden ggf. die Apoptose einleitet. In entarteten Zellen kann eine gestörte Funktion dieses wichtigen Proteins zu unkontrolliertem Wachstum und Verlust der chromosomalen Stabilität führen. In 50% aller Tumoren können Punktmutationen des p53-Gens nachgewiesen werden. Diese Mutationen gehen mit einem besonders bösartigen Wachstum sowie einer häufigeren Resistenz gegen Zytostatika und Strahlentherapien einher (Leischner 2007; Silbernagl und Lang 1998; Mutschler et al. 2008).

1.4 Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom, ein bösartiger Tumor des Eierstocks, wird mit Platinkomplexen behandelt. Diese Therapie ist jedoch nicht immer erfolgreich. Tritt innerhalb der ersten sechs Monate nach Abschluss der Primärtherapie ein Rezidiv auf, so wird dieses als *platinrefraktär* eingestuft. Dies bedeutet, dass die Tumorzellen eine Resistenz gegen die platinhaltige Chemotherapie aufweisen (AWMF online; Aebi et al. 2003). Das Ovarialkarzinom ist daher für Studien über die Ursachen einer Resistenz gegen Platinkomplexe besonders interessant. In dieser Arbeit wurden Tumorproben aus Ovarialkarzinomen und Tumorzelllinien ovariellen Ursprungs hinsichtlich eines Zusammenhangs der Expression von Kupfertransportern und Prognose bzw. Cisplatinresistenz untersucht. Daher soll diese Tumorart im Folgenden etwas näher beleuchtet werden.

Ovarialkarzinome zeigen keine Frühsymptome und werden daher meist erst in fortgeschrittenem Stadium erkannt. Es gibt derzeit keine Möglichkeit eines Vorsorge-Screenings zur Früherkennung, wie etwa die Mammographie beim Mammakarzinom. Ovarialkarzinome gehören zu den besonders bösartigen Tumoren mit schlechter Prognose, nur 30% der Patientinnen können geheilt werden. Hauptrisikofaktor ist das Alter. Man vermutet, dass die Narben, die im Laufe des Lebens einer Frau durch die Ovulationen entstehen, zur Karzino-genese beitragen. Daher gelten mehrere Schwangerschaften und die längere Einnahme von Ovulationshemmern als risikosenkende Faktoren (Leischner 2007). In 5-10% aller Fälle sind

genetische Faktoren für die Entstehung eines Ovarialkarzinoms verantwortlich. Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 (Breast Cancer Gene1 und 2) beispielsweise führen zu einem erhöhten Risiko für Mamma- und gleichzeitig auch für Ovarialkarzinome (Erblicher Brust- und Eierstockkrebs). In selteneren Fällen gibt es auch eine Assoziation zu einem erhöhten Risiko für Darm- und Gebärmutterkrebs oder anderen Tumorarten (Leischner 2007; AWMF online). Besondere Formen des Ovarialkarzinoms sind extraovarielle peritoneale Karzinome, die aus dem Oberflächenepithel des Peritoneums (Bauchfell) entstehen und sich auf die Ovarien ausbreiten können, sowie die so genannten Borderline-Tumoren. Letztere wachsen nicht invasiv und zeigen eine geringere Malignität sowie eine bessere Prognose im Vergleich zu invasiven Ovarialkarzinomen. Die Einteilung der Ovarialkarzinome erfolgt in die in Tabelle 1-1 angegebenen FIGO-Stadien (FIGO = Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) bzw. durch die TNM-Klassifikation, wobei hier für beide Systeme weitgehende Übereinstimmung besteht (Leischner 2007; AWMF online; Pschyrembel/259. Auflage 2002).

Die Therapie des Ovarialkarzinoms besteht in einer möglichst vollständigen operativen Entfernung des Tumors und – abhängig von Tumorstadium und Differenzierungsgrad – einer adjuvanten Kombinationschemotherapie, die neben einem Platinkomplex meist ein Taxan beinhaltet. Häufig wird Carboplatin zusammen mit Paclitaxel verwendet. Bei frühen Tumorstadien mit gutem Differenzierungsgrad kann auf eine Chemotherapie verzichtet werden. Bei Borderline-Tumoren ist die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie umstritten, da ein Nutzen hier bisher nicht gezeigt werden konnte (Leischner 2007; AWMF online).

| FIGO-Stadium | Beschreibung | 5-Jahres-Überlebensrate (%) |
|--------------|--|-----------------------------|
| I | Beschränkung des Tumors auf die Ovarien | 80 |
| II | Ausbreitung im Becken | 40 - 60 |
| III | Peritoneum, Lymphknoten, Omentum majus oder Dünndarm werden befallen; evtl. kommt es zur Metastasierung außerhalb des kleinen Beckens. | 10 - 25 |
| IV | Auftreten von Fernmetastasen außerhalb der Bauchhöhle, Tumor bricht in Blase oder Darm ein. | ≤ 10 |

Tab. 1-1: Stadieneinteilung von Ovarialtumoren gemäß FIGO (Leischner 2007)

1.5 Tumorthherapie

Zu den Therapien von Tumorerkrankungen gehören die operative Entfernung, Bestrahlungen, die Behandlung mit Zytostatika sowie Therapien mit Antikörpern, Hormonen oder Hormonantagonisten. Da sich diese Arbeit mit der Resistenz von Tumoren gegen Zytostati-

ka, insbesondere gegen Platinkomplexe, befasst, soll im Folgenden nur auf diese Therapieform näher eingegangen werden.

Zytostatika sind Arzneistoffe, die die Zellteilung beeinträchtigen. Sie wirken daher bevorzugt auf proliferierende Zellen und können als Krebstherapeutika eingesetzt werden, weil Tumorzellen eine erhöhte Zellteilungsrate im Vergleich zu gesunden Zellen aufweisen. Bei einer Chemotherapie werden allerdings immer auch gesunde Gewebe angegriffen, insbesondere solche, die sich ständig regenerieren und deren Zellen sich daher ebenfalls sehr häufig teilen (Mutschler et al. 2008; Pschyrembel/259. Auflage 2002).

1.5.1 Zytostatisch wirksame Platinkomplexe

Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin(II)) wurde das erste Mal im Jahr 1844 durch Zufall von dem italienischen Chemiker Michele Peyrone synthetisiert, als dieser das so genannte Magnus-Salz herstellen wollte, ein Konstitutionsisomer von Cisplatin mit gleicher stöchiometrischer Zusammensetzung. Peyrone beschäftigte sich daraufhin mit den völlig unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften dieser beiden isomeren Strukturen (Kauffman et al. 2010). Ende des neunzehnten Jahrhunderts arbeitete der Schweizer Chemiker und spätere Nobelpreisträger Alfred Werner bei der Erforschung seiner Koordinationstheorie mit dem „Peyron'schen Chlorid“ und postulierte eine quadratisch-planare Struktur für Pt(II)-Komplexe (Kauffman 1997). Die biologische Wirkung von Cisplatin wurde jedoch erst in den sechziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts entdeckt – wiederum durch Zufall. Der Physiker Barnett Rosenberg experimentierte an der Michigan State University mit elektromagnetischer Strahlung an *Escherichia Coli*-Bakterien. Er wollte herausfinden, ob elektrische oder magnetische Dipolfelder mit der Zellteilung in Zusammenhang stehen. Hierbei verwendete er vermeintlich inerte Platinelektroden und stellte fest, dass die Bakterien sich morphologisch veränderten. Als Ursache wurde Cisplatin identifiziert, das bei der Versuchsdurchführung als Elektrolyseprodukt entstanden war (Kelland 2007; Rosenberg et al. 1965). Wenige Jahre später wurde die wachstumshemmende Wirkung von Cisplatin auf Tumoren im Mausmodell entdeckt und kurz darauf wurden erste klinische Studien durchgeführt. 1978 wurde Cisplatin schließlich in den USA von der FDA zugelassen (Kelland 2007; Rosenberg et al. 1969). Die Einführung von Cisplatin verbesserte die Therapie verschiedener Tumorarten. Insbesondere profitierten Patienten mit Keimzelltumoren der Hoden, bei welchen eine Heilungsrate von 90-95% erzielt werden konnte (Burger et al. 2011; Raghavan 2003). Selbst bei Hodentumoren im fortgeschrittenen Stadium ist mit Cisplatin und den verwandten Platinkomplexen Carbo- und Oxaliplatin eine vollständige Heilung möglich (Mutschler et al. 2008). Letztere sind Platinkomplexe der zweiten und dritten Generation, die bei der Suche nach weniger

toxischen Alternativen zu Cisplatin entwickelt wurden. Cisplatin weist eine hohe Nephrotoxizität auf, die bis zum irreversiblen Nierenversagen führen kann. Eine weitere schwere Nebenwirkung ist die Ototoxizität. Außerdem besitzt Cisplatin ein stark emetogenes Potential (Burger et al. 2011; Mutschler et al. 2008).

Carboplatin wurde gut zehn Jahre nach Cisplatin zugelassen. Die für Cisplatin typischen toxischen Nebenwirkungen sind hier deutlich schwächer ausgeprägt. Dagegen besitzt Carboplatin jedoch eine recht starke Knochenmarkstoxizität, die dosislimitierend ist (Kelland 2007; Mutschler et al. 2008).

Oxaliplatin unterscheidet sich strukturell stärker von Cisplatin als Carboplatin. Es ist im Gegensatz zu den anderen beiden Komplexen bei kolorektalen Karzinomen wirksam. Die Substanz wurde bereits 1978 von Kidani et al. beschrieben, jedoch erst in den 1990er Jahren in klinischen Studien untersucht und Anfang des neuen Jahrtausends zur Therapie zugelassen (Kelland 2007).

1.5.1.1 Struktur und Wirkmechanismus der Platinkomplexe

Cisplatin (cDDP) ist ein neutraler, quadratisch-planarer Komplex mit der Summenformel $\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$. Der isomere trans-Komplex ist deutlich weniger zytotoxisch (Kelland 2007; Rosenberg et al. 1965). In der Zelle werden die beiden Chlorliganden sukzessive durch Wassermoleküle ausgetauscht. Dabei entstehen der einfach positiv geladene Chloro-Aquo-Komplex und der zweifach positiv geladene Diaquo-Komplex, welche wesentlich reaktiver sind als Cisplatin selbst. Der Austausch der Chlorliganden wird daher als Aktivierung angesehen. Außerhalb von Zellen herrscht im Körper eine Chloridionenkonzentration von 100 mM - im Gegensatz zu 4 mM intrazellulär – so dass die Hydratisierung in erster Linie nach Aufnahme in die Zelle stattfindet (Reedijk 2003; Siddik 2003; Aktories et al. 2009).

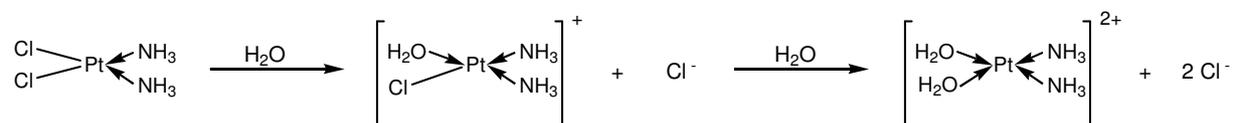


Abb. 1-1: Chemische Struktur von Cisplatin und seine Aktivierung zum Mono- und Diaquokomplex

Die aktiven Aquokomplexe greifen nukleophile Strukturen in der Zelle an, zu denen Nucleinsäuren und Proteine gehören. Als hauptsächlicher Mechanismus für die zytotoxische Wirkung gilt die Bildung von Platin-DNA-Addukten (Rabik und Dolan 2007; Zorbas und Keppler 2005). Diese führen zu Störungen der DNA-Replikation und der Transkription sowie zu

Zellzyklusarrest und schließlich zur Einleitung der Apoptose. Diesen Wirkmechanismus haben alle chemotherapeutisch eingesetzten Platinkomplexe gemein. Der nukleophile Angriff findet bevorzugt am Stickstoffatom in Position 7 der Purinbasen, insbesondere von Guanin, statt (Steinhilber et al. 2010; Siddik 2003). Da die Platinkomplexe zwei Abgangsgruppen besitzen, kann jedes Molekül mit zwei Nucleophilen reagieren, wodurch es zu Strangvernetzungen kommt. Dies geschieht v.a. innerhalb desselben Strangs (*Intrastrangvernetzungen*) im Abstand von ein bis zwei Nucleotiden, in geringerem Ausmaß auch zwischen zwei Einzelsträngen (*Interstrangvernetzungen*). Mit einem Anteil von 60-65% tritt die GpG 1,2-Intrastrangvernetzung zwischen zwei Guaninbasen am häufigsten auf, gefolgt von 20-25% ApG 1,2-Intrastrangaddukten zwischen Guanin- und Adeninbasen (Kelland 2007). Auch eine Vernetzung zwischen DNA und Protein ist möglich.

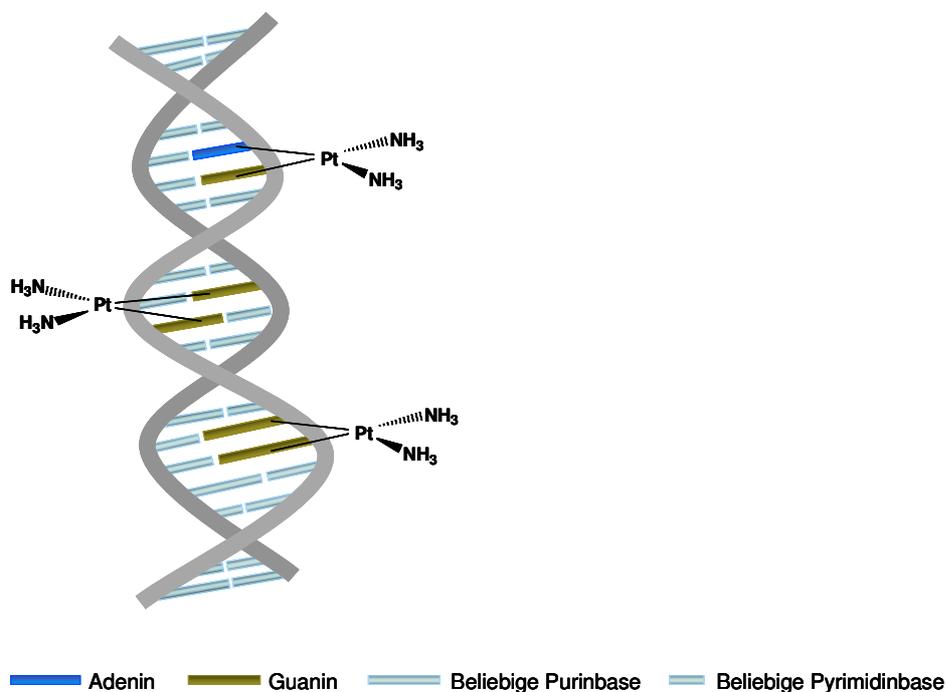


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der am häufigsten auftretenden cDDP-DNA-Addukte

Die Intrastrangaddukte führen zu Distorsionen der DNA, die wiederum von verschiedenen Proteinen erkannt werden können (Siddik 2003; Bellon et al. 1991). Dazu zählen z.B. Vertreter des so genannten Mismatch-repair-Systems (MMR) und das Protein HMG1 (nonhistone chromosomal high mobility group 1) (Fink et al. 1998; Siddik 2003). Sie aktivieren nach Erkennung des Schadens Signalwege, die zu Zellzyklusarrest und nachfolgend zu Apoptose oder DNA-Reparatur führen können. So kommt es nach Cisplatinbehandlung zu verschiedensten biologischen Effekten, die sowohl pro-apoptotisch als auch zellerhaltend sein können. Die Summe dieser Effekte entscheidet schließlich

darüber, welchen Weg die Zelle letztendlich einschlägt (Siddik 2003). Manche der Proteine, die durch Platinkomplexe verursachte DNA-Schäden erkennen können, leiten aber nicht nur Signalkaskaden ein. Teilweise können sie auch direkt zur zytotoxischen Wirkung beitragen. So vermutet man z.B., dass HMG1 nach der Erkennung des DNA-Schadens diesen von Reparaturenzymen abschirmt und dadurch die zytotoxische Wirkung begünstigt (Burger et al. 2011; Raymond et al. 2002; Siddik 2003; Huang et al. 1994). Eine hohe HMG1-Expression wurde mit der Sensitivierung von Tumorzellen in Verbindung gebracht (He et al. 2000). Des Weiteren wurde für cDDP auch eine vom endoplasmatischen Reticulum (ER) ausgehende Apoptoseauslösung als Wirkmechanismus gefunden. Unter Stressbedingungen kommt es im ER zu Störungen bei Proteinfaltung und -transport, was wiederum das UPR-System („unfolded protein response“) aktiviert. Kann daraufhin die normale ER-Funktion nicht wieder hergestellt werden, so kommt es zur Einleitung der Apoptose (Rabik und Dolan 2007; Mandic et al. 2003).

Carboplatin (CBDCA) besitzt an Stelle der Chlorliganden von Cisplatin einen 1,1-Cyclobutan-dicarboxylat-Rest als Abgangsgruppe, der mit dem Platinatom einen sechsgliedrigen Ring bildet, und ist daher stabiler (Wang und Lippard 2005). Dadurch werden die bei Cisplatin auftretenden toxischen Effekte verringert (Kelland 2007) und CBDCA zeigt einen langsameren Wirkungseintritt und eine längere Wirkdauer (Mutschler et al. 2008).

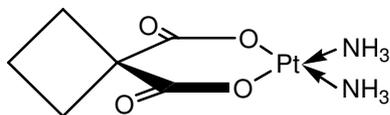


Abb. 1-3: Chemische Struktur von Carboplatin

Auch Carboplatin wird zunächst durch Hydrolyse zum aktiveren Aquokomplex umgewandelt. Die Carrier-Liganden, also die Liganden, die nicht durch Substitutionsreaktionen ersetzt werden, sind hier wie auch bei cDDP zwei Aminogruppen. Daher bilden beide Wirkstoffe mit DNA die gleichen Addukte. Die Reaktion erfolgt bei Carboplatin jedoch etwa zehnmal langsamer als bei Cisplatin und es werden 20-40-fach höhere Konzentrationen benötigt. Carboplatin ist bei Ovarial- und Lungenkrebs gut wirksam, bei anderen Tumoren jedoch weniger effizient als Cisplatin (Burger et al. 2011; Ardizzoni et al. 2007; Kelland 2007; Knox et al. 1986). Cisplatinresistente Tumoren weisen Kreuzresistenzen zu CBDCA auf (Burger et al. 2011).

Oxaliplatin (L-OHP) besitzt als Carrier-Ligand einen trans-L-1,2-Diaminocyclohexanrest

(DACH-Ligand) und als Abgangsgruppe Oxalat. Oxaliplatin bildet zwar weniger Platin-DNA-Addukte als Cisplatin, jedoch haben diese einen stärkeren Effekt und werden über andere Mechanismen erkannt als die DNA-Addukte der beiden anderen Komplexe (Burger et al. 2011; Raymond et al. 2002). So werden sie z.B. vom Nucleotide-excision-repair-System (NER) registriert, nicht jedoch vom Mismatch-repair-System. Zellen mit eingeschränkter MMR-Funktion können daher eine verminderte Sensitivität gegen Cisplatin aufweisen und dennoch gut auf Oxaliplatin ansprechen (Burger et al. 2011; Vaisman et al. 1998). Z.B. treten in kolorektalen Karzinomen häufig Defekte in MMR-assoziierten Genen auf. Diese Tumoren können mit Oxaliplatin behandelt werden, wohingegen cDDP und CBDCA unwirksam sind (Burger et al. 2011; Fu et al. 2006; Raymond et al. 2002; Rixe et al. 1996). Oxaliplatin zeichnet sich also dadurch aus, dass es auch bei cisplatin- und carboplatinresistenten Tumoren eingesetzt werden kann, da es ein anderes Resistenzprofil aufweist (Burger et al. 2011; Rixe et al. 1996; Mishima et al. 2002; Misset et al. 2000; Raymond et al. 2002). Nachteilig ist die dosislimitierende Neurotoxizität von Oxaliplatin (Mutschler et al. 2008).

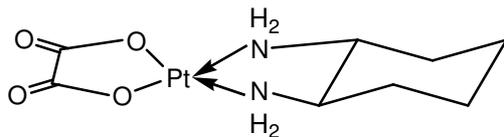


Abb. 1-4: Chemische Struktur von Oxaliplatin

Eine weitere Verbesserung der platinbasierten Chemotherapie ist Gegenstand intensiver Forschung. So wird beispielsweise versucht, die Aufnahme der Komplexe in Tumorzellen durch spezielle Formulierungen zu erhöhen. Dazu gehören Liposomen, Nanokapseln und die Bindung an physiologische Proteine (Burger et al. 2011; de Jonge et al. 2010; Shah und Dizon 2009; Stathopoulos 2010). Liposomale Formulierungen von cDDP werden auch hinsichtlich einer potenziellen Umgehung von Resistenzen untersucht (Krieger et al. 2010). Des Weiteren befinden sich Platinkomplexe mit neuer chemischer Struktur in der Entwicklung, so z.B. Picoplatin und das oral verfügbare Satraplatin (beide derzeit in Phase III-Studien) (Burger et al. 2011). Hauptziele bei der Suche nach neuen cDDP-Analoga sind die Verminderung der Toxizität und die Überwindung von Tumorresistenzen.

1.5.1.2 Tumorresistenzen gegen Platinkomplexe

Resistenzen gegen Platinkomplexe in Tumorzellen können in primäre (intrinsische) und sekundäre (während der Therapie entstandene) Resistenzen unterteilt werden (Siddik 2003).

Resistenzen können vielfache Ursachen haben. Dazu gehören eine verminderte intrazelluläre Akkumulation oder die Inaktivierung des Wirkstoffs, verstärkte DNA-Reparatur nach der Adduktbildung oder auch eine erhöhte Toleranz gegenüber Platin-DNA-Addukten (Kelland 2007; Siddik 2003; Huang et al. 1994; He et al. 2000).

Von den verschiedenen DNA-Reparatur-Mechanismen haben das NER-System und das MMR-System im Zusammenhang mit Platinkomplexen die größte Bedeutung. Bei ersterem bildet sich ein Heterodimer aus den Proteinen ERCC1 („excision repair cross-complementing-1“) und XPF („xeroderma pigmentosum, complementation group F“). Dieses hat Nucleaseaktivität und trägt zur Entfernung von Platinaddukten bei (Kelland 2007). Die Expression von ERCC1 wurde mehrfach mit dem Ansprechen von Tumorzellen auf Platinkomplexe in Verbindung gebracht. So scheint eine erhöhte Transkription des ERCC1-Gens zu einer Verminderung der Platinsensitivität zu führen, während in ERCC1-knock-down Experimenten eine Sensitivitätserhöhung beobachtet wurde (Ferry et al. 2000; Chang et al. 2005; Dabholkar et al. 1992). Ist die Funktion des MMR-Systems gestört, führt dies - wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben - zu einer Resistenz gegen cDDP und CBDCA, nicht jedoch gegen L-OHP. Nach der Erkennung des DNA-Schadens durch MMR-Proteine wie MSH2, MSH3 und MSH6 folgt vermutlich eine Phase von DNA-Reparaturzyklen, die jedoch nicht zur Behebung des Schadens führen, so dass letztendlich Apoptose ausgelöst wird und die Zelle abstirbt. Eine eingeschränkte Funktion dieses Mechanismus kann z.B. durch verminderte Expression von oder Mutationen in MMR-relevanten Genen bedingt sein (Kelland 2007; Fink et al. 1998; Zdraveski et al. 2001; Vaisman et al. 1998, Aebi et al. 1996, Drummond et al. 1996, Fink et al. 1996, Brown et al. 1997).

Eine erhöhte Toleranz gegen Platin-DNA-Addukte kann auch durch eine verstärkte Expression bestimmter DNA-Polymerasen (z.B. pol β und pol η) auftreten, die im Stande sind, die DNA über DNA-Schäden hinweg zu replizieren (so genannte „translesion synthesis“ bzw. „replicative bypass“) (Bassett et al. 2002).

Schließlich können auch solche Zellen eine erhöhte Toleranz gegen Platinkomplexe aufweisen, in welchen der Ablauf der Apoptose-Signalwege gestört ist. Beispielsweise zeigen Ovarialkarzinom-Patientinnen mit Mutationen im p53-Gen ein schlechteres Ansprechen auf eine Platintherapie als Patientinnen mit Wildtyp p53 (Kelland 2007; Gadducci et al. 2002). Auch eine Überexpression der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Her2/neu verschlechtert das Ansprechen auf eine Therapie mit cDDP (Slamon et al. 1989, Hengstler et al. 1999). Nach Aktivierung des Rezeptors werden nachgeschaltete Signal-Transduktions-Wege in Gang gesetzt. Hierzu gehören der Ras/MAPK-Signalweg (Rat sarcoma/ mitogen-activated protein kinase) und der PI3-K/Akt-Signalweg (Phosphoinositid 3- Kinase/Active human protein kinase), die zur Inhibierung der pro-apoptischen Proteine Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death) und/oder Bad (Bcl2-antagonist of cell death) führen (Hung

und Lau 1999; <http://www.cellsignal.com>). Die Caspasen 3, 8 und 9 spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der cDDP-induzierten Apoptose. Resistente Tumorzellen können eine verminderte Aktivität dieser Enzyme aufweisen (Henkels et al. 1999; Blanc et al. 2000; Asselin et al. 2001; Ono et al. 2001). Dies kann z.B. durch eine Überexpression von Apoptose-Inhibitoren wie XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) oder Survivin bedingt sein, die in verschiedenen Untersuchungen zu einer Verstärkung der cDDP-Resistenz führte (Asselin et al. 2001; Ikeguchi et al. 2002).

Auch die Proteine der Bcl2-Familie (B-cell CLL/lymphoma 2) spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Mitglieder dieser Proteinfamilie wirken entweder pro-apoptotisch, wie die im vorherigen Abschnitt bereits erwähnten Proteine Bad und Bim, oder anti-apoptotisch (z.B. Bcl-2 und Bcl-xL) (Farrow und Brown 1996; Hanahan und Weinberg 2000; Schuler und Green 2001). Veränderungen innerhalb dieser Proteinfamilie sind ebenfalls potentielle Störfaktoren im Ablauf der Apoptose. So wurden z.B. Überexpressionen von Bcl-2 bzw. Bcl-xL mit einer Resistenz gegen cDDP in Verbindung gebracht (Hockenbery et al. 1993; Chiao et al. 1995; Gebauer et al. 2000).

Resistenzen gegen Platinkomplexe können aber auch durch Mechanismen bedingt sein, die der Bildung von Pt-DNA-Addukten vorgeschaltet sind. So können die Platinkomplexe im Zytosol durch Thiolgruppen enthaltende Moleküle inaktiviert werden, bevor sie die DNA erreichen. Hierzu gehören das aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin aufgebaute Pseudotripeptid Glutathion (GSH) und die Metallothioneine (MT) (Siddik 2003; Kelley et al. 1988). Erhöhte GSH-Konzentrationen wurden im Zusammenhang mit cDDP-Resistenzen beobachtet (Kelland 1993, Wolf et al. 1987). Dies kann z.B. durch eine verstärkte Expression des für die GSH-Synthese wichtigen Enzyms γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -GCS) hervorgerufen werden (Siddik 2003; Mistry et al. 1991; Godwin et al. 1992; Hamaguchi et al. 1993). GSH kann Platinkomplexe entweder enzymunabhängig oder durch die GSH-S-Transferase π (GST π) vermittelt inaktivieren, so dass auch eine erhöhte GST π -Expression zur Resistenzbildung beitragen kann (Goto et al. 1999; Sakamoto et al. 2001; Shiga et al. 1999). Das Enzym γ -Glutamyltransferase (γ -GT) katalysiert den Abbau von GSH zu Cysteinylglycin, welches ebenfalls mit Platinkomplexen reagieren kann. So ist es nicht verwunderlich, dass auch eine Überexpression von γ -GT zu einer erhöhten cDDP-Resistenz führen kann (Daubeuf et al. 2002). Neben der direkten Reaktion zwischen GSH und Platinkomplexen können erhöhte Konzentrationen dieses Peptids auch indirekt zur Resistenz beitragen, z.B. durch Erhöhung der DNA-Reparaturrate. Außerdem wird eine GSH-bedingte Verstärkung der Apoptoseinhibition durch Bcl-2 vermutet (Kelland 1993; Hockenbery et al. 1993; Chiao et al. 1995). Die cysteinreichen MT dienen in der Zelle u.a. der Schwermetallentgiftung und können auch Platinkomplexe inaktivieren. Eine erhöhte Konzentration dieser Proteine konnte in einigen resistenten Tumorzellen nachgewiesen

werden (Kelland 1993; Kelley et al. 1988).

Schließlich spielen Transportproteine eine Rolle bei der Zytostatikaresistenz. Sie können durch Vermittlung der Platin-Aufnahme (Uptake) in die Zelle oder der Platin-Ausschleusung (Efflux) aus der Zelle Einfluss auf die intrazelluläre Anreicherung und damit die Wirkung der Platinkomplexe haben. Eine veränderte Expression solcher Transportproteine ist ein möglicher Resistenzmechanismus, da Tumorzellen hierdurch die intrazellulären Platinkonzentrationen gering halten können. In verschiedenen Untersuchungen wurden u.a. Mitglieder der ABC multidrug transporters-Familie (ABC = ATP-binding cassette) als Efflux-Transporter für Platinkomplexe identifiziert und mit der Resistenzbildung in Verbindung gebracht, z.B. MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) (Burger et al. 2011; Ohishi et al. 2002). Der Transporter ABCB1, auch P-Glycoprotein (P-gp) genannt, schleust Zytostatika wie beispielsweise Anthracycline oder Etoposid aus Tumorzellen. Eine Korrelation zwischen einer Therapie mit Platinkomplexen und der Expression von P-gp scheint jedoch nicht zu bestehen (Burger et al. 2011; Mutschler et al. 2008). Aus der Gruppe der solute carriers (SLC) spielt möglicherweise OCT2 (organic cation transporter 2) eine Rolle bei der zellulären Aufnahme von Cisplatin und insbesondere Oxaliplatin, nicht jedoch von Carboplatin (Burger et al. 2011; Yonezawa et al. 2006; Zhang et al. 2006; Ciarimboli et al. 2005). Dagegen sind die verwandten Transporter OCT1 und OCT3 für den Uptake von Platinkomplexen vermutlich nicht von Bedeutung (Burger et al. 2011). Die SLC47-Familie, auch als Transporter vom MATE-Typ (multidrug and toxin extrusion) bekannt, steht im Verdacht, Platinkomplexe aus der Zelle zu schleusen (Burger et al. 2011; Yonezawa et al. 2006). Die in dieser Arbeit untersuchten Kupfertransporter hCtr1, hCtr2, ATP7A und ATP7B werden ebenfalls mit der Resistenz gegen Platinkomplexe in Verbindung gebracht und sind in Abschnitt 1.6 detailliert beschrieben.

1.5.2 Andere Zytostatika

Neben den Platinkomplexen gibt es eine Reihe anderer Gruppen von Zytostatika. Alkylantien (z.B. Stickstofflost-Derivate), reagieren ähnlich wie Platinkomplexe mit DNA und führen damit zu deren Schädigung und Hemmung der Zellteilung. Topoisomerase-Hemmstoffe wie Topotecan oder Etoposid führen durch DNA-Strangbrüche zum Zelltod. Antimetaboliten hemmen die Synthese von Nucleinsäurebausteinen (z.B. Methotrexat, Mercaptopurin) bzw. werden als falsche Bausteine in DNA oder RNA eingebaut und hemmen so die Nucleinsäuresynthese oder -reparatur (z.B. Fludarabin, Cladribin, Fluorouracil). Zu den Mitosehemmstoffen gehören die Vinca-Alkaloide sowie die Gruppe der Taxane. Zu letzteren gehört Docetaxel, das in dieser Arbeit als Vergleich gegenüber Platinkomplexen eingesetzt wurde.

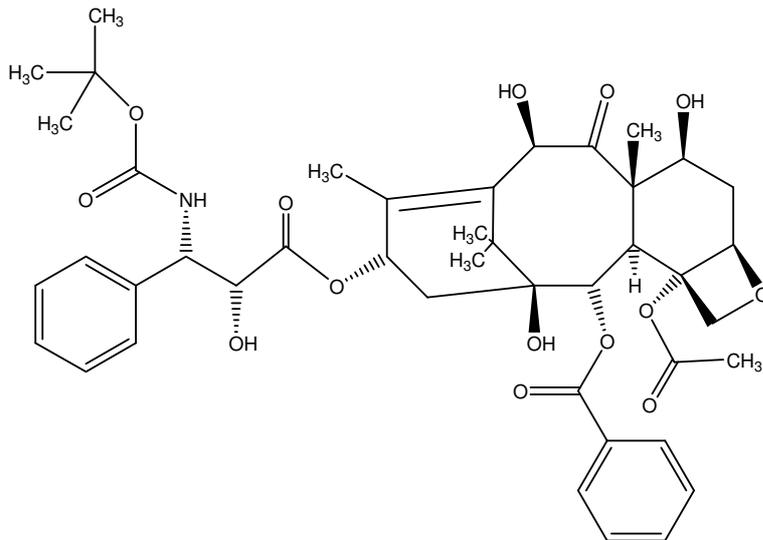


Abb. 1-5: Chemische Struktur von Docetaxel

Taxane verhindern den Umbau des Spindelapparates durch Bindung an die β -Tubulinuntereinheit. Somit wird dieser nach der G₂-Phase, in welcher der Spindelapparat dem Stofftransport dient, nicht mehr in die während der Mitose benötigten Kernspindeln umgewandelt und die Zellen sterben ab. Anthracycline, wie das ebenfalls in dieser Arbeit verwendete Doxorubicin, sind zytostatisch wirksame Antibiotika aus Streptomyces-Arten. Sie besitzen mehrere Wirkmechanismen.

Zum einen interkalieren sie in DNA, zum anderen führen sie durch Topoisomerase-II-Hemmung und die Bildung von Radikalen zu DNA-Strangbrüchen. Des Weiteren binden sie an Biomembranen und stören deren Funktion. Weitere zytostatisch wirksame Antibiotika sind Actinomycine, Mitomycine und Bleomycin.

Für hormonabhängig wachsende Tumoren können außer den klassischen Zytostatika auch Hormone und Hormonantagonisten eingesetzt werden (z.B. Tamoxifen beim Mammakarzinom).

In den letzten Jahren sind in der Tumorthherapie außerdem Antikörper und Zytokine auf den Markt gekommen. So wird z.B. Trastuzumab bei Her2/neu-positiven Mammakarzinomen eingesetzt oder Interferon α 2a und Interferon α 2b bei Haarzell-Leukämie (Mutschler et al. 2008).

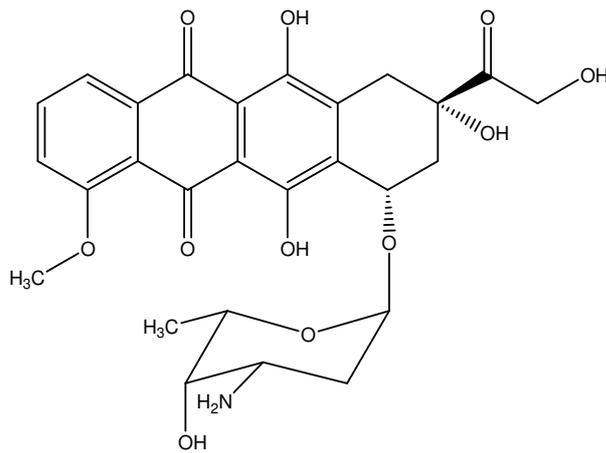


Abb. 1-6: Chemische Struktur von Doxorubicin

1.6 Kupfertransporter

Kupfer ist ein essentielles Spurenelement und in allen Geweben des menschlichen Organismus vorhanden. Die Gesamtmenge an Kupfer im Körper beträgt ca. 100-150 mg, wobei die Leber die höchste Kupferkonzentration aufweist (Rassow et al. 2006). Erwachsenen wird eine tägliche Zufuhr von ca. 1,0-1,5 mg Kupfer empfohlen (<http://www.dge.de>). 40-60% des Nahrungskupfers werden im Magen und oberen Duodenum resorbiert. Im Blut liegt Kupfer v.a. an Caeruloplasmin (s.u.) sowie Albumin und Transcuprin gebunden vor (Silbernagl und Lang 1998). Der Referenzwert für die Kupferkonzentration im Blutplasma ist abhängig vom Lebensalter und sollte bei Erwachsenen etwa im Bereich von 12-20 $\mu\text{mol/l}$ liegen (Schänzler und Bieger 2007).

Wegen seiner Redox-Eigenschaften ($\text{Cu}^+ \leftrightarrow \text{Cu}^{2+} + \text{e}^-$) ist Kupfer in zahlreichen lebenswichtigen Enzymen aus der Gruppe der Oxidoreduktasen als Cofaktor enthalten. Dazu gehören z.B. die Superoxid-Dismutase, welche im Zytosol am Abbau freier Superoxidradikale beteiligt ist, und die Cytochrom-c-Oxidase im Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette. Des Weiteren wird Kupfer benötigt von der Lysyl-Oxidase im Bindegewebe für die Quervernetzung von Kollagen, von der Tyrosinase bei der Melaninsynthese und von der Ferroxidase I, auch Caeruloplasmin genannt, für die Oxidation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} im Zytosol. Caeruloplasmin, das in der Leber gebildet und über das Blut in andere Organe transportiert wird, ist gleichzeitig eine wichtige Speicherform für Kupfer. Etwa 93% des im Blutplasma enthaltenen Kupfers sind an Caeruloplasmin gebunden. Auch die Synthese und der Abbau von Katecholaminen sind von Kupfer abhängig (Dopamin- β -Hydroxylase, Monoaminoxidase), genau so wie die Inaktivierung von Histamin (Diaminoxidase) (Rassow et al. 2006; Gupta und Lutsenko 2009; Zhou und Gitschier 1997). Kupfer ist damit an der Zellatmung, der neuronalen Entwicklung, der Eisenhomöostase und anderen lebenswichtigen Stoffwechselprozessen beteiligt, die durch ein Kupferdefizit empfindlich gestört werden

würden. Andererseits ist Kupfer gerade wegen seiner Redox-Eigenschaften in freier Form aber auch ein starkes Zellgift, da es dann zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beiträgt (Zhou und Gitschier 1997; v.d. Berghe und Klomp 2010). Eine strenge Kontrolle der intrazellulären Kupferkonzentration, der Aufnahme und intrazellulären Verteilung sowie der Ausschleusung aus der Zelle ist damit unerlässlich. Diese wichtige Aufgabe der Kupferhomöostase erfüllen beim Menschen die vier Kupfertransporter hCtr1, hCtr2, ATP7A und ATP7B sowie verschiedene Kupferchaperone. Durch das Zusammenwirken dieser Proteine wird die Konzentration an freiem Kupfer in der Zelle bei nahezu null gehalten ($< 10^{-18}$ M). Die Kupferchaperone CCS, COX17 und HAH1 (Synonym: ATOX1) übergeben Kupfer jeweils an spezifische Enzymkomplexe in der Zelle. So wird es von CCS zur Superoxid-Dismutase transferiert, COX17 sorgt für den Transport zur Cytochrom-c-Oxidase und HAH1 übergibt Kupfer an ATP7A und ATP7B (vgl. Kapitel 1.6.1.2) (Abada und Howell 2010).

1.6.1 Physiologische Rolle der Kupfertransporter

1.6.1.1 hCtr1 und hCtr2

Die Kupfertransporter Ctr1 und Ctr2 gehören zur „Solute carrier“-Familie und sind in eukaryotischen Zellen bzw. Organismen evolutionär hoch konserviert (v.d.Berghe und Klomp 2010). Die beim Menschen vorkommenden, humanen Kupfertransporter hCtr1 und hCtr2 werden auch als SLC31A1 und SLC31A2 bezeichnet.

hCtr1

hCtr1 wird als „high-affinity copper uptake transporter“ bezeichnet. Er wird in allen Geweben exprimiert und stellt wahrscheinlich den wichtigsten Aufnahmemechanismus für Kupfer aus dem Blut in die Zelle dar (Kim et al. 2008; Maryon et al. 2007a). Besonders stark exprimiert wird hCtr1 im Plexus choroideus, den Nierentubuli und im Bindegewebe von Augen, Eierstöcken und Hoden (Kuo et al. 2001). Experimente an Ctr1-knock-out-Mäusen haben gezeigt, dass Föten ohne Ctr1 nicht überlebensfähig sind (Kuo et al. 2001; Lee et al. 2002). Ctr1 scheint damit bereits in der Embryonalentwicklung essentiell wichtig zu sein.

hCtr1 ist ein transmembranäres Transportprotein, das in der äußeren Zytoplasmamembran sowie in intrazellulären Vesikeln vorkommt. Es besteht aus drei homologen Untereinheiten, die eine zentrale Pore für die Einschleusung von Kupferionen bilden (Aller und Unger 2006). Jedes Monomer besteht aus 190 Aminosäuren und besitzt einen extrazellulären N- und einen intrazellulären C-Terminus sowie drei transmembranäre Helices (TMH), wobei sich zwischen der ersten und zweiten Helix eine intrazelluläre Schleife befindet (Gupta und

Lutsenko 2009). Am N-Terminus ist hCtr1 über Asparagin- und Threonin-Reste glycosyliert (Gupta und Lutsenko 2009; Maryon et al. 2007b). Die über den Threonin-Sauerstoff gebundenen Zuckerreste dienen wahrscheinlich der Stabilisierung des hCtr1-Proteins, während die Funktion der Glycosylierung am Asparagin-Stickstoff noch nicht hinreichend geklärt ist (Maryon et al. 2007b). Die im N-terminalen Teil in großer Zahl vorkommenden Methionin- (so genannte „Mets motifs“) und Histidinreste sind wahrscheinlich für die Bindung von Kupferionen ausschlaggebend (Jiang et al. 2005; v.d.Berghe und Klomp 2010). Besonders wichtig scheinen hierbei die evolutionär stark konservierten Aminosäuremotive ⁴⁰MMMMPM⁴⁵ nahe der ersten und ¹⁵⁰MXXXM¹⁵⁴ in der zweiten transmembranären Domäne zu sein. Im hCtr1-Trimer ordnen sich diese Reste vermutlich ringförmig entlang der Pore an und schleusen Cu(I) über Transchelatierungsreaktionen in die Zelle (Abada und Howell 2010). Diskutiert wird jedoch auch eine freie Diffusion durch den Kanal (Gupta und Lutsenko 2009). Ein- und Ausgang der Pore können wahrscheinlich über einen „Gating-Mechanismus“ verschlossen werden. Hierfür sind vermutlich der N-terminale Proteinteil auf der extrazellulären Seite und innerhalb der Zelle der C-Terminus mit seinem Cysteinrest in Position 189 oder die intrazelluläre Schleife verantwortlich (Abada und Howell 2010; Gupta und Lutsenko 2009). Abbildung 1-7 zeigt eine schematische Darstellung der Struktur des hCtr1-Monomers.

Extrazellulär ist Kupfer in seiner zweiwertigen Form an Caeruloplasmin gebunden. Es wird vermutet, dass es – ähnlich wie bei Hefezellen – durch Reduktasen an der Zelloberfläche zu Cu(I) reduziert wird. In dieser Form wird es energieunabhängig über hCtr1 in die Zelle geschleust. Der apparente K_m -Wert liegt bei 2-5 μM (Abada und Howell 2010; Lee et al. 2002).

Neben hCtr1 existiert ein hoch homologes Pseudogen, hCtr1 ψ . Møller et al. haben beschrieben, dass dieses Pseudogen zwar transkribiert wird, jedoch scheinbar nicht zum Kupfer-Uptake befähigt ist. Es besteht aus nur 95 Aminosäureresten und ist dem N-Terminus von hCtr1 sehr ähnlich. Es wird spekuliert, ob hCtr1 ψ eine ähnliche Rolle spielt wie die Kupferchaperone, welche z.T. strukturelle Ähnlichkeiten mit den metallbindenden N-terminalen Domänen der Kupfer-ATPasen (s. 1.6.1.2) aufweisen (Møller et al. 2000; Harrison et al. 2000).

hCtr2

Das aus 144 Aminosäuren bestehende Transportprotein hCtr2 ist in seiner Aminosäuresequenz zu ca. 41% homolog zu hCtr1. Es wird als „low-affinity copper uptake transporter“ bezeichnet, da es eine geringere Affinität zu Kupfer aufweist als hCtr1. Studien von Bertinato et al. zufolge beträgt der K_m -Wert für hCtr2 ca. 6-11 μM (Bertinato et al. 2008). Auffällig ist

die hohe Strukturhomologie zwischen den beiden Transportern: auch hCtr2 besitzt drei TMH und eine intrazelluläre Schleife zwischen der ersten und zweiten Helix sowie das konservierte MXXXM-Motiv an Position 111-115 in der zweiten TMH (vgl. Abb. 1-7). Mutationsstudien lassen vermuten, dass letzteres auch bei hCtr2 für den Kupfertransport essentiell ist (Abada und Howell 2010; v.d.Berghe et al. 2007). Auch bei hCtr2 befindet sich der N-Terminus extrazellulär, während der C-terminale Teil im Zytoplasma lokalisiert ist. Sowohl der N- als auch der C-Terminus sind jedoch kürzer als bei hCtr1 (Abada und Howell 2010). Außerdem ist hCtr2 nicht glycosyliert (v.d.Berghe und Klomp 2010). hCtr2 fehlen die N-terminalen Histidin-reichen Abschnitte und "Mets-motifs" von hCtr1, mit Ausnahme von zwei Methioninresten, die den Methioninen in Position 43 und 45 im ⁴⁰MMMMPM⁴⁵ – Motiv von hCtr1 entsprechen und hier ein ¹MXM³-Motiv bilden. Vermutlich ist dieses Motiv ebenfalls am Kupfertransport beteiligt (Abada und Howell 2010; v.d.Berghe und Klomp 2010).

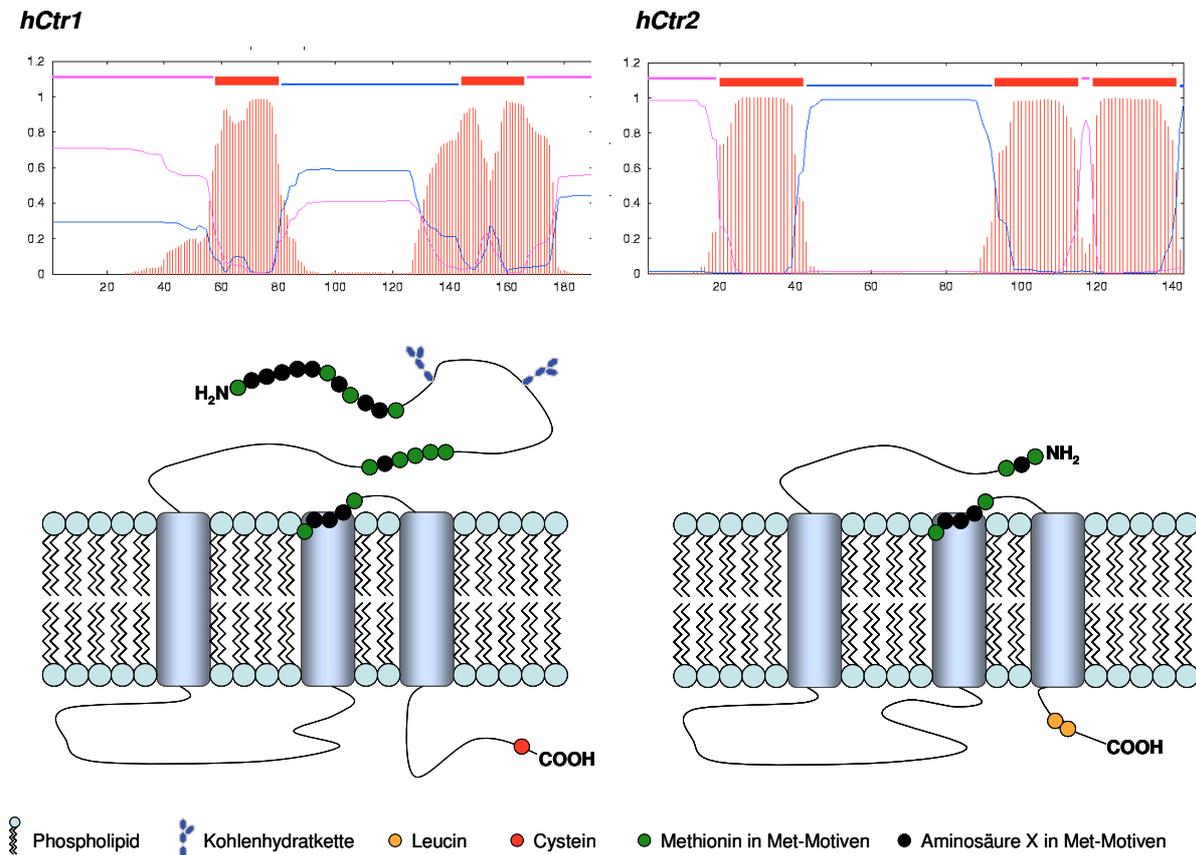


Abb. 1-7: Schematische Darstellung der Strukturen von hCtr1 (links) und hCtr2 (rechts)

Oben: Strukturvorhersage (Center of Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark DTU, Lyngby/Dänemark; <http://www.cbs.dtu.dk>). Rot: Transmembranäre Domänen; pink: extrazellulär; blau: intrazellulär; aufgetragen ist die Lagewahrscheinlichkeit (y-Achse) gegen die Aminosäuresequenz vom N-Terminus zum C-Terminus (x-Achse). Für hCtr1 stimmt die Vorhersage für den C-Terminus und die Schleife zwischen der zweiten und dritten TMH nicht eindeutig mit den in der Literatur dargestellten Modellen überein.

Unten: Schematische Darstellung modifiziert nach Abada und Howell 2010 und v.d.Berghe und Klomp 2010. Hervorgehoben sind Aminosäuren mit besonderer funktioneller Bedeutung.

Für den Transport von Kupfer ist im hCtr1-Molekül nur das vorletzte Methionin dieses Motivs unerlässlich, welches auch in hCtr2 zu finden ist. Der restliche Teil begünstigt allerdings zusätzlich den Transport. Da er in hCtr2 fehlt, ist dies möglicherweise eine Ursache für dessen im Vergleich zu hCtr1 geringere Affinität zu Kupfer (v.d.Berghe und Klomp 2010; Puig et al. 2002). Der am mutmaßlichen „Gating“ beteiligte Cysteinrest an der vorletzten Position im C-Terminus von hCtr1 fehlt im hCtr2-Protein ebenfalls (Abada und Howell 2010).

Auch für hCtr2 wurden oligomere Formen (Di- und Trimere) nachgewiesen. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit zu hCtr1 wird eine Bildung von Homotrimeren mit Pore auch bei hCtr2 vermutet (v.d.Berghe et al. 2007).

In Säugerzellen befindet sich der Hauptanteil der Ctr2-Moleküle in den Membranen von Lysosomen und späten Endosomen und nur ein geringer Anteil in der Zytoplasmamembran (v.d.Berghe et al. 2007; Bertinato et al. 2008). In einer Studie wurde hCtr2 in Vesikeln z.T. auch co-lokalisiert mit hCtr1 gefunden, jedoch sind die funktionellen Zusammenhänge hierzu noch unklar (v.d.Berghe et al. 2007). Da man zunächst in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt hatte, dass yCtr2p – das orthologe Hefeprotein zu hCtr2 – in Membranen von Vakuolen lokalisiert ist und Kupfer aus diesen bei Bedarf ins Zytosol transportieren kann (Rees et al. 2004; Portnoy et al. 2001), liegt die Vermutung nahe, dass Ctr2 auch beim Säuger Kupfer aus vesikulären intrazellulären Speichern in das Zytoplasma freisetzt. Damit könnte Ctr2 am Kupfer-Uptake beteiligt sein, indem es extrazelluläres Kupfer nach Endozytose und Anreicherung in Vesikeln aus diesen mobilisiert. Auch Kupfer aus Cuproenzymen könnte nach deren lysosomalem Abbau von Ctr2 wieder in das Zytosol transportiert, also sozusagen „recycled“ werden (v.d.Berghe et al. 2007). Hierfür spricht das gemeinsame Vorkommen von Ctr2 und lysosomalen Markern in Vesikeln (Gybina und Prohaska 2006). Der durch Ctr2 bewerkstelligte Cu-Uptake tritt nach Beobachtungen von van den Berghe et al. jedoch nur bei hohen extrazellulären Kupferkonzentrationen auf. Allerdings ist derzeit noch nicht endgültig geklärt, ob Ctr2 in Säugerzellen tatsächlich Kupfer aus Endosomen und Lysosomen exportieren kann (Abada und Howell 2010). Bertinato et al. postulieren dagegen, dass der in der Zytoplasmamembran lokalisierte Teil des Ctr2-Pools ähnlich wie Ctr1 an der Zelloberfläche Kupfer in die Zelle einschleusen kann. So könnte Ctr2 in seiner Rolle als „low affinity copper transporter“ bei Auftreten von sehr hohen extrazellulären Kupferkonzentrationen an die Stelle von Ctr1 treten, der unter solchen Bedingungen internalisiert und degradiert wird (Bertinato et al. 2008; Petris et al. 2003). Denkbar ist auch, dass intrazelluläre Ctr2-Moleküle nur einen Pool darstellen, der bei Bedarf zur Zytoplasmamembran rekrutiert wird und erst dort seine Funktion ausübt (Gybina und Prohaska 2006).

Erst kürzlich ist hCtr2 in der humanen Ovarialkarzinomzelllinie 2008 auch im Zellkern lokalisiert gefunden worden (Blair et al 2010). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass hCtr2 im

Kern an Membranen gebunden vorliegt und hier seine Funktion als Kupfertransporter ausüben kann. Es besitzt keine evidenten Signalpeptide für einen Transport zum Nucleus oder DNA-bindende Motive, so dass eine Interaktion mit weiteren Proteinen als Mechanismus für die Translokation in den Kern angenommen wird (Abada und Howell 2010). Interessanterweise wurde auch für andere membranständige Proteine eine Translokation in den Zellkern berichtet: für das an der Zelloberfläche vorkommende Glycoprotein CD44 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und den epidermal growth factor receptor (EGF-R) (Liao and Carpenter 2007; Lee et al. 2009). Diese beiden Moleküle besitzen jedoch zellkern-assoziierte Peptidsequenzen: CD44 enthält ein nukleäres Signalpeptid („nuclear localization signal“ = NLS) (Lee et al. 2009) und EGF-R bindet an Promotoren in der DNA (Liao and Carpenter 2007). Der Mechanismus des Transports von hCtr2 in den Zellkern und seine dort ausgeübte Funktion bedürfen weiterer Aufklärung.

1.6.1.2 ATP7A und ATP7B

Für die Entfernung von Kupfer aus dem Zytoplasma und schließlich auch aus der Zelle sind die homologen, ATP-abhängigen Transporter ATP7A und ATP7B verantwortlich. Auch sie transportieren Kupfer in Form von Cu(I). Es handelt sich um Membranproteine mit acht TMH und sechs Bindestellen für Kupfer. Die ATP-Bindungsstelle befindet sich zwischen der sechsten und siebten TMH. ATP7A ist im Gegensatz zu ATP7B glycosyliert (Gupta und Lutsenko 2009). Die beiden Transporter werden gewebeabhängig unterschiedlich exprimiert. So besitzt die Leber beispielsweise nur ATP7B, wohingegen das Kleinhirn beide Transporter bildet (Gupta und Lutsenko 2009).

Da beide Transporter nicht ständig in der Zytoplasmamembran lokalisiert sind, unterliegt der Kupferefflux wahrscheinlich einem indirekten Mechanismus (Nyasae et al. 2007; Pase et al. 2004). Vermutlich transportieren ATP7A und ATP7B Kupfer zunächst aus dem Zytosol in Vesikel, durch deren Verschmelzung mit der Zytoplasmamembran Kupfer schließlich aus der Zelle geschleust wird. Trotz der Vergleichbarkeit der beiden Transporter erfüllen ATP7A und ATP7B unterschiedliche Aufgaben: so vermittelt ersterer die Abgabe von Kupfer an das Blut, von wo aus es zu weiteren Bestimmungsorten im Organismus gelangt, während ATP7B eher für die Exkretion von Kupfer verantwortlich ist, wie z.B. die Abgabe in die Muttermilch oder in die Galle zur terminalen Ausscheidung (Gupta und Lutsenko 2009; Michalczyk et al. 2008). Vermutlich wird die Lokalisation dieser ATPasen in der Zelle durch die Kupferkonzentration gesteuert. Unter Basalbedingungen befinden sie sich hauptsächlich im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und erhalten Kupfer von dem Kupferchaperon HAH1 (Gupta und Lutsenko 2009; Walker et al. 2004). Bei erhöhten Kupferkonzentrationen in der Zelle kommt es dagegen zu einer Translokation von ATP7A in Vesikel, die sich in unmittelbarer Nähe zur

basolateralen Membran befinden. So könnte das überschüssige Kupfer ins Blut abgegeben werden. ATP7B dagegen wandert in Richtung der apikalen Membran, um Kupfer dort zu sezernieren (Monty et al. 2005; Roelofsen et al. 2000). Diese Verschiebung von ATP7B kann jedoch nicht in allen Gewebetypen festgestellt werden. Man vermutet daher, dass ATP7B in solchen Geweben, wie z.B. der Niere, eher eine Rolle bei der Sequestrierung und Speicherung von Kupfer spielt als beim Efflux (Gupta und Lutsenko 2009; Barnes et al. 2009). Die Aufgaben der beiden ATPasen außerhalb des TGN sind also sehr unterschiedlich. Befinden sich die zuvor erhöhten Kupferlevel wieder im Normalbereich, so wandern ATP7A und ATP7B wieder zum TGN. Hieran ist eine Dileucin- (ATP7A) bzw. Trileucinsequenz (ATP7B) im C-Terminus beteiligt (Francis et al. 1999; Petris et al. 1998; Petris und Mercer 1999; Cobbold et al. 2003). Im TGN sind beide ATPasen an der Synthese von Cuproenzymen beteiligt und können sich bezüglich dieser Funktion vermutlich gegenseitig ersetzen (Barnes et al. 2009). Die Kupfer-ATPasen sind mit zwei erblich bedingten Erkrankungen assoziiert. Bei dem X-chromosomal vererbten *Menkes-Syndrom* liegt eine Mutation im Gen für ATP7A vor (v.d.Berghe und Klomp 2010). Es kommt zu Störungen bei der Abgabe von Kupfer aus den Enterozyten an das Blut sowie bei der Kupferaufnahme in das Gehirn. Symptome sind u.a. Pigmentierungsstörungen, Minderwuchs, psychomotorische Entwicklungsstörungen sowie Bindegewebsabnormalitäten. Es kommt bereits im ersten bis zweiten Lebensjahr zum Tod (Gupta und Lutsenko 2009; Pschyrembel/259. Auflage 2002).

Der *Morbus Wilson* hingegen geht auf einen Gendefekt von ATP7B zurück, der autosomal rezessiv vererbt wird. Durch die Inaktivierung von ATP7B kommt es zu einer verminderten biliären Kupferausscheidung und verringertem Einbau von Kupfer in Caeruloplasmin. Die Folge ist eine starke Erhöhung der intrazellulären Kupferkonzentration in verschiedenen Organen wie der Leber, dem zentralen Nervensystem und den Augen. Zu den Symptomen gehören Leberzirrhose, neurologische Störungen und Hämolyse. Die Erkrankung wird mit Kupfer-chelatierenden Substanzen wie D-Penicillamin behandelt (Das und Ray 2006; v.d.Berghe und Klomp 2010; Pschyrembel/259. Auflage 2002; Silbernagl und Lang 1998).

1.6.1.3 Posttranslationale Regulation der Kupfertransporter

Säugetiere zeigen auf Transkriptionsebene kaum eine Regulation der primär an der Kupferhomöostase beteiligten Gene (Muller et al. 2007). Daraus wird geschlossen, dass die Regulation hier hauptsächlich posttranslational stattfindet (v.d.Berghe und Klomp 2010). Kupfer beeinflusst wie bereits in Abschnitt 1.6.1.1 beschrieben die intrazelluläre Lokalisation von hCtr1. Die schnelle Internalisierung und Degradation von hCtr1 aus der Zytoplasmamembran bei hohen extrazellulären Kupferkonzentrationen ist von den Methioninmotiven im

N-Terminus abhängig und dient wahrscheinlich dem Schutz der Zelle vor exzessiver Kupferaufnahme (Petris et al. 2003; Guo et al. 2004). Dagegen wird die endo- und lysosomale Lokalisation von hCtr2 nicht von der extrazellulären Kupferkonzentration beeinflusst (v.d.Berghe et al. 2007). Auch der Transport der Cu-ATPasen vom TGN zur Zytoplasmamembran oder Post-Golgi-Vesikeln und zurück zum TGN ist wie in Abschnitt 1.6.1.2. bereits beschrieben kupferabhängig. Interessant ist, dass im hCtr2-Molekül im C-Terminus ebenfalls eine Dileucinsequenz zu finden ist, die bei ATP7A die Relokalisation zum TGN steuert. Vermutlich wird dadurch die Neigung zur Internalisierung verstärkt, so dass hCtr2 nur vorübergehend in der Zytoplasmamembran lokalisiert ist und schnell wieder internalisiert wird. Welche Bedeutung dieses Dileucinmotiv für die subzelluläre Lokalisation hat, ist derzeit allerdings noch nicht geklärt (v.d.Berghe und Klomp 2010).

Neben Kupfer können in Abhängigkeit vom Gewebe auch andere Substanzen wie beispielsweise Neurotransmitter oder Hormone Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation der Cu-ATPasen nehmen. Der Kupfertransport wird weiterhin durch Wechselwirkung der Transporter mit den intrazellulären Kupferchaperonen sowie bei den Cu-ATPasen durch den Phosphorylierungsstatus reguliert (v.d.Berghe und Klomp 2010).

Seit einiger Zeit beschäftigt der Zusammenhang zwischen Kupfertransportern und zytostatischen Platinkomplexen die Wissenschaft. So ist bekannt, dass auch cDDP eine Internalisierung und Degradation von hCtr1 bewirken kann (Holzer et al. 2004), und dass eine erhöhte Expression von ATP7A und ATP7B in manchen Zellen mit einer verminderten cDDP-Sensitivität korreliert (Safaei et al. 2008; Samimi et al. 2003). Außerdem wurde in HEK293-Zellen beobachtet, dass hCtr1 nach Behandlung mit cDDP in Form von DTT-stabilen Trimeren auftrat, während eine Kupferbehandlung zur Bildung von Dimeren führte (Guo et al. 2004).

1.6.2 Kupfertransporter und Platinkomplexe

Die Existenz eines Zusammenhangs zwischen Kupfertransportern und einer Resistenz gegen zytotoxische Platinkomplexe wurde Anfang dieses Jahrtausends beschrieben (Ishida et al. 2002; Katano et al. 2002). Zelllinien aus humanen Ovarialkarzinomen, die eine Resistenz gegen Cisplatin aufwiesen, zeigten eine Kreuzresistenz gegen hohe Kupferkonzentrationen und umgekehrt (Katano et al. 2002). Dies war Grund zu der Annahme, dass Kupfertransporter Platinkomplexe transportieren können. Weitere Untersuchungen in den folgenden Jahren kamen bezüglich der Rolle von Ctr1 als potentiell „Platin-Uptaketransporter“ zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen.

So fanden Ishida und Kollegen, dass die Deletion des entsprechenden hCtr1-Orthologen in

Hefe (γ Ctr1) zu einer im Vergleich zu Wildtypzellen um 50% verminderten Cisplatinakkumulation und zu einer erhöhten Cisplatinresistenz führte. Bei gleichzeitiger Inkubation mit cDDP und Kupfer verminderten die beiden Substanzen gegenseitig ihren Uptake. Auch in embryonalen Mäusezellen bewirkte die Deletion beider Allele des murinen Ctr1-Gens eine achtfach erhöhte Resistenz gegen cDDP (Ishida et al. 2002). In einer anderen Studie verursachte der Verlust von Ctr1 in *Saccharomyces cerevisiae* eine geringere Zunahme der Resistenz und einen um nur 10-15% verminderten Cisplatin-Uptake (Sinani et al. 2007).

Die Überexpression von hCtr1 in modifizierten HEK293-Zellen führte bei Rabik und Kollegen dagegen zu *keiner* signifikanten Veränderung der Cisplatinsensitivität (Rabik et al. 2009). Auch Beretta et al. fanden nach Überexpression von hCtr1 in humanen Zervixkarzinomzellen *keine* Veränderungen des cDDP-Uptake oder der Zytotoxizität (Beretta et al. 2004).

In der dieser Arbeit vorausgegangenen Diplomarbeit von Christina Stratenschulte und Experimenten von Zisowsky et al. wurden Pärchen aus sensitiven und resistenten humanen Tumorzellen hinsichtlich ihrer hCtr1-Expression auf Transkriptionsebene untersucht. Dabei wurde für die Ovarialkarzinomzelllinie A2780 eine etwa zweifach *geringere* hCtr1-Expression in der cisplatinresistenten Sublinie A2780cis im Vergleich zur sensitiven Mutterzelllinie festgestellt (Stratenschulte 2005; Zisowsky et al. 2007). Dieser Unterschied konnte z.T. durch Behandlung mit cDDP (Faktor 4,5) oder L-OHP (Faktor 3) noch verstärkt werden (Stratenschulte 2005; Kassack und Stratenschulte 2005). Auch in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa zeigte die cisplatinresistente Sublinie HeLaCK sowohl mit als auch ohne cDDP-Behandlung etwa zweifach geringere hCtr1-Expressionen (Zisowsky et al. 2007). Es ist wahrscheinlich, dass die ebenfalls in den resistenten Sublinien dieser beiden Tumorzellpärchen gefundenen, verminderten Werte für cDDP-Uptake und DNA-Platinierung mit der geringeren hCtr1-Expression in Zusammenhang stehen und zur Cisplatinresistenz beigetragen haben (Zisowsky et al. 2007). In anderen Tumorzellpärchen waren dagegen *keine* nennenswerten Unterschiede festzustellen (Stratenschulte 2005). So scheint eine verminderte hCtr1-Expression ein möglicher, aber nicht generell auftretender Resistenzmechanismus zu sein.

Wie cDDP möglicherweise über hCtr1 in die Zelle gelangt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Beobachtungen von Larson et al. an murinem Ctr1 zufolge, bewirkt eine Behandlung mit cDDP eine rasche, wahrscheinlich durch Proteasomen vermittelte Degradation von Ctr1, was die Autoren zu der Annahme führte, dass Ctr1 eine Rolle in der Anfangsphase des cDDP-Uptake spielt. Für CBDCA und L-OHP wird dies ebenfalls vermutet (Larson et al. 2009). Möglicherweise bindet cDDP extrazellulär an den N-Terminus von Ctr1, gelangt durch Endozytose des cDDP-Ctr1-Komplexes in die Zelle und wird dort lysosomal wieder freigesetzt (Gupta und Lutsenko 2009). In der Studie von Sinani et al. wurde beobachtet,

dass eine Mutante des γ Ctr1, die nicht mehr zum Kupfertransport befähigt ist, zu geringfügig aber signifikant höheren intrazellulären cDDP-Konzentrationen führt als in Zellen mit γ Ctr1-Deletion. Außerdem wiesen die Zellen mit der γ Ctr1-Mutante ähnliche intrazelluläre cDDP-Konzentrationen auf wie Zellen mit Wildtyp- γ Ctr1. Die hier vorliegende Mutation hatte also für den Kupfer- nicht jedoch für den cDDP-Transport eine Bedeutung. Dies und die nur geringfügigen Änderungen des cDDP-Uptake legen nahe, dass hCtr1 möglicherweise doch nur eine untergeordnete Rolle für den cDDP-Transport spielt.

Von besonderer Bedeutung scheinen für den cDDP-Uptake die Met-Motive im N-Terminus zu sein (Sinani et al. 2007). Hieraus kann man die Theorie ableiten, dass cDDP am N-Terminus von Ctr1 bindet, wobei die Fähigkeit zum Kupfertransport hiervon unberührt bleibt. Cisplatin könnte dann bei der durch Kupfer verursachten Endozytose von Ctr1 mit in die Zelle geschleust werden (Gupta und Lutsenko 2009). Andere Autoren mutmaßen, dass die Pore im Ctr1-Trimer, deren Durchmesser für die Passage von Platinkomplexen eigentlich zu klein ist, eine gewisse „Dehnbarkeit“ besitzt. Die Komplexe könnten daher möglicherweise dennoch über diese Pore die Zytoplasmamembran passieren, zumal die Affinität von cDDP zum Schwefelatom in Methioninresten der von Cu(I) ähnlich ist (Howell et al. 2010). Gegen die letztere Theorie sprechen allerdings Untersuchungen, die eine im Vergleich zum Uptake nur recht langsame Wechselwirkung zwischen cDDP und Methionin ergaben. Außerdem wurde vom Verlust der beiden Amminliganden von cDDP berichtet, wenn das Molekül mit Methionin-reichen Sequenzen reagiert (Arnesano et al. 2007; Boal und Rosenzweig 2009). Dies spricht eher für unterschiedliche Aufnahmemechanismen für Kupfer und Platinkomplexe durch Ctr1.

In cDDP-resistenten Zellen sind sowohl eine verminderte Ctr1- als auch eine erhöhte ATP7A-Expression festgestellt worden. Beides würde zu einer Kupferdefizienz in den Zellen führen (Gupta und Lutsenko 2009). Tatsächlich fand man in cDDP-resistenten Zellen im Vergleich zu sensitiven Zellen desselben Ursprungs verminderte basale Kupferlevel (Katano et al. 2002). Jedoch gibt es im Widerspruch dazu auch Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen cDDP-Resistenz und *erhöhten* intrazellulären Kupferkonzentrationen (Leonhardt et al. 2009).

Auch die Rolle von Kupfer-ATPasen bei der Resistenz gegen Cisplatin ist noch nicht eindeutig geklärt. Zunächst stieß man auf eine erhöhte ATP7B-Expression in cisplatinresistenten Tumorzellen im Vergleich zur Mutterzelllinie, was eine Beteiligung dieses Transporters an der Cisplatinresistenz vermuten lässt (Komatsu et al. 2000). Hierfür spricht auch eine Untersuchung von Mangala et al. mit knock-down-Experimenten, bei welchen die Verminderung der ATP7B-Expression durch siRNA zu einer erhöhten cDDP-Sensitivität in humanen, cDDP-resistenten Ovarialkarzinomzellen führte. Analog fand man im in-vivo-Maus-Modell mit diesen ATP7B-knock-down-Zellen eine deutliche Reduktion der

Tumorgröße nach Cisplatinbehandlung. Dagegen führte der Knock-down von ATP7A in Ovarialkarzinomzellen zu *keiner* signifikanten Änderung der cDDP-Sensitivität (Mangala et al. 2009). Im Widerspruch dazu gibt es aber auch Untersuchungen, die sehr wohl einen Beitrag von ATP7A zur cDDP-Resistenz vermuten lassen (Samimi et al. 2003; Samimi et al. 2004).

Der Mechanismus für die durch Kupfer-ATPasen verursachte Platinresistenz könnte in einer gesteigerten Ausschleusung der Komplexe aus der Zelle begründet sein. Da eine erhöhte ATP7B-Expression jedoch nicht immer auch zu einer verminderten intrazellulären cDDP-Konzentration führt, ist auch eine Verschiebung von cDDP durch Kupfer-ATPasen in intrazelluläre Vesikel als Resistenzmechanismus denkbar (Gupta und Lutsenko 2009). Dies lässt auch eine Studie von Kalayda et al. vermuten, in welcher in A2780cis-Zellen sowohl für ATP7A als auch für ATP7B eine im Vergleich zur sensitiven Mutterzelllinie veränderte intrazelluläre Lokalisation gefunden wurde. Dies könnte möglicherweise zu einer Abschirmung von Cisplatin von seinen pharmakologischen Zielstrukturen führen (Kalayda et al. 2008).

Auch wenn für cDDP bekannt ist, dass es an die N-terminale Kupferbindungsstelle von ATP7B binden kann (Mangala et al. 2009), so ist ein vergleichbarer Transportmechanismus für Kupfer und cDDP unwahrscheinlich, da Kupfer bei seinem Transport über ATP7B nicht durch cDDP verdrängt wird (Leonhardt et al. 2009). Sehr wahrscheinlich ist allerdings, dass cDDP die Phosphorylierung von ATP7B induzieren kann, was die Konformation des Proteins beeinflusst und für seine Transporterfunktion wichtig ist (Gupta und Lutsenko 2009; Leonhardt et al. 2009; Safaei et al. 2008). In der Arbeit von Mangala et al. führte eine Überexpression des N-Terminus von ATP7B allein bereits zu einer Erhöhung der cDDP-Toleranz, jedoch konnte diese durch Überexpression des gesamten Proteins noch gesteigert werden (Gupta und Lutsenko 2009; Mangala et al. 2009). Der N-terminale Teil von ATP7B spielt also offensichtlich eine Rolle, ist aber für die erhöhte cDDP-Resistenz nicht allein verantwortlich.

Doch auch für die Kupfer-ATPasen ist die Datenlage widersprüchlich. So fanden Leonhardt et al. in primären Hepatocyten bei hohen Cisplatinkonzentrationen eine höhere Überlebensrate in Zellen mit mangelnder ATP7B-Expression als in Kontrollzellen (Leonhardt et al. 2009). Möglicherweise führte hier die fehlende ATP7B-Aktivität zu erhöhten intrazellulären Kupferkonzentrationen, die ihrerseits eine Reihe von physiologischen Veränderungen in der Zelle hervorrufen, welche die Cisplatinwirkung vermindern können. Dazu gehören z.B. eine starke Erhöhung der Konzentration an Metallothioneinen und eine veränderte DNA-Reparatur (Huster et al. 2007). In der Diplomarbeit von Christina Stratenschulte traten ohne Behandlung keine deutlichen Unterschiede der ATP7A-Expression zwischen sensitiven und resistenten Zellen der jeweiligen untersuchten

Zellpärchen auf. Nach der Behandlung mit Cisplatin konnten für die verschiedenen Zelltypen teils höhere, teils aber auch niedrigere Expressionen im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden. ATP7B war sowohl mit als auch ohne Platinbehandlung je nach Zelltyp teils in sensitiven, teils aber auch in resistenten Sublinien stärker exprimiert (Stratenschulte 2005). Auch in nachfolgenden Experimenten zeigte sich kein einheitliches Muster in den Expressionsunterschieden für die Kupfer-ATPasen zwischen sensitiven und cisplatinresistenten Sublinien verschiedener Tumorzellpärchen. Außerdem wiesen diese Zellen keine Unterschiede des cDDP-Efflux zwischen den jeweiligen Subtypen auf (Zisowsky et al. 2007).

Im Rahmen der Diplomarbeit von Christina Stratenschulte ergaben RT-qPCR-Experimente einen interessanten Hinweis auf eine mögliche Wechselwirkung von hCtr2 und Platinkomplexen. In den beiden Zellpärchen A2780/A2780cis und HCT8/HCT8ox (Ileumkarzinomzelllinie und oxaliplatin-resistente Sublinie) war die basale hCtr2-Expression zwischen sensibler und resistenter Zelllinie etwa gleich, jedoch konnte durch Behandlung mit Platinkomplexen eine deutliche Steigerung der Menge an hCtr2-mRNA festgestellt werden (Tab. 1-2). Dieser Effekt trat bei sensitiven A2780-Zellen sowohl nach Behandlung mit cDDP als auch mit L-OHP auf, bei A2780cis-Zellen jedoch nur nach Inkubation mit L-OHP und zwar deutlich weniger stark ausgeprägt als in den sensitiven Zellen. Bei HCT8 und HCT8ox trat nach cDDP- sowie nach L-OHP-Behandlung ebenfalls eine Expressionssteigerung von hCtr2 auf, die hier bei beiden Zellsubtypen vergleichbar stark war (Stratenschulte 2005; Kassack und Stratenschulte 2005).

| Fold-Change-Werte für hCtr2, behandelt vs. unbehandelt | | | | |
|--|-------|-----------|------|---------|
| Zelllinie | A2780 | A2780 cis | HCT8 | HCT8 ox |
| cDDP | 15,4 | 1,24 | 6,16 | 5,83 |
| L-OHP | 19,6 | 5,44 | 7,77 | 6,48 |

Tab. 1-2: Fold-Change-Werte der Expression von hCtr2 in sensitiven und cisplatinresistenten A2780-Zellen sowie sensitiven und oxaliplatinresistenten HCT8-Zellen (Stratenschulte 2005)

Erst in der jüngsten Vergangenheit wurden von Blair und Kollegen Untersuchungsergebnisse über den Einfluss von Ctr2 auf die Wirkung von Platinkomplexen veröffentlicht. Dabei wurde in murinen embryonalen Fibroblasten die Expression von mCtr2 durch lentivirale Transfektion mit shRNA herunterreguliert. Die Transfektion wurde außerdem auch mit einer Sublinie der Fibroblasten durchgeführt, die eine Deletion beider Allele des mCtr1-Gens aufwies. Die Verminderung der mCtr2-Expression führte zu einer etwa zwei- bis dreifachen *Erhöhung* der Sensitivität gegenüber Cisplatin im Vergleich zu den

entsprechenden Kontrollzellen. Dieser Effekt war vom Expressionsstatus von mCtr1 unabhängig. Für Carboplatin wurden ähnliche Effekte beobachtet. Der Verlust von mCtr1 allein führte in Zellen ohne mCtr2-knock-down zu einer leichten *Abnahme* der Sensitivität gegen cDDP und CBDCA. Ebenso verminderten sich der Gesamtzell-Uptake der beiden Substanzen sowie die DNA-Platinierung nach cDDP-Inkubation. Knock-down von mCtr2 führte in beiden Zelltypen zu einem ca. zwei- bis dreifachen Anstieg sowohl der Gesamtzellakkumulation von cDDP als auch der Platin-DNA-Adduktbildung (vgl. Abb. 1-8). Die Gesamtakkumulation von CBDCA erhöhte sich dagegen nur sehr geringfügig.

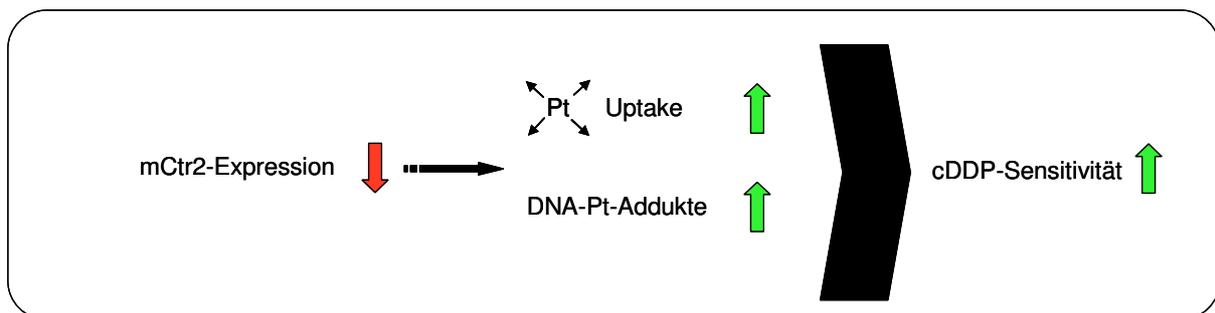


Abb. 1-8: Schematische Darstellung der von Blair et al. beobachteten Folgen eines mCtr2-knock-down in murinen embryonalen Fibroblasten (Blair et al. 2009)

Die Konzentration von cDDP in Vesikeln war unabhängig vom mCtr1- wie auch vom mCtr2-Expressionsstatus für alle Zelltypen gleich (Blair et al. 2009). Für ein in-vivo-Modell wurden Mäusen die mCtr1-deletierten Zellen mit oder ohne mCtr2-knock-down subkutan injiziert und wuchsen zu Tumoren heran. Die Verminderung der mCtr2-Expression führte zu einem verlangsamten Tumorwachstum, einer Abnahme der Proliferationsrate, einem Anstieg der apoptotischen Zellen und einer leicht verminderten Gefäßdichte. Eine Stunde nach Behandlung mit cDDP war die Akkumulation in den mCtr2-knock-down Tumoren neunmal höher als in Tumoren mit normaler mCtr2-Expression. Die Effizienz der Therapie war nach einmaliger Applikation bei letzteren nur gering, bei mCtr2-knock-down Tumoren zeigte sich dagegen in behandelten Tieren ein deutlicher Rückgang der durchschnittlichen Tumorgroße innerhalb weniger Wochen und einige Tumoren verschwanden sogar gänzlich (Blair et al. 2011). In derselben Publikation wurden auch die Ergebnisse weiterer in vitro Experimente an den vier Sublinien der Mäusefibroblasten vorgestellt. Die Makropinocytose war in mCtr2-knock-down Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen ca. zweifach erhöht, die Exocytoserate war dagegen vom mCtr2-Expressionsstatus unabhängig. Die etwa dreifach höhere Gesamtzellakkumulation von cDDP in mCtr2-knock-down Zellen konnte durch die Makropinocytosehemmer Amilorid und Wortmannin gehemmt werden. Die Expression der GTPasen Rac1 und cdc42, die für eine funktionierende Makropinocytose notwendig sind,

war in mCtr2-knock-down Zellen nicht deutlich verändert, jedoch waren sie in diesen Zellen stärker phosphoryliert – und damit stärker aktiviert – als in Zellen mit normaler mCtr2-Expression. So lassen diese Daten vermuten, dass eine Verminderung der mCtr2-Expression die cDDP-Akkumulation in der Zelle durch Aktivierung der Makropinocytose steigert und dadurch die Sensitivität der Zellen gegen diesen Arzneistoff erhöht.

Auch für verschiedene humane Ovarialkarzinom-Zelllinien wurde von Blair und Kollegen eine Korrelation zwischen cDDP-Sensitivität und hCtr2-Expression auf Transkriptions- und Translationsebene gefunden. Auch hier war die Sensitivität der Zellen umso höher, je weniger hCtr2 exprimiert wurde (Blair et al. 2009). In weiteren Experimenten dieser Arbeitsgruppe wurde eine leichte (1,4-fache) Erhöhung der hCtr2-Expression nach Behandlung der humanen Ovarialkarzinomzelllinie 2008 mit cDDP beobachtet. Des Weiteren kam es zu einer etwa 1,6-fachen Verlängerung der Halbwertszeit des hCtr2-Proteins. Behandelte man die 2008-Zellen mit dem Kupferchelator BCS, welches in der Zelle zu einem Mangel an verfügbarem Kupfer führt, so verminderte sich die hCtr2-Proteinexpression deutlich um 90%. Dies ging einher mit einer etwa zweifach erhöhten Gesamtzellakkumulation von cDDP in der Zelle, sowie einem Anstieg der Sensitivität in derselben Größenordnung. Damit wurde der Zusammenhang zwischen einer verminderten Ctr2-Expression und einer erhöhten cDDP-Sensitivität aus den mCtr2-knock-down Experimenten an humanem Ctr2 bestätigt. Die 2008-Zellen wurden außerdem bezüglich ihrer intrazellulären Lokalisation von hCtr2 untersucht. Blair et al. kamen dabei zu der Erkenntnis, dass hCtr2 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern reichlich zu finden ist. Die im Kern auftretenden diskreten hCtr2-Foci waren über den ganzen Nucleus verteilt und nicht eindeutig mit Nucleoli assoziiert. Eine Lokalisation in der Kernmembran konnte nicht beobachtet werden. Eine Behandlung mit cDDP führte zu einer leichten Erhöhung der hCtr2-Expression im Zytoplasma wie auch im Nucleus, ohne jedoch eine Änderung der hCtr2-Lokalisation hervorzurufen (Blair et al. 2010).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie an humanen serösen Ovarialkarzinomen ergab signifikant erniedrigte mRNA-Level für hCtr1 und hCtr2 in Tumorproben im Vergleich zu gesundem Ovarialgewebe. Hohe hCtr1-Expressionen korrelierten bei Tumorpatientinnen mit erhöhter Sensitivität gegen eine Carboplatin beinhaltende Chemotherapie und längerem progressionsfreiem Überleben. Patientinnen mit hoher hCtr2-Expression zeigten tendenziell häufiger Therapieresistenzen, jedoch war dieser Zusammenhang nicht signifikant. Dagegen zeigte eine Gruppe von Patientinnen mit niedriger hCtr1-Expression bei gleichzeitig hoher hCtr2-Expression das schwächste Ansprechen auf die Chemotherapie und das kürzeste progressionsfreie Überleben (Lee et al. 2011).

Die in diesem Kapitel vorgestellten, teils kontroversen Ergebnisse zeigen, dass die Rolle von

Überexpression von hCtr2 im Zellsystem Flp-InTM T-RExTM-293 (Invitrogen) wurden insbesondere die Effekte dieses Transporters auf den Gesamtzell-Uptake von Cisplatin und die DNA-Platinierung sowie auf die Sensitivität gegen Cis- und Carboplatin untersucht. Eine hCtr1 überexprimierende Flp-InTM T-RExTM-293-Zelllinie sowie eine Leervektor-Kontrollzelllinie dienten als Vergleich.

Im zweiten Teil wurden Tumorzellpärchen aus sensitiven und cDDP-resistenten Sublinien sowie Gewebeproben aus Ovarialtumoren bzgl. ihrer Expression der vier Kupfertransporter und eines möglichen Zusammenhangs mit einer Platinresistenz untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien, Chemikalien und Medien

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien, sowie Nährmedien und deren Zusätze zusammengestellt.

| <i>Reagenz/Chemikalie</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|---|
| Albumin für EIA und RIA | AppliChem, Darmstadt |
| Alkalische Phosphatase (Calf Intestine) [10 U/ μ l] | Finnzymes, Espoo/Finnland |
| Ammoniumperoxodisulfat p.a. | MERCK KGaA, Darmstadt |
| Ampicillin Natriumsalz | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Ampuwa [®] (Aqua ad injectabilia) | Fresenius Medical Care, Hof a.d. Saale |
| Aprotinin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Biozym Agarose, DNA > 500 bp | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf |
| Blasticidin S Hydrochlorid | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Blasticidin S Hydrochlorid-Lösung [10 mg/ml] | InvivoGen, Toulouse/Frankreich |
| Broad Range DNA Mass Ladder | Marligen Biosciences, Ijamsville/USA |
| Bromphenolblau-Natriumsalz | ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt a. M. |
| BSA-Lösung [20 mg/ml] (PCR) | Fermentas, St. Leon Rot |
| BSA | AppliChem, Darmstadt |
| Carboplatin-ratiopharm [®] 10 mg/ml | Ratiopharm, Ulm |
| Cisplatin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Chlorpromazin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| D-(+)-Glucose Monohydrat | Fluka Biochemika, Buchs/Schweiz |
| Dimethylformamid AnalAR NORMAPUR | VWR [®] BDH PROLABO [®] , Darmstadt |
| Diethylpyrocarbonat | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Dimethylsulfoxid (DMSO), p.a. | VWR [®] BDH PROLABO [®] , Darmstadt |
| dNTP-Mix [10 mM] | Fermentas, St. Leon Rot |
| Doxo-cell [®] (Doxorubicin) | Cell pharm, Bad Vilbel |

| <i>Reagenz/Chemikalie</i> | <i>Hersteller</i> |
|--|--|
| Doxycyclin Hyclat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | PAN TM -Biotech GmbH, Aidenbach |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + GlutaMAX TM -I | GIBCO [®] /Invitrogen TM GmbH, Darmstadt |
| Eosin B (C.I. 45400) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Ethanol AnalAR NORMAPUR | VWR [®] BDH PROLABO [®] , Darmstadt |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | ICN Biomedicals GmbH, Frankfurt a. M. |
| EGS | Thermo Fisher Scientific Inc. , Waltham/USA |
| Formaldehydlösung 37%, pa. stabilisiert mit ca. 10% Methanol | KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar |
| Fötale Kälberserum | PAN TM -Biotech GmbH, Aidenbach |
| Fötale Kälberserum | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| GeneRuler TM , DNA-Leiter 50 bp 100 bp | Fermentas, St. Leon Rot |
| Gelladepuffer: Loading Dye 6x Loading Dye 6x + SDS Loading Dye 2x | Fermentas, St. Leon Rot |
| Glycerol wasserfrei, p.a. | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Glycin, p.a. | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| HindIII | Fermentas, St. Leon Rot |
| Hefeextrakt | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Hygromycin B | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Hygromycin B-Lösung [100 mg/ml] | InvivoGen, Toulouse/Frankreich |
| imMEdia TM Amp Blue | Invitrogen TM /Life-Technologies GmbH, Darmstadt |
| Interner Standard ICP-MS: Indium Standard ICP-049 Iridium Standard ICP-077 Rhodium Standard ICP-045 | Ultra Scientific (N. Kingstown/Rhode Island/USA) |
| Isopropanol, techn. | Abfüllung zentrales Chemikalienlager HHU |
| Isopropanol, p.a. | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Kaliumchlorid AnalAR NORMAPUR | VWR [®] BDH PROLABO [®] , Darmstadt |
| Kaliumdihydrogenphosphat, p.a. | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |

| <i>Reagenz/Chemikalie</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|--|
| Kristallviolett | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Kupfer(II)-Sulfat Pentahydrat | Fluka Biochemika, Buchs/Schweiz |
| LB-Agar-Tablets | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Leupeptin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| L-Glutamin [200 mM] | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent | Invitrogen™/Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Magnesiumchloridlösung [25 mM] (PCR) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| 2-Mercaptoethanol 99%, p.a. | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Methanol, techn. | Abfüllung zentrales Chemikalienlager HHU |
| Milchpulver Blotting Grade | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| MTT | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| HEPES, Pufferqualität | AppliChem, Darmstadt |
| TEMED | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Natriumacetat AnalAR NORMAPUR | VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt |
| Natriumazid 99% | ACROS ORGANICS/Thermo Fisher Scientific Inc. , Waltham/USA |
| Natriumchlorid AnalAR NORMAPUR | VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt |
| Natriumhydrogenphosphat NORMAPUR analytical reagent | VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt |
| Natriumhydroxid | Mallinckrodt Baker, Griesheim |
| Natriumorthovanadat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| NP-40 | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Oligo(dT) ₂₃ anchored Primer | Sigma, Saint Louis/USA |
| Oxaliplatin-GRY® 5 mg/ml | TEVA Deutschland GmbH, Radebeul |
| PageRuler™, vorgefärbte Protein | Fermentas, St. Leon Rot |
| PCR-Reaktionspuffer 10x mit (NH ₄) ₂ SO ₄ | Fermentas, St. Leon Rot |
| Penicillin-Streptomycin-Lösung [10'000 U/ml; 10 mg/ml] | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Poly-L-Lysin [0,1 mg/ml] | Biochrom AG, Berlin |
| Power SYBR®Green PCR Master Mix | Applied Biosystems, Warrington/UK |

| <i>Reagenz/Chemikalie</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|---|
| Quick T4 DNA-Ligase | NEW ENGLAND BioLabs®, Ipswich/USA |
| Quick-Ligation Reaktionspuffer 2x | NEW ENGLAND BioLabs®, Ipswich/USA |
| Reinstwasser (Aqua bidestillata) | Eigene Herstellung |
| Restriktionspuffer R | Fermentas, St. Leon Rot |
| RNase-Free DNase Set | QIAGEN, Hilden |
| RNase A, DNase- und Protease-frei [10 mg/ml] | Fermentas, St. Leon Rot |
| Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) + GlutaMAX™-I | GIBCO®/Invitrogen™ GmbH, Darmstadt |
| Rotiphorese® Gel 30 [37,5:1] | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Salzsäure 37% AnalaR NORMAPUR | VWR® BDH PROLABO®, Darmstadt |
| SDS Ultra pure | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Seakem® LE-Agarose | Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rutherford/USA |
| Spectinomycindihydrochlorid | AppliChem, Darmstadt |
| Steriles Reinstwasser | Bidestilliertes Wasser, autoklaviert |
| SybrGreen®II-Lösung | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Taq-Polymerase nativ mit BSA | Fermentas, St. Leon Rot |
| Taxotere® | Sanofi-Aventis, Frankfurt a.M. |
| T4 DNA-Ligase | Fermentas, St. Leon Rot |
| T4 DNA-Ligase-Puffer 10x | Fermentas, St. Leon Rot |
| TRI REAGENT™ | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Trizma® Base 99,9% (= Tris-Base) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Tris-HCl | AppliChem, Darmstadt |
| Triton X für ICP-MS | MERCK KGaA, Darmstadt |
| Triton X für Immunfluoreszenz | AppliChem, Darmstadt |
| Trypanblau | AppliChem, Darmstadt |
| Trypsin EDTA-Lösung 1x | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Trypton/Pepton | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| Tween® 20 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe |
| UltraCruz™ Mounting Medium | Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz/USA |

| <i>Reagenz/Chemikalie</i> | <i>Hersteller</i> |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Wasser für Injektionszwecke Ampuwa® | Fresenius Medical Care, Bad Homburg |
| X-Gal | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Xhol | Fermentas, St. Leon Rot |
| Zeocin™-Lösung [100 mg/ml] | InvivoGen, Toulouse/Frankreich |

Tab. 2-1: Verwendete Reagenzien, Chemikalien und Nährmedien

2.1.2 Kits

Nachfolgend sind Reagenzienkits oder daraus verwendete einzelne Bestandteile aufgeführt.

| <i>Kit/Kit-Bestandteil</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|---|
| ECL Plus Western Blotting Detection Reagent | Amersham Biosciences/GE-Healthcare Europe, Freiburg |
| High Capacity cDNA Archive Kit | Applied Biosystems, Warrington/UK |
| High Pure PCR Product Purification Kit | Roche Diagnostics GmbH, Penzberg |
| Lysispuffer No. 6 aus Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array Kit | R&D Systems, Minneapolis/USA |
| my-Budget DNA Mini Kit | Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld |
| my-Budget RNA Mini Kit | Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld |
| PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit und –Maxiprep Kit | Invitrogen™ GmbH, Darmstadt |
| QIAGEN Plasmid Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| Reagent A aus BCA™ Protein Assay | Thermo scientific Inc., Waltham/USA |
| Rehydration/Sample-Buffer aus ReadyPrep™ 2-D Starter Kit | Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA |
| RNase-Free DNase Set | Qiagen, Hilden |
| RNeasy® Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| Western Blotting Luminol Reagent | Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz/USA |

Tab. 2-2: Verwendete Reagenzienkits.

2.1.3 Antikörper

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper, sowie die für die jeweiligen Anwendungen verwendeten Verdünnungsfaktoren aufgelistet.

| <i>Name Primärantikörper</i> | <i>Hersteller</i> | <i>Anwendung</i> | <i>Verdünnung</i> |
|---|--|------------------|-------------------|
| Rabbit Anti-SLC31A2 (Anti-human Ctr2) | Abnova, Jhongli City/Taiwan | Westernblot | 1:1000 |
| | | Immunfluoreszenz | 1:50 |
| Mouse Anti- β -Actin (C4) | Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz/USA | Westernblot | 1:2000 |
| Goat Anti-PUMA α/β (D20) | Santa Cruz Biotechnology® Inc., Santa Cruz/USA | Westernblot | 1:200 |
| <i>Name Sekundärantikörper</i> | <i>Hersteller</i> | <i>Anwendung</i> | <i>Verdünnung</i> |
| Goat Anti-rabbit IgG-HRP | R&D Systems, Minneapolis/USA | Westernblot | 1:2000 |
| Goat Anti-rabbit IgG Fab 2-Alexa Fluor® 488 | Cell Signaling Technology Inc., Danvers/USA | Immunfluoreszenz | 1:1000 |
| Goat Anti-mouse IgG-HRP | R&D Systems, Minneapolis/USA | Westernblot | 1:2000 |

Tab. 2-3: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Die Auflistung enthält die für Zellkultur und Experimente verwendeten Verbrauchsmaterialien.

| <i>Material</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|--|
| Absolute QPCR-Seal Abdeckfolien | ABgene®/ Thermo Scientific, Epsom/UK |
| BD Discardit™ II Spritze 20 ml | Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes/USA |
| Biosphere® Pipettenspitzen mit Aerosolfilter 10 μ l 100 μ l 1000 μ l | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht |
| Chromatographie Filterpapier 3 mm | Whatman®, Dassel |
| CODAN Entnahmespike | CODAN Medizinische Geräte GmbH & Co. KG, Lensahn |
| Costar® STRIPETTE® 1 ml | Corning Inc., Corning/USA |
| Entsorgungsbeutel PP, Plastibrand® | Brand GmbH & Co KG, Wertheim |

| <i>Material</i> | <i>Hersteller</i> |
|--|---|
| Gel-Blottingpapiere | Whatman®, Dassel |
| Immobilon-P Transfer Membran; Porengröße 0,45 µm | Millipore, Billerica/USA |
| Kryoröhrchen Cryo Pure | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht |
| Lab-Tek® II Chambered Coverglass System | Nunc™, Rochester/USA |
| Omnifix® Spritze 10 ml | B. Braun Medical Inc., Sempach/Schweiz |
| Parafilm® | Pechiney Plastic Packaging, Chicago/USA |
| PCR-Reaktionsgefäße 8-Well-Streifen farblos Deckel ultraklar | Biozym, Hessisch Oldendorf |
| PCR-Reaktionsgefäße MicroAmp Tubes 0,2 ml | Applied Biosystems/Applera, Darmstadt |
| Präzisions-Dispenser-Tips, Plastibrand® 0,5 ml 1,25 ml 2,5 ml | Brand GmbH & Co KG, Wertheim |
| Petrischalen | Becton Dickinson GmbH, Franklin Lakes/USA |
| Pipettenspitzen 10 µl 200 µl 1000 µl 5 ml | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht |
| Pipettenspitzen mit Kapillare für Gelbeladung | VWR, Darmstadt |
| PP-Röhre 15 ml 50 ml | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht |
| Safe Seal Reaktionsgefäße 2 ml | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht |
| Star Frost® Objektträger | Knittel Gläser, Braunschweig |
| Sterile Einmalpipetten 10 ml | VWR, Darmstadt |
| Sterilfilter aus Celluloseacetat 0,2 µm | VWR, Darmstadt |

| <i>Material</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|---------------------------------------|
| Thermofast®96 PCR-Platten AB-0700 weiß AB-1100 klar | ABgene® / Thermo Scientific, Epsom/UK |
| Ultraklare Cap-Strips (Deckel für qPCR-Platten und -Streifen) | ABgene® / Thermo Scientific, Epsom/UK |
| Wasseraufbereiter Biocel Milli-Q | Millipore, Billerica/USA |
| Zellkultur Multi-Well-Platten 6-Well 24-Well 96-Well | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht |
| Zellkultur Multi-Well-Platten Costar®96-Well | Corning Inc., Corning/USA |

Tab. 2-4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.1.5 Primer

In der folgenden Tabelle sind die Sequenzen der in PCR-Experimenten (PCR = polymerase chain reaction) verwendeten Primer angegeben. Für die quantitative PCR (qPCR) sind Primer, die eine Exon-Exon-Schnittstelle überspannen, mit dem Suffix „span“ gekennzeichnet. In den Sequenzen der Primer für die Herstellung von Plasmiden zur hCtr-Überexpression sind die zusätzlichen Erkennungssequenzen für Restriktionsschnittstellen *kursiv* und die für die Kozak-Sequenz wichtigen Basen fett gedruckt. Das an die hCtr1-Sequenz angefügte Stop-Codon ist unterstrichen dargestellt.

| <i>Primer für qPCR</i> | | <i>Sequenz 5' → 3'</i> |
|------------------------|-----------|------------------------------|
| hCtr1* | left-span | AGCTGGAGAAATGGCTGGAG |
| | right | AGGTGAGGAAAGCTCAGCATC |
| hCtr1-spezifisch | left | ACTAGCAATGTTCTATGAAGGACTCAAG |
| | right | TTGCCCAACAGTTTTGTGTGTCTC |
| hCtr2* | left-span | ACAGTCCTGCTGGCATGG |
| | right | TTGGCAGGTTCCACCAGTACC |
| ATP7A* | left-span | ATGATGAGCTGTGTGGCTTG |
| | right | TGCCAACCTGAGAAGCAATAG |
| ATP7B* | left-span | AGTCCCTCATCACAGGAGAAG |
| | right | GAGCCATGTGCATTTATAGACC |
| | left-span | GCAGCTGAAGGTGTGGGATG |

| Primer für qPCR | | Sequenz 5' → 3' |
|-----------------|------------|---------------------------|
| | right | AATGATGCCACAGGCCAAC |
| HAH1 | left-span | AGCTTGGAGGAGTTAAGTATGAC |
| | right | GGCCAAGGTAGGAAACAGTC |
| huPO** | left-span | AGCTCTGGAGAACTGCTG |
| | right | CAGCAGCTGGCACCTTATTG |
| UBE2D2** | left-span | ACCACCTAAGGTTGCATTTAC |
| | right | TAGATCCGAGCAATCTCAGG |
| RPL13A** | left | GCTCATGAGGCTACGGAAAC |
| | right-span | TATTGGGCTCAGACCAGGAG |
| PhosA2** | left-span | GACAGCTTTTGTGAAGCCATTG |
| | right-span | TCCACAATGTCAAGTTGTCTCTCAG |
| GUSB** | left-span | TTCACCAGGATCCACCTCTG |
| | right | AGCACTCTCGTCGGTACTG |
| TBP*** | left-span | TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA |
| | right | CACATCACAGCTCCCCACCA |
| ACTB** | left-span | TCCTTCCTGGGCATGGAGT |
| | right | GCACTGTGTTGGCGTACAG |

Tab. 2-5: Sequenzen der in qPCR-Experimenten verwendeten Primer; * vgl. Diplomarbeit C. Straten-schulte (Bonn, 2005); ** vgl. Dissertationen E. Gosepath (Bonn, 2007) und S. Weykam (Bonn, 2007); *** vgl. Li et al. 2009

| Primer mit Schnittstellen | | Sequenz 5' → 3' |
|---------------------------|------------------------|------------------------------------|
| hCtr1-Schnittstelle | left HindIII | TGCGAAGCTTGTCACCATGGATCATTCCCACCAT |
| | right <i>Xho</i> +STOP | TCGCTCGAGGCTCAATGGCAATGCTCTGTG |
| hCtr2-Schnittstelle | left HindIII | TCTGAAGCTTGTCAGCATGGCGATGCATTTTCAT |
| | right <i>Xho</i> | CGCTCGAGGCAGACTAAGCTGTGCTGAGAAGTG |

Tab. 2-6: Sequenzen der für die hCtr-Überexpression verwendeten Primer.

2.1.6 Plasmide

Nachfolgend sind die Ausgangsplasmide, die Expressionsvektoren, sowie weitere für die hCtr-Überexpression verwendete Plasmide angegeben (vgl. Kap. 2.1.10 und 2.2.2).

| <i>Bezeichnung</i> | <i>NCBI-Accession-No.</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|---------------------------|--|
| pDNR-LIB mit cds von hCtr2 (MHS1011-7509802, Clone ID: 4731026) | BC026252 | Open Biosystems, Huntsville/USA |
| pDONR223 mit ORF von hCtr1 (OHS 1770-9377900, Clone ID: 666) | CV023681 | Open Biosystems, Huntsville/USA |
| pcDNA5/FRT/TO [®] | - | Invitrogen [™] /Life Technologies GmbH, Darmstadt |
| pCSFLPe | - | * |

Tab. 2-7: Plasmide für die gentechnische Herstellung der hCtr-Überexpressionsklone; * vgl. Werdien et al. 2001 und Thomas et al. 2004, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. G. Ryffel (Institut für Zellbiologie/Tumorforschung, Universitätsklinikum Essen) und Dr. H.-D. Royer (Stiftung caesar, Bonn/Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universität Düsseldorf); NCBI = National Center for Biotechnology Information. Die hCtr-Sequenzen der Plasmide entsprechen den in der NCBI-Datenbank unter den jeweiligen Accession-Numbers angegebenen.

2.1.7 Geräte

| <i>Gerät</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|---------------------------------------|
| ABI 7500 Real Time PCR System | Applied Biosystems, Warrington/UK |
| Autoclav Systec V-65 | Systec GmbH, Wettenberg |
| Blottingapparatur Trans-Blot [®] SD Semi-dry Transfer cell | Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA |
| C1000 [™] Thermal Cycler mit CFX96 [®] Real-Time-System | Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA |
| Feinwaage ABS 220-4 | Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern |
| Feinwaage BP 221S | Sartorius AG, Göttingen |
| Gefriertrocknungsanlage LYOVAC GT2 STERIS [®] | GEA Lyophil GmbH, Hürth |
| Geldetektionssystem Gel iX Imager | INTAS, Göttingen |
| Gelelektrophorese-Apparatur: Mini PROTEAN [®] -und Mini PROTEAN [®] -Tetra Cell | Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA |
| Gelelektrophoresekammer Bio-RAD MINI-SUB [®] CELL GT | Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA |
| Gelelektrophoresekammer Electrophoresis LABNET SUB SYSTEM 70 | Labnet International Inc., Edison/USA |
| Heizblock | Boekel Scientific, Feasterville/USA |

| <i>Gerät</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|--|
| Homogenisator ULTRA-TURRAX® | IKA-Werke GmbH & Co. KG/Staufen |
| Inkubator Haereus® Function-line | Heraeus®/Thermo Electron Corporation, Dreieich |
| Kugelmühle Dismembrator | B. Braun Melsungen AG/Melsungen |
| Laminar air flow Werkbank MSC- advantage | Thermo Scientific, Dreieich |
| Laminar air flow-Werkbank Hera Safe | Heraeus®/Thermo Electron Corporation, Dreieich |
| Magnetrührer IKA® RCT basic | IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen |
| Microplate-Reader Fluostar | bmg labtech, Offenburg |
| Mikrowelle Intellowave | LG Electronics GmbH, Willich |
| Motic® AE 20/21 Inverted Microscope | Motic Deutschland GmbH, Wetzlar |
| Neubauerzählkammer | LO-Laboroptik GmbH, Bad Homburg |
| Olympus FV1000 Confocal Laser scanning microscope | Olympus GmbH, Hamburg, Germany |
| Orbitalschüttler | Edmund Bühler GmbH, Hechingen |
| PCR-Cycler Mastercycler personal | Eppendorf, Hamburg |
| pH-Meter 713 | Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt |
| Präzisionsküvette Typ 105.204-QS | Hellma, Müllheim |
| qPCR-Cycler Opticon DNA Engine | MJ Research, Waltham/USA |
| Schüttler: Polymax 1040 | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach |
| PMR-30 | Grant, Shepreth/UK |
| Spannungsquellen: Power Pack 200 und 3000 Standard Power Pack P25 | Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA Biometra GmbH, Göttingen |
| Trockenschrank | Heraeus Instruments GmbH, Hanau |
| Ultraschallbad Sonorex Super RK514BH | Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin |
| UV-Betrachter TFX40M | Vilber-Lourmat, Eberhardzell |
| UV-Vis-Spektrometer Spectronic Genesys 10 Bio | Thermo Electron Corporation, Dreieich |
| Vakuumentrifuge Savant Speed Vac® SPD111V | Thermo Scientific, Dreieich |
| Varian 820-MS ICP Mass-spectrometer | Agilent Technologies, Santa Clara/USA |
| Waage SBA52 | SCALTEC Instruments GmbH, Göttingen |

| <i>Gerät</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|---------------------|
| Wasserbad mit Heizelement Julabo 19/ED | Julabo |
| Western Blot-Detektionssystem INTAS ChemiLux ECL Imager HR16 Pro | INTAS, Göttingen |
| Zentrifugen: Mikro 200R Mikro20 Rotina 420R | Hettich, Tuttlingen |
| Zentrifugiergefäße | Beckman, Brea/USA |

Tab. 2-8: Verwendete Gerätschaften und Zubehör.

2.1.8 Programme/Software

| <i>Programm</i> | <i>Hersteller</i> |
|-----------------------------|---|
| CFX Manager Software 1.5 | Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA |
| geNorm | http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/ |
| GraphPad Prism® 4.00 | GraphPad Software, San Diego/USA |
| ICP-MS Expert v2.1b107 | Agilent Technologies, Santa Clara/USA |
| INTAS ChemoStar | INTAS, Göttingen |
| Microsoft Office Excel 2003 | Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim |
| Microsoft Office Word 2003 | Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim |
| Olympus Fluoview FV1000 | Olympus Europa GmbH, Hamburg |
| Vector NTI® | Invitrogen™/Life Technologies GmbH, Darmstadt |

Tab. 2-9: Verwendete Auswertungs- und andere Computerprogramme.

2.1.9 Puffer und Lösungen

2.1.9.1 Zellkultur

Blasticidin S-Lösung [10 mg/ml]

25 mg Blasticidin S-Hydrochlorid wurden in 2,5 ml PBS 1x gelöst, steril filtriert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße à 300 µl aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren wurde aus Stabilitätsgründen vermieden.

Doxycyclin-Hyclat-Stammlösung [100 mg/ml Doxycyclin]

115,4 mg Doxycyclin-Hyclat wurden in 1 ml DMSO gelöst, in 1,5 ml Reaktionsgefäße à 30 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Doxycyclin-Hyclat-Arbeitslösung [1 mg/ml Doxycyclin]

Ein Aliquot der Stammlösung wurde auf das hundertfache Volumen mit PBS 1x verdünnt, steril filtriert, in 1,5 ml Reaktionsgefäße à 50 oder 100 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren wurde aus Stabilitätsgründen vermieden. Nach dem Auftauen wurde die Lösung für max. 48 h bei 4-8°C gelagert.

Eosinlösung 0,4% (w/V) für die Zellzahlbestimmung

40 mg Eosin wurden in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9% w/V) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4-8°C.

Hygromycin B-Lösung [100 mg/ml]

Pro ml Lösung wurden 100 mg Hygromycin B eingewogen, in PBS 1x gelöst, steril filtriert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße à 200 µl aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Induktionsnährmedium

Zur Induktion der Überexpression in Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen wurde in die Zellkulturflasche pro Milliliter Selektionsmedium II bzw. Nährmedium (für kürzere Zeiträume und während der Dauer von durchgeführten Assays) 1 µl Doxycyclin-Hyclat-Arbeitslösung zugesetzt (Endkonzentration von Doxycyclin: 1 µg/ml).

Nährmedium

DMEM bzw. RPMI 1640 wurden mit 10% FKS (ggf. hitzeinaktiviert durch einstündiges Erhitzen auf 56-60°C, vgl. Tabelle 2-10) oder 15% FKS (MDA-MB231-Zellen) sowie 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin versetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4-8°C. DMEM von Sigma wurde zusätzlich Glutamin zugesetzt (Endkonzentration 2,8 mM).

Selektionsnährmedium I für Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen

200 ml des mit Penicillin/Streptomycin und FKS versetzten DMEM wurden mit 300 µl Blasticidin S-Lösung (Endkonzentration: 15 µg/ml) und 200 µl Zeocinlösung (Endkonzentration: 100 µg/ml) versetzt; Lagerung bei 4-8°C, Verwendung von lichtgeschützten Flaschen.

Selektionsnährmedium II für Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen

200 ml des mit Penicillin/Streptomycin und FKS versetzten DMEM wurden mit 300 µl Blasticidin S-Lösung (Endkonzentration: 15 µg/ml) und 200 µl Hygromycin B-Lösung (Endkonzentration: 100 µg/ml) versetzt; Lagerung bei 4-8°C, Verwendung von lichtgeschützten Flaschen.

2.1.9.2 Bakterienkultur

Ampicillin-Lösung

Pro ml Lösung wurden 50 mg Ampicillin-Natriumsalz in Reinstwasser gelöst und steril filtriert; Lagerung bei -20°C.

Agarplatten

| | |
|-------------|-------|
| Trypton | 1 g |
| Hefeextrakt | 0,5 g |
| NaCl | 1 g |
| Agar | 0,7 g |

Die Substanzen wurden ad 100 ml in Reinstwasser gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Anschließend wurde die Lösung in Petrischalen gegossen und nach dem Erstarren mit Parafilm verschlossen; Lagerung bei 4-8°C.

Chloramphenicol-Lösung

Pro ml Lösung wurden 34 mg Chloramphenicol in absolutem Ethanol gelöst; Lagerung bei -20°C.

Glycerollösung [60%]

30,3 ml Glycerol wurden mit 19,7 ml Reinstwasser gemischt und steril filtriert; Lagerung bei 4-8°C.

imMedia™ Amp Blue Agarplatten

Der Inhalt eines Beutels imMedia™ Amp Blue wurde mit 200 ml Reinstwasser versetzt, in der Mikrowelle kurz aufgekocht, auf dem Magnetrührer gerührt und nochmals kurz ohne aufzukochen in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde weiter gerührt, bis eine klare Lösung entstanden war. Diese wurde in Petrischalen gegossen, nach dem Abkühlen mit Parafilm verschlossen und bei 4-8°C gelagert. Die imMedia™ Amp Blue-Mischung enthält Ampicillin als Selektionsantibiotikum (Endkonzentration: 100 µg/ml).

LB-Medium

| | |
|-------------|-------|
| Trypton | 5 g |
| Hefeextrakt | 2,5 g |
| NaCl | 5 g |

Die Substanzen wurden ad 500 ml in Reinstwasser gelöst und das Medium autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde das entsprechende Selektionsantibiotikum zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4-8°C.

SOC-Medium

| | |
|-------------------------|-------|
| Trypton | 20 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| NaCl | 0,5 g |
| KCl [250 mM] | 10 ml |
| MgCl ₂ [2 M] | 5 ml |

Die Substanzen wurden ad 1000 ml in Reinstwasser gelöst und das Medium autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden 20 ml Glucoselösung [1 M] zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4-8°C.

Spectinomycin-Lösung [10 mg/ml]

Pro ml Lösung wurden 10 mg Spectinomycin in Reinstwasser gelöst und steril filtriert; Lagerung bei -20°C.

2.1.9.3 Elektrophoresen

APS-Lösung 10% (SDS-PAGE)

Ammoniumperoxodisulfat wurde zu einer Konzentration von 10% (m/V) in Reinstwasser gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

DEPC-Wasser

DEPC 0,5 ml

Milliporewasser 500 ml

DEPC wurde in Milliporewasser durch Schwenken gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde autoklaviert; Lagerung bei 4-8°C.

HEPES-Puffer 10x (RNA-Agarose-Elektrophorese)

EDTA 10 mM

Natriumacetat x 3 H₂O 50 mM

HEPES 200 mM

Die Substanzen wurden in DEPC-Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,2 eingestellt und anschließend autoklaviert; Lagerung bei 4-8°C.

HEPES-Puffer 1x (RNA-Agarose-Elektrophorese)

HEPES-Puffer 10x wurde im Verhältnis 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt.

Lysepuffer No.9 (Membranpräparationen)

NP-40 1% (V/V)

Tris-Base 20 mM

NaCl 137 mM

Glycerol 10% (V/V)

EDTA 2 mM

Aktiviertes Na₃VO₄ 1 mM

Die Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst und der Puffer aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Direkt vor Gebrauch wurden die Proteaseinhibitoren Leupeptin und Aprotinin zugesetzt (Endkonzentration jeweils 10 µg/ml).

Herstellung von aktiviertem Na₃VO₄ [10 mM]: Na₃VO₄ wurde zu 10 mM in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 10 eingestellt. Danach wurde die Lösung gekocht bis sie klar war und auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Der pH-Wert wurde so lange immer wieder eingestellt und die Lösung aufgekocht bis der pH-Wert stabil bei 10 lag. Bis zum Gebrauch wurde die Lösung in Aliquots bei -20°C gelagert.

Sammelgelpuffer 4x (SDS-PAGE)

Tris-Base 0,5 M

SDS-Lösung 20% (m/V) 2% (V/V) → Endkonzentration SDS: 0,4% (m/V)

Die Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 6,8 eingestellt.

SDS-Laufpuffer 10x (SDS-PAGE)

Tris-Base 0,25 M

Glycin 1,92 M

SDS-Lösung 20% (m/V) 5% (V/V) → Endkonzentration SDS: 1% (m/V)

Die Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst.

SDS-Laufpuffer 1x (SDS-PAGE)

SDS-Laufpuffer 10x wurde im Verhältnis 1:10 mit Reinstwasser verdünnt.

SDS-Lösung 20% (m/V)

500 g SDS wurden in 2500 ml Reinstwasser gelöst.

SYBR®Green II-Lösung [1:100] (Agarose-Elektrophoresen)

SYBR®Green II-Stammlösung wurde 1:100 mit TE 1x für molekularbiologische Arbeiten verdünnt und aliquotiert; Lagerung bei -20°C.

TAE-Puffer 50x (DNA-Agarose-Elektrophorese)

Tris-Base 2 M

Essigsäure 1 M

EDTA 0,05 M

Die Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 8,5 eingestellt; Lagerung bei 4-8°C.

TAE-Puffer 1x (DNA-Agarose-Elektrophorese)

TAE-Puffer 50x wurde im Verhältnis 1:50 mit Reinstwasser verdünnt.

Trenngelpuffer 4x (SDS-PAGE)

Tris-Base 1,5 M

SDS-Lösung 20% (m/V) 2% (V/V) → Endkonzentration SDS: 0,4%

Die Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 8,8 eingestellt.

2.1.9.4 Western Blot

Blockingpuffer

3% (m/V) Milchpulver in TBST 1x

Lämmli-Puffer 2x (reduzierend)

| | |
|----------------------|--|
| Tris-HCl | 125 mM |
| SDS-Lösung 20% (m/V) | 30% (V/V) → Endkonzentration SDS: 6% (m/V) |
| 2-Mercaptoethanol | 10% (V/V) |
| Glycerol | 30% (V/V) |
| Reinstwasser | 30% (V/V) |
| Bromphenolblau | 1 Spatelspitze |

Tris-HCl wurde in der SDS-Lösung gelöst und der pH-Wert auf 6,7 eingestellt. Danach wurden die anderen Bestandteile hinzugefügt; Lagerung bei 4-8°C.

Lämmli-Puffer 2x (nicht reduzierend)

Wie Lämmli-Puffer 2x reduzierend, jedoch wurde hier 2-Mercaptoethanol durch Reinstwasser ersetzt.

Semi-Dry-Puffer

900 ml SDS-Laufpuffer 1x für die SDS-PAGE wurden mit 100 ml Methanol gemischt.

Stripping-Puffer pH 2,2

| | |
|----------------------|-------------------------------------|
| Glycin | 7,5 g |
| SDS-Lösung 20% (m/V) | 2,5 ml (Endkonzentration SDS: 0,1%) |
| Tween 20® | 5 g |

Die Substanzen wurden zu 500 ml in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 2,2 eingestellt. Der Puffer wurde max. 1-2 Wochen gelagert.

TBS 10x

| | |
|-----------|----------|
| Tris-Base | 200 mM |
| NaCl | 9% (m/V) |

Die Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

TBS 1x

TBS 10x wurde im Verhältnis 1:10 mit Reinstwasser verdünnt.

TBST 1x

TBS 1x mit Zusatz von 0,1% Tween 20[®] (m/V)

2.1.9.5 PCR und qPCRTE-Puffer 1x (für molekularbiologische Arbeiten)

TE-Puffer 20x, pH 7,5 (aus PicoGreen[®] dsDNA Quantitation Kit) wurde 1:20 mit Ampuwa[®]-Wasser verdünnt.

Primer-Stammlösungen

Die Primerlyophilisate wurden zu 125 µM in TE-Puffer 1x gelöst und aliquotiert; Lagerung bei -20°C.

Primer-Arbeitslösungen [12,5 µM]

Die Primerstammlösungen wurden 1:10 in TE-Puffer 1x verdünnt und aliquotiert; Lagerung bei 4-8°C.

Primer-Mischungen für qPCR

Die Arbeitslösungen von linkem und rechtem Primer wurden mit TE-Puffer 1x zu einer Konzentration von je 1,3 µM Primer verdünnt; Lagerung bei 4-8°C.

2.1.9.6 MTT-AssayCarboplatin-Lösungen

Stammlösung 5 mM: Das Konzentrat Carboplatin-ratiopharm[®] (10 mg Carboplatin/ml = 27 mM) wurde mit Glucoselösung 5% (m/V) zu 5 mM verdünnt.

Verdünnungsreihe: Die Stammlösung wurde mit Krebs-HEPES-Puffer (KHP) 1x zu $10^{-2,5}$ M sowie 10^{-3} M verdünnt. Diese wurden dann jeweils im Verhältnis 1:10 mit KHP 1x bis zu den Konzentrationen $10^{-6,5}$ M und 10^{-6} M weiter verdünnt. Die Verdünnungen wurden vor jedem Assay frisch hergestellt.

Die *wirkstofffreie Kontrolllösung* enthielt entsprechend der in der höchsten verwendeten Konzentration enthaltenen Mengen an Hilfsstoffen pro ml 117,5 µl Glucoselösung 5% (m/V), 514,5 µl steriles Reinstwasser und 368 µl KHP 1x.

Cisplatin-Lösungen

Stammlösung 5 mM: 15 mg Cisplatin wurden in 10 ml Natriumchloridlösung 0,9% (m/V) im Ultraschallbad gelöst. Die Lösung wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße à 1 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Verdünnungsreihe: Siehe unter Carboplatin, zur Verdünnung wurde Natriumchloridlösung 0,9% (m/V) verwendet. Lagerung bei -20°C. *Wirkstofffreie Kontrolllösung:* Natriumchloridlösung 0,9% (m/V).

Docetaxel-Lösungen

Als Stammlösung wurde Taxotere® Injektionslösung verwendet (Konzentrat in Polysorbat, mit Ethanol/Wasser rekonstituiert; Konzentration: 9,87 mg/ml). Daraus wurden $10^{-2.5}$ M und 10^{-3} M Lösungen hergestellt und diese wie unter Carboplatin beschrieben weiter verdünnt. Zum Verdünnen wurde Natriumchloridlösung 0,9% (m/V) verwendet.

Wirkstofffreie Kontrolllösung: entsprechend der in der höchsten verwendeten Konzentration enthaltenen Mengen an Hilfsstoffen wurde eine Lösung mit 3,15% Ethanol (V/V) und 16% Reinstwasser in Natriumchloridlösung 0,9% (m/V) hergestellt. Das in der Stammlösung enthaltene Polysorbat wurde vernachlässigt.

Doxorubicin-Lösungen

Als Stammlösung wurde Doxo-cell® Injektionslösung 2 mg/ml verwendet und mit Natriumchloridlösung 0,9% (m/V) zu Konzentrationen von $10^{-2.5}$ M und 10^{-3} M verdünnt. Die Herstellung der weiteren Konzentrationen erfolgte wie unter Carboplatin beschrieben. Als *wirkstofffreie Kontrolllösung* wurde Natriumchloridlösung 0,9% (m/V) verwendet.

Kupfersulfat-Lösungen

Stammlösung 100 mM: 389,5 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ wurden in 10 ml sterilem Reinstwasser gelöst.

Verdünnungsreihe: Aus der Stammlösung wurden mit sterilem Reinstwasser $10^{-1.5}$ M und 10^{-2} M Lösungen hergestellt und daraus jeweils 1:10 bis zu Konzentrationen von $10^{-5.5}$ M und 10^{-5} M verdünnt. Als *wirkstofffreie Kontrolllösung* wurde steriles Reinstwasser verwendet. Die dadurch verminderte Tonizität des Mediums wirkte sich nachteilig auf das Zellwachstum aus. Dies wurde durch Vergleich zu parallel angesetzten Proben mit Zusatz einer entsprechenden Menge an NaCl-Lösung 0,9% (m/V) überprüft (s. Anhang).

Die verwendeten Endkonzentrationen auf den Zellen für Docetaxel waren 31,6 pM, 100 pM, 316 pM, 1 nM, 1,78 nM, 3,16 nM, 10 nM, 31,6 nM, 100 nM, 316 nM und 1 µM.

Die verwendeten Endkonzentrationen auf den Zellen für Doxorubicin waren 316 pM, 1 nM, 3,16 nM, 10 nM, 31,6 nM, 100 nM, 316 nM, 1 µM und 3,16 µM

Die Endkonzentrationen auf den Zellen betragen für alle anderen Zytostatika sofern nicht anders angegeben: 31,6 nM, 100 nM, 316 nM, 1 µM, 3,16 µM, 10 µM, 31,6 µM, 100 µM und 316 µM.

Die Endkonzentrationen von CuSO₄ waren 316 nM, 1 µM, 3,16 µM, 10 µM, 31,6 µM, 100 µM, 316 µM, 1 mM und 3,16 mM.

Glucoselösung 5% (m/V)

5 g Glucose wurden in 100 ml Reinstwasser gelöst, steril filtriert und aliquotiert. Lagerung bei -20°C.

Krebs-HEPES-Puffer 5x (KHP 5x)

| | |
|---------------------------------|---------|
| NaCl | 590 mM |
| KCl | 23,5 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 6 mM |
| NaHCO ₃ | 21 mM |
| D-Glucose x 1H ₂ O | 58,4 mM |
| HEPES | 50 mM |

Die Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst und auf pH 7,4 eingestellt.

Krebs-HEPES-Puffer 1x (KHP 1x)

| | |
|---------------------------------|----------------------------------|
| KHP 5x | 100 ml |
| CaCl ₂ -Lösung [1 M] | 650 µl (Endkonzentration 1,3 mM) |
| MgSO ₄ -Lösung [1 M] | 600 µl (Endkonzentration 1,2 mM) |
| Reinstwasser | ad 500 ml |

Der Puffer wurde steril filtriert und aliquotiert; Lagerung bei -20°C.

Lactose-Monohydrat-Lösung [45 mg/ml]

450 mg Lactose-Monohydrat wurden in 10 ml Reinstwasser gelöst, steril filtriert und aliquotiert; Lagerung bei -20°C.

MTT-Lösung

50 mg MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) wurden in 10 ml PBS 1x gelöst; Lagerung bei 4-8°C.

Natriumchloridlösung 0,9% (m/V)

Pro 100 ml Reinstwasser wurden 0,9 g NaCl gelöst. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert. Lagerung bei 4-8°C oder längerfristig bei -20°C.

2.1.9.7 Fluoreszenzmikroskopie

Triton X-100-Lösung

Triton X-100 1% (V/V)

Die Substanz wurde mit PBS 1x gemischt. Für die Kernpermeabilisierung wurde zu 0,01% mit PBS 1x verdünnt.

BSA-Lösung zum Blocken

BSA 4% (m/V)

Die Substanz wurde in PBS1x gelöst. Die Lösung wurde frisch hergestellt und maximal einen Tag bei 4-8°C gelagert.

BSA-Lösung zur Antikörperverdünnung

BSA-Lösung 4% (m/V) wurde im Verhältnis 1:4 mit PBS1x zu einer 1%-igen Lösung (m/V) verdünnt.

2.1.9.8 Sonstige

BSA-Standardverdünnungen (BCA-Assay)

BSA wurde zu einer Konzentration von 20 mg/ml gelöst und Verdünnungen folgender Konzentrationen hergestellt [$\mu\text{g/ml}$]: 2'000, 1'500, 1'000, 750, 500, 250, 125, 25. Das Lösemittel wurde entsprechend der Aufreinigung und Verdünnung der Proben ausgewählt (z.B. Lysispuffer No. 6 [1:10] in Reinstwasser).

EGS-Lösung

14,4 mg EGS (Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat)) wurden in 315 μl DMF gelöst. Dies entspricht einer Konzentration von 100 mM.

Formaldehydlösung 4% (V/V) für X-Gal-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie

2,16 ml Formaldehyd 37% wurden mit 17,84 ml PBS 1x gemischt.

Kupfersulfatlösung für den BCA-Assay („Reagent B“)

Kupfersulfat 4% (m/V)

Die Substanz wurde in Reinstwasser gelöst.

Natriumacetatlösung [3 M] für die Plasmidfällung

Pro ml Lösung wurden 246 mg Natriumacetat eingewogen und in Reinstwasser gelöst.

Reagenzienmischung für den BCA-Assay

1T Reagent B wurde mit 50T Reagent A (BCA™ Protein Assay) gemischt.

Reaktionspuffer (X-Gal-Färbung)

K₃Fe(CN₆) 645 mg

K₄Fe(CN₆) x 3 H₂O 844 mg

MgSO₄ x 7 H₂O 37 mg

Die Substanzen wurden in 90 ml PBS 1x aufgelöst und der Puffer steril filtriert.

X-Gal-Stammlösung

Pro ml Lösung wurden 20 mg X-Gal in DMF gelöst; Lagerung bei -20°C.

Reaktionslösung (X-Gal-Färbung):

Die X-Gal-Stammlösung wurde direkt vor Gebrauch in Reaktionspuffer 1:20 verdünnt (Endkonzentration 1 mg/ml).

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline = PBS) 10x

NaCl 1,4 M

KCl 30 mM

Na₂HPO₄ x 2 H₂O 80 mM

KH₂PO₄ 15 mM

Die Substanzen wurden in Reinstwasser gelöst, der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und autoklaviert; Lagerung bei -20°C.

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline = PBS) 1x

Bei Bedarf wurden 50 ml PBS 10x mit Reinstwasser auf 500 ml aufgefüllt und autoklaviert; Lagerung bei 4-8°C

Tris-HCl-Puffer für UV-Quantifizierung genomischer DNA

Tris-HCl 10 mM

Die Substanz wurde in DEPC-Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt; Lagerung bei 4-8°C.

Salpetersäure 1% (V/V) für DNA-Platinierung und Uptake mittels ICP-MS

| | |
|----------------------------------|---------|
| HNO ₃ rauchend (100%) | 0,5 ml |
| Reinstwasser | 49,5 ml |

Salpetersäure 2% (V/V) für DNA-Platinierung und Uptake mittels ICP-MS

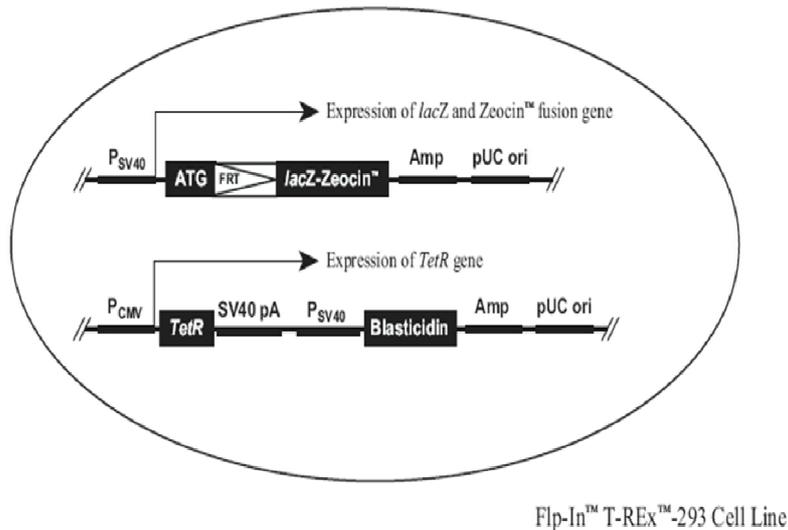
| | |
|----------------------------------|-------|
| HNO ₃ rauchend (100%) | 1 ml |
| Reinstwasser | 49 ml |

2.1.10 Zelllinien und Nährmedien

Für die Überexpression der Kupfertransporter hCtr1 und hCtr2 wurden die modifizierten HEK-293-Zellen Flp-InTM T-RExTM-293 von der Firma Invitrogen verwendet. HEK-293-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die DNA-Fragmente aus dem Genom des Adenovirus 5 enthalten und dadurch immortalisiert sind (Graham et al. 1977). Flp-InTM T-RExTM-293 tragen darüber hinaus eine sog. FRT-site (Flp Recombination Target site) im Genom. Dies ist eine DNA-Erkennungssequenz, an der ein passendes Plasmid (pcDNA5/FRT/TO[®]), das ebenfalls eine solche FRT-site trägt, mit hoher Effizienz durch eine Flp-Rekombinase (aus *Saccharomyces cerevisiae*) eingefügt werden kann (ortsspezifische Rekombination, Abb. 2-1). In dieses Plasmid konnte an der Multiple Cloning Site die Gensequenz für das Gene of Interest (GOI), also den jeweiligen Kupfertransporter eingefügt und so in die Zellen transfiziert werden (s. Kap. 2.2.2). Gleichzeitig wurde ein weiteres Plasmid transient transfiziert, welches das Gen für die Flp-Rekombinase enthält. Von der Firma Invitrogen ist hierfür das so genannte pOG44-Plasmid erhältlich, in dieser Arbeit wurde jedoch mit der stabileren und effizienteren Variante FLPe (Buchholz et al. 1998) gearbeitet und daher das Plasmid pCSFLPe (Werdien et al 2001; Thomas et al. 2004) verwendet. Die ursprüngliche Flp-InTM T-RExTM-293-Zelllinie trägt ein lacZ-ZeocinTM-Fusionsgen direkt hinter der FRT-site. Dies führt zum einen zur Expression eines Resistenzfaktors gegen das Selektionsantibiotikum ZeocinTM und zum anderen zur Expression von β -Galactosidase. Letztere verleiht den Zellen die Fähigkeit, die Substanz X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid) zu spalten, wodurch 5-Brom-4chlor-Indoxyl freigesetzt wird. Letzteres reagiert durch Einwirkung von Luftsauerstoff zu einem blauen Indigofarbstoff (<http://www.roche.de>). Wird das Plasmid pcDNA5/FRT/TO[®] mit dem gewünschten GOI an dieser Stelle in das Genom eingebaut, so werden das Startcodon und die restliche Sequenz des lacZ-ZeocinTM-Fusionsgens voneinander getrennt. Die Resistenz gegen ZeocinTM geht folglich verloren, ebenso die Expression von β -Galactosidase. Stattdessen erhalten die Zellen durch den neu eingebauten Vektor pcDNA5/FRT/TO[®]-GOI ein Resistenzgen gegen Hygromycin B.

Erfolgreich transfizierte Zellen können also durch ihre Hygromycin B-Resistenz selektiert und über das Ausbleiben einer Blaufärbung mit X-Gal, sowie durch die Resensitivierung gegen Zeocin™ überprüft werden. Zeocin™ ist ein mit Bleomycin verwandtes Antibiotikum mit toxischer Wirkung auf die meisten aerob wachsenden Zellen. Es führt zu Strangbrüchen in der DNA. Das Produkt des Resistenzgens *Sh ble* aus *Streptoalloteichus hindustanus* bewirkt eine Inaktivierung von Zeocin™ (Invitrogen Flp-In™ T-REx™-Core Kit Handbuch).

A



B

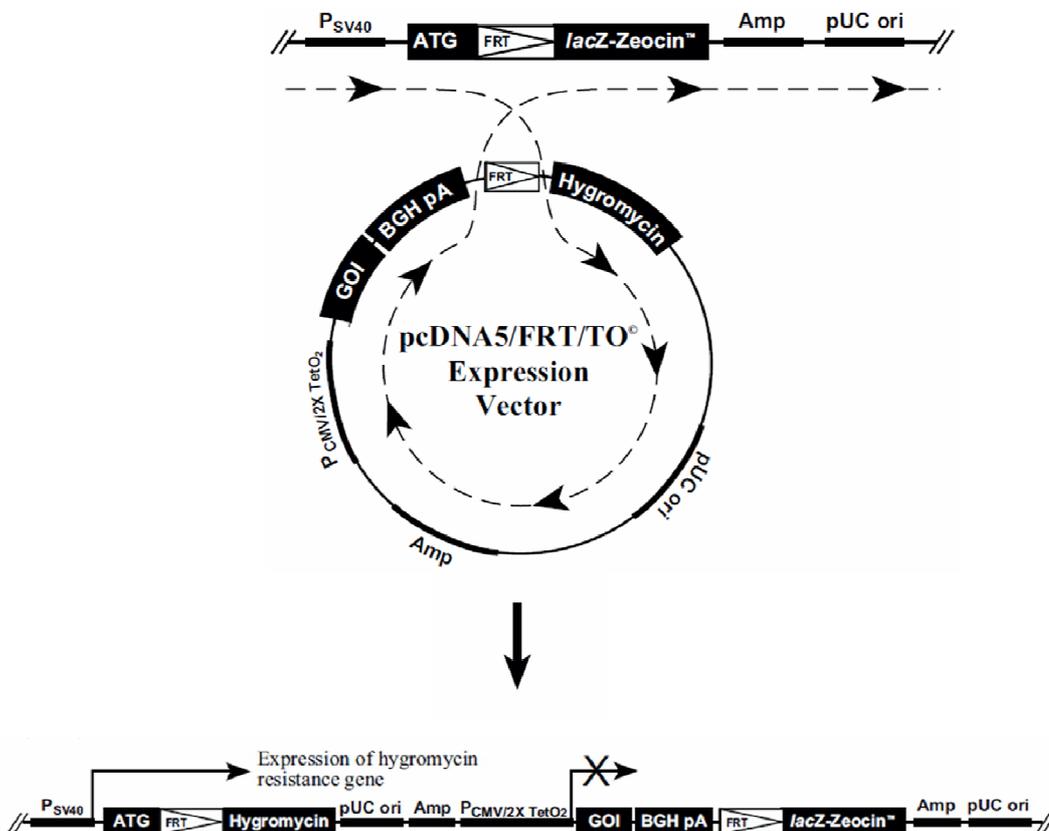
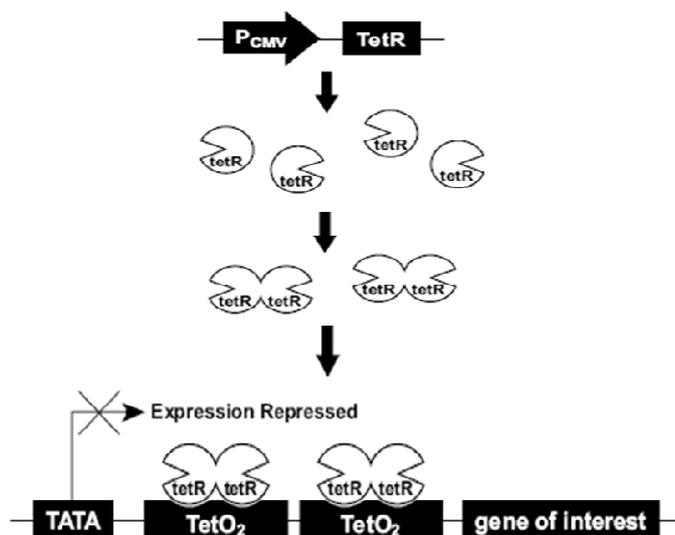


Abb. 2-1: (A) Schematische Darstellung der im Genom integrierten Plasmide mit FRT-Site und lacZ-ZeocinTM-Fusionsgen bzw. Tetracyclin-Repressorgen (TetR) in Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen. (B) Transfektion des pcDNA5/FRT/TO[®]-Plasmids mit GOI in das Genom an der FRT-Site. *Quelle:* Handbuch für das Flp-InTM T-RExTM Core Kit der Firma Invitrogen (www.lifetechnologies.com/ Copyright © 2011 Life Technologies Corporation. Used under permission.)

Hygromycin B ist ein Aminoglycosidantibiotikum und greift in die eukaryotische Proteinbiosynthese ein. Durch das *E. coli hygromycin resistance gene* werden Zellen dagegen resistent (<http://products.invitrogen.com>).

Das Plasmid pCSFLPe wird nach der Transfektion von pcDNA5/FRT/TO[®]-GOI nicht mehr benötigt, trägt daher kein für eukaryotische Zellen relevantes Resistenzgen und wird so im Gegensatz zu pcDNA5/FRT/TO[®]-GOI nur transient transfiziert. Des Weiteren besitzen die Zellen das pcDNATM6/TR-Plasmid, welches zur Expression eines Tetracyclin-Repressorproteins führt. Dieses blockiert zunächst die Transkription des transfizierten GOI durch Bindung an die „TetO₂“-Sequenz in der Promotorregion (Abb. 2-2).



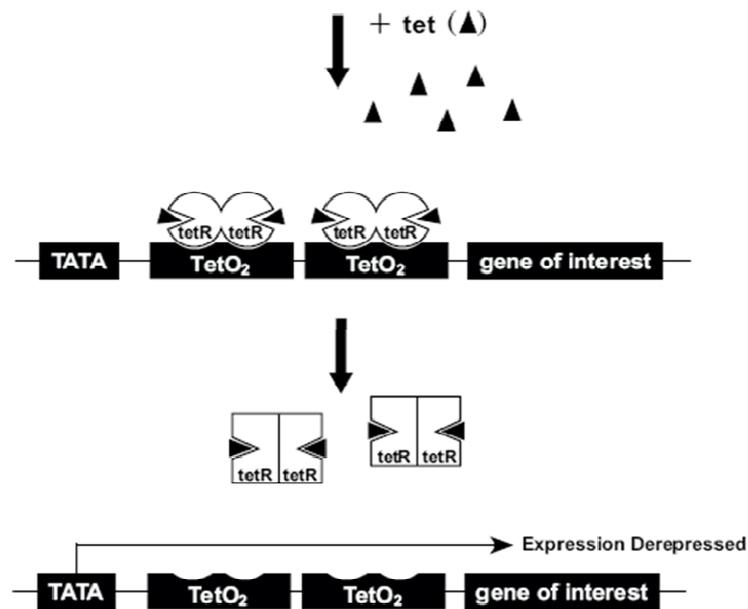


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Funktion des Tetracyclin-Repressors und seiner Inaktivierung durch Tetracycline; *Quelle*: Handbuch für das Flp-In™ T-REx™ Core Kit der Firma Invitrogen (www.lifetechnologies.com/Copyright © 2011 Life Technologies Corporation. Used under permission.)

Durch Zusatz von Tetracyclin oder Doxycyclin wird die Konformation des Repressors so verändert, dass dieser nicht mehr binden kann und die Promotorregion frei gibt. Erst jetzt kann (gezielt) eine starke Überexpression des gewünschten Gens erfolgen. Daher wurden die Zellen vor der Durchführung bzw. dem Beginn eines Experiments vier Tage lang in Doxycyclin-haltigem Nährmedium kultiviert (s.u. „Induktionsmedium“, Kap. 2.1.9.1).

Das pcDNA™6/TR-Plasmid enthält ein Resistenzgen gegen Blasticidin S. Dies ist ein Peptidyl-Nucleosid-Antibiotikum aus *Streptomyces griseochromogenes*, das in Pro- und Eukaryoten die Translation hemmt (<http://products.invitrogen.com>; <http://www.invitrogen.com>). Die Resistenz kommt durch Expression eines Blasticidin S-Deaminase-Gens zustande. Diese Deaminase überführt das Antibiotikum in eine ungiftige Deaminohydroxyverbindung (Invitrogen Flp-In™ T-REx™-Core Kit Handbuch).

Für die Zellkultur wurde vor der Transfektion mit dem pcDNA5/FRT/TO[®]-GOI-Plasmid Selektionsmedium I mit Blasticidin S und Zeocin, nach der Transfektion Selektionsmedium II mit Blasticidin S und Hygromycin B verwendet (s. Kap. 2.1.9.1.).

Für Expressionsuntersuchungen mittels quantitativer PCR wurden verschiedene Tumorzelllinien verwendet (s. Tab 2-10). Die entsprechenden cisplatinresistenten Subzelllinien wurden von Herrn Dr. Niels Eckstein (A2780 cisR-Zelllinie) und von Frau Dr. Alexandra Hamacher durch wiederholte Cisplatinbehandlung generiert.

| Bezeichnung | Gewebetyp | Nährmedium | Herkunft |
|-----------------|---|------------|---|
| Cal 27 | Zungenkarzinom | DMEM-I | ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK |
| Cal 27 cisR | | | |
| PA1* | Ovarialkarzinom (Terratokarzinom, Zellen aus Aszites) | RPMI-I | ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK |
| PA1 cisR | | | |
| Ovcar 3* | Ovarialkarzinom (Adenokarzinom, Zellen aus Aszites) | RPMI-I | ATCC/LGC Standards GmbH Wesel |
| Ovcar 3 cisR | | | |
| Caov 3* | Ovarialkarzinom (Adenokarzinom) | DMEM-I | ATCC/LGC Standards GmbH Wesel |
| Caov 3 cisR | | | |
| Hey* | Ovarialkarzinom (serös) | RPMI-I | CEDARLANE Laboratories Ltd. , Burlington/Kanada |
| Hey cisR | | | |
| A2780 | Ovarialkarzinom | RPMI-N | ECACC, Salisbury, Wiltshire/UK |
| A2780 cisR | | | |
| OAW42* | Ovarialkarzinom (Papillär-seröses Zyst- Adenocarcinom) | DMEM-I | ECACC, Salisbury, Wiltshire/UK |
| OAW42 cisR | | | |
| MDA-MB 231* | Mammakarzinom (Adenokarzinom, trippel-negativ, aus Pleuraerguss) | DMEM-I 15% | ECACC, Salisbury, Wiltshire/UK |
| MDA-MB 231 cisR | | | |
| T47D* | Mammakarzinom (duktal, Zellen aus Pleuraerguss) | RPMI-N | ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK |
| T47D cisR | | | |

Tab. 2-10: Verwendete Pärchen sensitiver und cisplatinresistenter Tumorzellen; „-I“: mit inaktiviertem FKS kultiviert; „-N“: mit nicht inaktiviertem FKS kultiviert. Mit „*“ markierte Zellen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Brigitte Royer-Pokora (Institut für Humangenetik und Anthropologie, Universitätsklinikum Düsseldorf).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

Um eine Kontamination der Zellen mit Krankheitserregern zu vermeiden, wurde mit den Zellen unter Laminar-Airflow-Sterilwerkbänken gearbeitet. Zur Desinfektion von Arbeitsmaterialien und Handschuhen wurde Isopropanol 70% (V/V) verwendet. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert. Letzteres gewährleistet zusammen mit im Medium enthaltenem Hydrogencarbonat die Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Werts von 7,2-7,4.

2.2.1.1 Ernten und Passagieren

Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen passagiert. Zum Ernten wurde von den Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen das Nährmedium bis auf ca. 3 ml abgesaugt, mit dem restlichen Medium die Zellen abgeklopft und mit 7 ml PBS 1x resuspendiert (T75-Flaschen). Für T25- und T175-Flaschen wurden entsprechend kleinere bzw. größere Volumina verwendet.

Die Tumorzellen wurden vor der RNA-Isolierung in T25-Flaschen kultiviert. Da sie stärker am Flaschenboden anhaften, wurden sie enzymatisch abgelöst. Hierfür wurde das Nährmedium vollständig entfernt und einmal mit 1 ml PBS 1x gewaschen. Danach wurden die Zellen für einige Minuten mit 1 ml Trypsin-EDTA 1x im Brutschrank bis zur vollständigen Ablösung vom Flaschenboden inkubiert. Anschließend wurde mit 4 ml Nährmedium das Trypsin inaktiviert und die Zellen resuspendiert.

Nach Überführen in eine 50 ml PP-Röhre wurde bei 266 x g und 4°C für 4 min. zentrifugiert, der Überstand vom Zellpellet abgesaugt und die Zellen in Nährmedium resuspendiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde dann mit frischem Nährmedium in eine neue Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.1.2 Zellzählung

Die Zellen wurden wie im vorherigen Abschnitt beschrieben geerntet und das Zellpellet je nach Konfluenz und Größe der Zellkulturflasche in 3-10 ml Nährmedium resuspendiert. Einige µl dieser Zellsuspension wurden mit Eosinlösung verdünnt und in einer Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Eosin ist ein roter Farbstoff, der bei intakter Zellmembran nicht in die Zelle gelangt. Abgestorbene Zellen dagegen nehmen den Farbstoff auf und färben sich tief rot. Daher wurden nur die hellen - also lebenden - Zellen gezählt. Die Zählkammer besteht aus vier Quadraten (n_{1-4}) mit jeweils 16 Kleinquadraten. Diese wurden meanderförmig ausgezählt. Berücksichtigt wurden nur Zellen in den Teilquadraten und auf deren jeweiligen linken und oberen Begrenzung. So wurde verhindert, dass Zellen auf den Grenzlinien zwischen zwei Teilquadraten doppelt gezählt wurden. Die Formel zur Berechnung der Zellzahl pro µl Zellsuspension hängt von den Maßen der Zählkammerquadrate und dem Verdünnungsfaktor (VF) ab. Für die in dieser Arbeit verwendete Zählkammer lautete die Formel wie folgt:

Formel 1:

$$\text{Zellzahl} / \mu\text{l} = \frac{\sum n_{1-4}}{0,4} \cdot \text{VF}$$

2.2.1.3 Einfrieren von Zellen/Lagerung

Bei einer Konfluenz von ca. 80-90% wurden die Zellen geerntet und in 1 ml (T75-Flasche) bzw. 3 ml (T175-Flasche) resuspendiert. Je 900 µl wurden in ein Kryoröhrchen pipettiert und mit 100 µl DMSO versetzt. Die Zellen wurden eingefroren und zunächst bei -80°C gelagert. Für die Langzeitlagerung erfolgte dann eine Überführung in flüssigen Stickstoff (-196°C).

2.2.1.4 Auftauen von Zellen

Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen haften nur leicht am Boden von Zellkulturflaschen und sind insbesondere nach dem Auftauen sehr empfindlich. Daher wurden diese Zellen direkt nach dem Auftauen zunächst in mit *Poly-L-Lysin beschichteten* T25-Flaschen kultiviert: In eine Flasche wurden 3 ml Poly-L-Lysin-Lösung pipettiert, auf dem Flaschenboden verteilt und 30 min. bei Raumtemperatur einwirken gelassen. Danach wurde die Lösung wieder entfernt und zweimal mit je 3 ml PBS 1x gewaschen. Anschließend wurden 5 ml Nährmedium in die Flasche gegeben und diese im Brutschrank vorgewärmt. Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension zu 4 ml Nährmedium in eine PP-Röhre pipettiert und bei 266 x g und 4°C für 4 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 1 ml Nährmedium resuspendiert und in die Zellkulturflaschen überführt. In der ersten Woche wurde das Nährmedium täglich gewechselt. Zunächst wurde Nährmedium ohne Selektionsantibiotika verwendet, nach wenigen Tagen wurde auf Selektionsmedium umgestellt. Das erste Passagieren der Zellen erfolgte durch die starke Anhaftung am Poly-L-Lysin mit Trypsin wie unter 2.2.1.1 für Tumorzellen beschrieben. Anschließend wurden die Zellen in Flaschen ohne Poly-L-Lysin-Beschichtung weiter kultiviert.

2.2.2 Überexpression von hCtr1 und hCtr2 in Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen

Die Zelllinie wurde bereits in Kapitel 2.1.10 beschrieben. Für die DNA-Sequenzen von hCtr1 und hCtr2 konnten Bakterienklone mit entsprechenden Plasmiden von der Firma Open Biosystems bezogen werden: pDONR223 mit dem Open Reading Frame (ORF) von hCtr1, sowie pDNR-LIB mit der coding sequence (cds) von hCtr2. Der ORF von hCtr1 besteht laut Hersteller aus der Sequenz zwischen Start- und Stopcodon, wobei letzteres nicht eingeschlossen ist. Ebenso waren keine passenden Restriktionsschnittstellen vorhanden. Die cds für hCtr2 war vollständig, jedoch fehlten auch hier die zum Expressionsplasmid pcDNA5/FRT/TO[®] passenden Schnittstellen. Die fehlenden DNA-Abschnitte mussten daher mittels PCR angefügt werden.

2.2.2.1 Gewinnung der Ausgangsplasmide

Zunächst wurden die von Open Biosystems bezogenen Bakterienklone mit den gewünschten Ausgangsplasmiden angezüchtet und vermehrt und die Plasmide anschließend aus der Bakterienkultur isoliert (s. 2.2.2.3). Des Weiteren mussten der Expressionsvektor pcDNA5/FRT/TO[®] und der das Rekombinasegen enthaltende Vektor pCSFLPe zur Vervielfältigung in Bakterien transformiert und ebenfalls daraus gewonnen werden.

2.2.2.2 Anzucht und Vermehrung von Bakterien

Ein Röhrchen der bei -80°C gelagerten E.-coli-Kulturen wurde auf Eis aufgetaut und die Bakterien anschließend in einer 50 ml PP-Röhre in 12 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum (50 µg/ml Spectinomycin für pDONR 223-hCtr1 und 25 µg/ml Chloramphenicol pDNR-LIB-hCtr2) im Orbitalschüttler bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Für eine Über-Nacht-Schüttelkultur wurde die Bakteriensuspension in einen Erlenmeyerkolben mit 85 ml LB-Medium + Selektionsantibiotikum überführt und wie oben beschrieben über Nacht geschüttelt. Für Back-ups wurden je 900 µl Bakteriensuspension + 300 µl Glycerollösung [60%] in ein Kryovial gegeben und bei -80°C eingefroren.

Für pDNR-LIB-hCtr2 wurde von Open Biosystems empfohlen, einzelne Klone zunächst bzgl. des richtigen Plasmids bzw. Inserts zu verifizieren. Daher wurden davon zunächst Backups bei -80°C eingefroren. Von diesen wurde im gefrorenen Zustand ein kleiner Teil mit einer Pipettenspitze entnommen und auf eine LB-Agarplatte mit Chloramphenicol [25 µg/ml] ausgestrichen. Nach Inkubation im Trockenschrank bei 37°C über Nacht wurden hiervon fünf Einzelklone mit Hilfe einer Pipettenspitze „gepickt“ und jeweils wie oben beschrieben für ca. 8 h in LB-Medium geschüttelt. Hiervon wurden Backups eingefroren und von einem der Klone eine Über-Nacht-Schüttelkultur angesetzt.

2.2.2.3 Plasmidisolierung

Die Isolierung der Plasmide aus Über-Nacht-Schüttelkulturen wurde je nach benötigter Menge mit dem PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep oder –Maxiprep Kit (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde UV-spektrometrisch bestimmt (s. Kap. 2.2.5.7). Die Plasmidlösungen wurden bei -20°C gelagert.

2.2.2.4 Transformation von Plasmiden in Escherichia-coli-Bakterien

Von jedem Plasmid wurde ein Teil mit TE-Puffer (PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit) auf eine Konzentration von 125 ng/ml verdünnt. Als Bakterien wurden One Shot[®]E. coliTOP10 (Invitrogen) verwendet. 50 µl Bakteriensuspension wurden auf Eis

aufgetaut, 2 µl der verdünnten Plasmidlösung (entsprechend 250 ng) hinzu gegeben und vorsichtig durch Rühren mit der Pipettenspitze vermischt. Die Mischung wurde 5-30 min auf Eis gelagert und anschließend für genau 30 sec. in einem 42°C warmen Wasserbad inkubiert (Hitzeschock-Verfahren). Die Bakterien wurden sofort wieder für 2 min. auf Eis gestellt und anschließend 250 µl SOC-Medium zupipettiert. Diese Mischung wurde für 1 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurden Aliquots dieser Suspension auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum pipettiert, mit Hilfe eines Drigalskispatels verteilt und über Nacht im Trockenschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde auf erfolgreiches Wachstum einzelner Klone überprüft, die Agarplatten mit Parafilm verschlossen und bis zum Gebrauch bei 4-8°C gelagert. Zur Vermehrung der Bakterien wurden einzelne Klone „gepickt“ und angezchtet. Anschließend erfolgte eine Plasmidisolierung.

2.2.2.5 PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction = PCR), die 1985 von Karry Mullis entwickelt wurde (Saiki et al. 1985; Mullis und Faloona 1987), kann DNA in sehr kurzer Zeit stark amplifiziert werden. Die zu vervielfältigende DNA wird in kleiner Menge (Template) in den Reaktionsansatz gegeben. Mit Hilfe eines Primerpärchens und von DNA-Polymerase kann diese Template-DNA oder ein bestimmter Abschnitt davon kopiert werden. Primer sind kurze DNA-Sequenzen, die jeweils an einen der beiden komplementären Stränge des Templates binden und dabei die zu vervielfältigende Sequenz einschließen. Außerdem liefern die Primer nach Anlagerung an das Template den Startpunkt für die DNA-Polymerase, die ein doppelsträngiges DNA-Stück und eine freie 3'-OH-Gruppe benötigt. Die verwendeten hitzebeständigen Taq-Polymerasen stammen ursprünglich aus *Thermus aquaticus*, einem in heißen Quellen lebenden Bakterium, und benötigen Mg^{2+} -Ionen als Cofaktor. Als Bausteine für die DNA-Synthese wird eine Mischung der vier in DNA vorkommenden Desoxy-Nucleotidtriphosphate (dNTP) eingesetzt.

Erhitzt man eine Mischung aus diesen Komponenten auf 95°C, so kommt es zur *Denaturierung* des Templates und damit zur Bildung von Einzelsträngen. An diese können die Primer durch Abkühlen auf eine primerspezifische Temperatur anlagern (*Annealing*). Anschließend werden die Primer bei 72°C durch die DNA-Polymerase verlängert und das Template dadurch kopiert (*Elongation*).

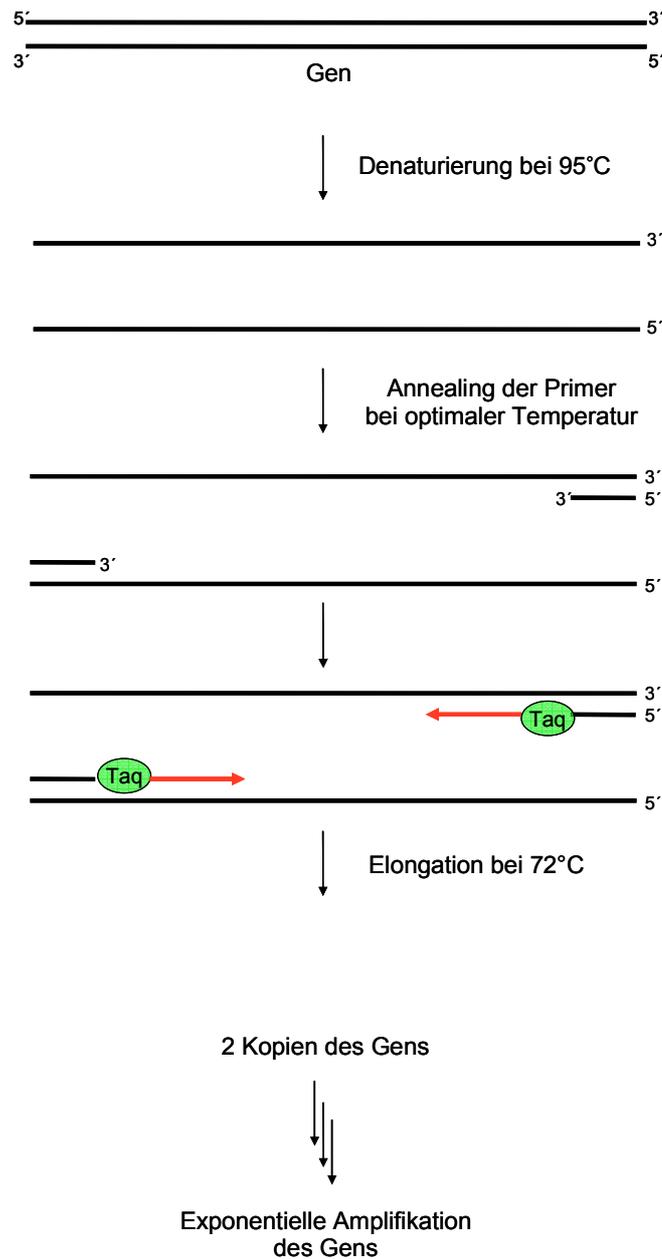


Abb. 2-3: Schematischer Reaktionsablauf der PCR

Diese Reaktionsabfolge wird als *Zyklus* oder *Cycle* bezeichnet und 30-40 mal wiederholt. Neu entstandene Kopien des Templates gehen im nächsten Zyklus selbst als Template ein und werden ihrerseits kopiert. Unter optimalen Bedingungen verläuft die Amplifikation daher exponentiell. Fügt man an die 5'-Enden der Primer zusätzliche Sequenzen an, so werden die Kopien des Templates im Lauf der Reaktion um diese Sequenzen verlängert. In dieser Arbeit wurden den Templates für hCtr1 und hCtr2 auf diese Weise Restriktionsschnittstellen angefügt.

2.2.2.6 Primerdesign

Die hierfür benötigten Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer3[®] entworfen. Zunächst wurde mit dem Programm Vector NTI[®] eine Restriktionsanalyse durchgeführt, um festzustellen, welche Schnittstellen innerhalb der Gensequenzen vorkommen und daher nicht verwendet werden konnten. Die Schnittstellen HindIII und XhoI erwiesen sich für beide hCtr-Gene als geeignet und sind auch in der MCS des Expressionsvektors vorhanden. Der jeweilige linke Primer enthielt die Anfangssequenz des Gens (5'-Ende) und als „Überhang“ die Sequenz für die Restriktionsschnittstelle HindIII, sowie einige zusätzliche Basen, die von Restriktionsenzymen zur Anlagerung benötigt werden. Für beide Transporter war es möglich, eine sog. Kozak-Sequenz zu generieren, um die Transkriptionseffizienz zu erhöhen. Dies bedeutet, dass die erste Base nach dem Start-Codon ein Guanin sein sollte (dies war in beiden Fällen gegeben) und drei Positionen vor dem Start-Codon eine Purinbase, vorzugsweise Adenin, liegen sollte. Letzteres wurde für beide Transporter im jeweiligen linken Primer berücksichtigt. Die rechten Primer enthielten entsprechend die Endsequenz des jeweiligen Gens und als Überhang die Sequenz für die Restriktionsschnittstelle XhoI sowie weitere zusätzliche Basen. Für hCtr1 war im Ursprungsplasmid kein Stop-Codon vorhanden, so dass dies im rechten Primer ebenfalls eingefügt werden musste. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 2-6 angegeben. Prinzipiell wurde beim Primerdesign wie in Kapitel 2.2.5.3 beschrieben vorgegangen. Bei der Gesamtlänge, dem GC-Gehalt und den Schmelztemperaturen konnte hier auf Grund der vorgegeben Sequenzen jedoch nur bedingt Rücksicht genommen werden.

2.2.2.7 Durchführung der PCR

Die PCR-Reaktion wurde mit verschiedenen Polymerasen und Reaktionsbedingungen ausgetestet. Als Template dienten die Plasmide pDONR 223-hCtr1 bzw. pDNR-LIB-hCtr2. Die Spezifität und Effizienz der verschiedenen Ansätze wurden nach der Reaktion mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (s. Kap. 2.2.6.1) überprüft. Durch Vergleich mit DNA-Größenstandards (Broad Range DNA Mass Ladder/Marligen, GeneRuler[™] 50 bp und 100 bp/Fermentas) konnte an Hand der Größe beurteilt werden, ob das richtige Produkt entstanden war. Die Fluoreszenzintensität der Bande ließ (semi-quantitativ) ungefähre Rückschlüsse darauf zu, in welchem Ansatz die beste Produktausbeute erreicht wurde. Für die Elektrophoresen wurden 1,2%ige Agarosegele verwendet und 3-5 µl PCR-Produkt, versetzt mit 1 µl SybrGreen[®]II-Lösung [1:100] und einer entsprechenden Menge an Loading Dye 6x + SDS.

Da die Sequenzen für die beiden Kupfertransporter recht kurz sind (hCtr1 573 bp, hCtr2 432 bp) konnte mit einer herkömmlichen Taq-Polymerase ohne Proofreading-Eigenschaften gearbeitet werden, die sich in den Vorversuchen als effektiver erwies. Die nachfolgende

Tabelle gibt die Zusammensetzung für einen 50 µl-Ansatz an, die sich als am besten geeignet erwies und schließlich verwendet wurde.

| <i>Komponente</i> | <i>Konzentration/Menge für 50 µl-Ansätze</i> |
|-------------------------------|--|
| Mg ²⁺ | 2 mM |
| dNTP | je 200 µM |
| Primer | je 1 µM |
| Template | 20 pg |
| Native Taq-Polymerase mit BSA | 0,05 U/µl |

Tab. 2-11: Optimierte Konzentrationen/Mengen der einzelnen PCR-Komponenten

Für die Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur wurde eine PCR in mehreren Ansätzen mit einem Temperaturgradienten für den Annealing-Schritt durchgeführt (56,0°C, 57,2°C, 58,4°C und 59,4°C). Hierbei waren 58,4°C sowohl für die hCtr1-Primer als auch für die hCtr2-Primer optimal.

| <i>Komponente</i> | <i>Volumen [µl]</i> |
|---|-------------------------|
| Reaktionspuffer 10x mit (NH ₄) ₂ SO ₄ | 5 |
| MgCl ₂ [25 mM] | 3 |
| Linker Primer [12,5 µM] | 4 |
| Rechter Primer [12,5 µM] | 4 |
| Template (Plasmid) | hCtr1 [8,45 pg/µl]: 2,4 |
| | hCtr2 [16 pg/µl]: 1,25 |
| dNTP-Mix [10 mM] | 1 |
| Taq-Polymerase mit BSA (1:1 mit Ampuwa verdünnt) | 1 |
| Ampuwa-Wasser | für hCtr1: 29,6 |
| | für hCtr2: 30,75 |
| Gesamtvolumen | 50 |

Tab. 2-12: Pipettierschema für die PCR

| <i>Schritt Nr.</i> | <i>Teilreaktion</i> | <i>Temperatur [°C]</i> | <i>Zeit [min.]</i> |
|------------------------------------|---------------------|------------------------|--------------------|
| 1 | Erste Denaturierung | 95 | 2 |
| 2 | Denaturierung | 95 | 1,5 |
| 3 | Annealing | 58,4 | 1 |
| 4 | Elongation | 72 | 1 |
| 34 x Wiederholung der Schritte 2-4 | | | |
| 5 | Finale Elongation | 72 | 2 |
| 6 | Kühlung | 4 | ∞ |

Tabelle 2-13: PCR-Protokoll

2.2.2.8 Aufreinigung der PCR-Produkte

Nach der PCR wurden die Produkte mittels High Pure PCR Product Purification Kit nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Die DNA-Konzentration wurde UV-spektrometrisch bestimmt (s. Kap. 2.2.5.7)

2.2.2.9 Restriktionsverdau

Sowohl die aufgereinigten PCR-Produkte als auch der Expressionsvektor pcDNA5/FRT/TO[®] wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und XhoI für 5-14 h bei 37°C verdaut.

| <i>Komponente</i> | <i>Volumen/Menge</i> |
|-------------------|------------------------------------|
| Puffer R 10x | 10 µl |
| DNA-Lösung | PCR-Produkt: 4-6 µg |
| | pcDNA5/FRT/TO [®] : 10 µg |
| HindIII | 20 U |
| XhoI | 20 U |
| Ampuwa-Wasser | ad 100 µl |

Tab. 2-14: Pipettierschema für den Restriktionsverdau

Um zu verhindern, dass der geschnittene Vektor zum Ausgangsprodukt zurück ligiert wurde, erfolgte nach dem Verdau eine Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase (Calf Intestine Alkaline Phosphatase). Hierfür wurden 0,4 µl (4 U) des Enzyms in den Restriktionsansatz des Vektors gegeben und für 30 min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Alle Ansätze wurden anschließend zur Enzyminaktivierung für 20 min auf 80°C erhitzt.

2.2.2.10 Aufreinigung der geschnittenen DNA

Nach dem Restriktionsverdau wurden die Plasmide unter Anleitung von Frau Dr. Kati Servan mittels Agarose-Gel-Elektrophorese von den ausgeschnittenen Vektorbruchstücken getrennt (vgl. Kapitel 2.2.6.1). Hierfür wurde ein 1%-iges Agarosegel verwendet, dem eine kleine Menge Kristallviolett zugesetzt wurde. Dies ist ein kationischer Farbstoff, der sich bei der Elektrophorese in Richtung Kathode bewegt, während DNA als Polyanion in die entgegengesetzte Richtung wandert. Dort wo sich nach der Elektrophorese DNA im Gel befindet, zeigt sich eine dunkelviolette Bande von „aufgestautem“ Kristallviolett direkt unter der hellen DNA-Bande. Auf diese Weise kann man die DNA sichtbar machen, ohne auf interkalierende Farbstoffe zurückgreifen zu müssen, die möglicherweise zu Mutationen führen könnten. Die DNA-Bande des Plasmids wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in einem Reaktionsgefäß im Wasserbad durch kurzes Erwärmen geschmolzen. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mittels High Pure PCR Product Purification Kit nach Anleitung des Herstellers.

Die geschnittenen PCR-Produkte wurden ebenfalls mit dem High Pure PCR Product Purification Kit direkt aus dem Restriktionsansatz aufgereinigt. Die anschließende DNA-Gehaltsbestimmung erfolgte UV-spektrometrisch (s. Kapitel 2.2.5.7).

2.2.2.11 Ligation

Die Ligation von hCtr1 in das Plasmid pcDNA5/FRT/TO[®] wurde im Institut CESAR unter Anleitung von Frau Dr. Kati Servan mit Quick T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) durchgeführt. Das Insert wurde in ca. dreifachem molarem Überschuss zum Plasmid eingesetzt.

| <i>Komponente</i> | <i>Plasmid + Insert</i> | <i>Negativkontrolle</i> |
|--|-------------------------|-------------------------|
| Plasmid | 1 µl (50 ng) | 1 µl (50 ng) |
| Insert (geschnittenes hCtr1-PCR-Produkt) | 0,3 µl (17 ng) | — |
| Wasser | 8,7 µl | 9 µl |
| Ligationspuffer 2x | 10 µl | 10 µl |
| Ligase | 1 µl | 1 µl |

Tab. 2-15: Ligationsansatz für das hCtr1-Insert

Die in Tabelle 2-15 angegebenen Ansätze wurden für 10 min. bei RT inkubiert. Für die Transformation wurden anschließend 10 µl des Ligationsansatzes bzw. der Negativkontrolle zu je einem Aliquot E. coli vom Typ DH5α gegeben, bei 42°C für 30 sec. erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien auf ampicillinhaltigen Agarplatten

ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde auf das Wachstum von Bakterienklonen überprüft. Die Negativkontrolle wies deutlich weniger Kolonien auf, als der mit Plasmid + Insert transformierte Ansatz. Es konnte also von einer erfolgreichen Ligation und Transformation ausgegangen werden.

Für das hCtr2-Insert wurde analog verfahren, allerdings wurde hier mit T4-DNA-Ligase von Fermentas gearbeitet. Auf eine Negativkontrolle wurde hierbei verzichtet.

| <i>Komponente</i> | <i>Plasmid + Insert</i> |
|--|-------------------------|
| Plasmid | 0,8 µl (56 ng) |
| Insert (geschnittenes hCtr1-PCR-Produkt) | 0,2 µl (18,6 ng) |
| Ampuwa-Wasser | 14,5 µl |
| Ligationspuffer 10x | 2 µl |
| Ligase [1 Weiss-Unit/µl] | 2,5 µl |

Tab. 2-16: Ligationsansatz für das hCtr2-Insert

Die Mischung wurde für 2 h bei RT inkubiert und die Ligase anschließend durch Erhitzen auf 65°C für 10 min. inaktiviert. Die Transformation erfolgte mit 2 µl des Restriktionsansatzes wie in Kapitel 2.2.2.4. beschrieben. Es wurden imMEdia™ Amp Blue-Agarplatten für die Anzucht verwendet.

Von den Klonen auf den Agarplatten wurden jeweils fünf gepickt und wie in Kapitel 2.2.2.2. beschrieben vermehrt.

2.2.2.12 Überprüfung der Plasmide

Um sicherzustellen, dass die Konstrukte aus Insert und Plasmid die korrekte Sequenz aufwiesen, wurde eine Plasmidpräparation mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und die Plasmide anschließend gefällt. Hierzu wurden ein Volumenanteil Plasmidlösung (entsprechend 2,5 µg Plasmid-DNA) mit 1/10 Volumenanteil Natrium-Acetatlösung [3 M] und 2,5 Volumenanteilen reinem Ethanol versetzt. Anschließend wurde für 10 min. bei -80°C inkubiert, was zur Fällung der Plasmid-DNA führte. Nach Abzentrifugieren bei 4°C und 12'000 rpm für 20 min. wurde der Überstand entfernt und die DNA an der Luft getrocknet. Anschließend wurde mit 50 µl Ethanol (ca. 75% (V/V)) gewaschen, 10 min. zentrifugiert und erneut trocken gelassen. Die Bereiche der eingefügten Inserts wurden von der Firma MWG mit Hilfe eines CMV-forward-Primers sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind im Anhang angegeben. Das hCtr2-

Insert wies im Vergleich zu der in der NCBI-Datenbank angegebenen cds eine Mutation im Triplet Nr. 19 auf: AGC an Stelle von AGT. Das Plasmid war jedoch trotzdem verwendbar, da es durch die Degenerierung des genetischen Codes in diesem Fall nicht zu einem Austausch der entsprechenden Aminosäure kommt. Sowohl AGC als auch AGT codieren für Serin.

2.2.2.13 Transfektion der Plasmide in Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen

Am Vortag wurden so viele Zellen in ein 6-Well ausgesät, das zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 90-95% vorlag (600'000 Zellen). Für jeden Transfektionsansatz wurde ein Well mit Zellen besät. Ein zusätzliches Well diente als Kontrolle. Je 2,5 µg der Plasmide pcDNA5/FRT/TO[®]-hCtr1 bzw. -hCtr2 oder pcDNA5/FRT/TO[®]-Plasmid ohne Insert und pCSFLPe wurden in 250 µl FKS-freiem DMEM verdünnt, 6 µl LipofectaminTM2000 wurden ebenfalls in 250 µl FKS-freiem DMEM verdünnt und 5 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde jede Plasmidlösung mit einer Lipofectaminverdünnung gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Hierbei bilden sich Komplexe aus Reagenz und DNA, die anschließend in die Zellen aufgenommen werden können. Die Zellen wurden mit 1,5 ml/Well DMEM ohne Selektionsantibiotika gefüttert und anschließend die Transfektionsmischung hinzu pipettiert. Die Kontrollzellen erhielten keine Transfektionsreagenzien. Die Zellen wurden 24 h im Brutschrank inkubiert, anschließend wurde das lipofectaminhaltige Medium entfernt und durch frisches Nährmedium ersetzt. Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen in T75-Flaschen überführt. Ab dem zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen in Nährmedium mit Hygromycin B und Blasticidin S kultiviert. In den transfizierten Ansätzen waren nach einigen Tagen einzelne Zellkolonien erkennbar. Bei den untransfizierten Kontrollen kam es wie erwartet zum Absterben der Zellen.

Durch die Transfektion mit dem pcDNA5/FRT/TO[®]-Plasmid ohne Insert wurde eine „Leervektorzelllinie“ („empty vector“ = EV) generiert, die als Kontrolle für alle Experimente mit den hCtr1- bzw. hCtr2-überexprimierenden Zellen verwendet wurde.

2.2.2.14 Einzelklonselektion

Theoretisch ist bei allen Zellen eines Transfektionsansatzes davon auszugehen, dass es sich um identische Klone handelt, da die Ursprungszellen, die das Plasmid mit der FRT-Site enthielten, ebenfalls aus einem Klon stammten. Jedoch zeigte sich bei einer ersten X-Gal-Färbung und ersten MTT-Assays, dass dies nicht der Fall war. Daher wurde eine Einzelklonselektion vorgenommen. Hierfür wurden Zellen von jedem der drei Zelltypen Flp-InTM T-RExTM-293-hCtr1, -hCtr2 und –Leervektor (EV) auf beschichteten 96-Well-Platten in

verschiedenen Verdünnungen ausgesät: die Zellen wurden geerntet und in 1:10-Verdünnungsschritten viermal verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden pro Well 10 µl zu 90 µl Selektionsmedium II in eine 96-Well-Platte gegeben. Zellen aus Wells, in welchen nur ein einzelner Klon gewachsen war, wurden allmählich in Platten mit größeren Wells und schließlich in Zellkulturflaschen überführt und vermehrt. Anschließend erfolgte für jeden Klon eine X-Gal-Färbung (Blau-Weiß-Selektion) und ein Test auf Verlust der Zeocinresistenz. Nur Zellen solcher Klone, die keine Blaufärbung aufwiesen und den Zeocinzusatz im Medium nicht überlebten, wurden weiter verwendet.

2.2.2.15 Testung der Einzelklone auf erfolgreiche Transfektion mittels X-Gal-Färbung

Von jedem Klon wurden ca. 10'000 Zellen/Well in eine mit Poly-L-Lysin beschichtete 24-Well-Platte ausgesät und bis zu drei Tagen anwachsen gelassen. Vor der Färbung wurden die Zellen einmal mit PBS 1x gewaschen und anschließend mit 0,5 ml/Well Formaldehydlösung 4% (V/V) für 10 min. bei RT fixiert. Anschließend wurde mit PBS 1x je einmal kurz mit 0,5 ml/Well und für 10 min. mit 1 ml/Well gewaschen. Die Färbung erfolgte dann mit 220 µl/Well Reaktionslösung für 3-24 h im Brutschrank. Die Platte wurde bis zur Auswertung für max. eine Woche bei 4-8°C gelagert.

2.2.2.16 Testung der Einzelklone auf erfolgreiche Transfektion mittels Zeocin

Wie in Kapitel 2.1.10. beschrieben, verlieren erfolgreich mit dem pcDNA5/FRT/TO[®]-Plasmid transfizierte Zellen ihre Resistenz gegen Zeocin[™] und zeigen dafür eine Resistenz gegen Hygromycin B. Von den Einzelklonen wurden je zweimal 100'000 Zellen/Well in 6-Wellplatten ausgesät. Die Zellen in je einem der Wells wurden in Nährmedium kultiviert, welches jeweils 100 µg/ml Hygromycin B und Zeocin[™] enthielt und 16 Tage lang hinsichtlich eines Zeocin-bedingten Absterbens beobachtet. Das Hygromycin B musste zugesetzt werden, um den Verlust des pcDNA5/FRT/TO[®]-Plasmids und damit eine Revertierung der Zeocinresistenz zu verhindern. Das jeweils andere Well jedes Klons wurde als Kontrolle mit Medium versetzt, welches Hygromycin B, aber kein Zeocin[™] enthielt, um andere Ursachen für das Absterben der Zellen auszuschließen.

2.2.2.17 Testung auf erfolgreiche Überexpression auf Transkriptionsebene

Mittels quantitativer PCR wurde die Expression von hCtr1 bzw. hCtr2 in der entsprechenden Überexpressionszelllinie und in Leervektorzellen bestimmt. Hierzu wurden von jedem Zelltyp zweimal 500'000 Zellen in je eine T25-Flasche ausgesät und in je einer Flasche mit doxycyclinhaltigem Medium versetzt. Die Zellen in der jeweils anderen Flasche dienten als Kontrolle und wurden ohne Doxycyclin kultiviert. Für einen weiteren Vergleich diente die

ursprüngliche, nicht transfizierte Flp-InTM T-RExTM-293-Zelllinie, die ebenfalls mit Doxycyclin vorbehandelt wurde. Nach 4-5 Tagen wurde mit dem my-Budget RNA Mini Kit eine RNA-Isolierung mit DNase I-Verdau nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (vgl. Kap. 2.2.5.1). Der DNase-Verdau war notwendig, da die in der qPCR verwendeten, Exon-Exon-Schnittstellen überspannenden Primer genomische DNA zwar nicht erfassen (vgl. Kapitel 2.2.5.3), jedoch an Plasmid-DNA, der die Introns fehlen, binden können. Kleine Reste von DNA in der Probe hätten daher zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen können. Die RNA-Konzentrationen wurden im UV-Spektrometer bestimmt (vgl. Kapitel 2.2.5.7), mittels Agarose-Gel-Elektrophorese auf Integrität überprüft (vgl. Kapitel 2.2.6.2) und die mRNA anschließend in cDNA umgeschrieben (vgl. Kapitel 2.2.5.2). Anschließend wurde eine qPCR mit Primern für hCtr1 und hCtr2 durchgeführt (vgl. Kapitel 2.5.3). Als Housekeeping-Gene (HKG) wurden β -Actin und UBE2D2 gewählt. Da die Zellen außer der Überexpression des jeweiligen Transporters isogen waren, konnte auf eine experimentelle Bestimmung der optimalen HKG verzichtet werden.

2.2.2.18 Nachweis der hCtr2-Überexpression auf Translationsebene – SDS-PAGE und Westernblot

Vier Tage vor der Proteinisolierung wurden je 1 Mio. Zellen in eine T75-Flasche oder 2,5 Mio Zellen in eine T175-Flasche ausgesät und in Induktionsmedium kultiviert. Als Vergleich dienten wiederum Zellen, die kein doxycyclinhaltiges Nährmedium erhielten. Die Proteine wurden wie in Kapitel 2.2.7.1 beschrieben isoliert, die Konzentration mittels BCA-Assay bestimmt (Kapitel 2.2.7.4) und eine SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot durchgeführt (vgl. Kapitel 2.2.7.5 und 2.2.7.6). Als Primärantikörper wurde Anti-hCtr2 [1:1000] und als Sekundärantikörper Anti-rabbit [1:2000] verwendet. Des Weiteren wurden auch Membranisolate hergestellt (vgl. Kapitel 2.2.7.2) und mittels SDS-PAGE/Westernblot untersucht.

2.2.2.19 Nachweis der hCtr2-Überexpression auf Translationsebene – Konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Pro Well einer Lab-Tek[®] II Chambered Coverglass-Kammer wurden 55'000 induzierte Zellen ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS 1x für je 5 min. wurde mit Formaldehydlösung 4% (V/V) für 10 min. fixiert und anschließend wieder dreimal für je 10 min. gewaschen. Die Kernpermeabilisierung erfolgte mit Triton X 100-Lösung 0,01% (V/V) für 10 min. Anschließend wurde wieder dreimal für je 5 min. gewaschen, unspezifische Bindungsstellen 1 h lang mit BSA-Lösung 4% (m/V) geblockt und wieder zweimal je 5 min. gewaschen. Über Nacht wurde mit der entsprechenden

Antikörperkonzentration (vgl. Tab. 2-3) in BSA-Lösung 1% (m/V) bei 4°C inkubiert. Nach Aufwärmen auf RT und dreimaligem Waschen für je 10 min. wurde für 1 h mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (vgl. Tab. 2-3) in BSA-Lösung 1% (m/V) inkubiert. Während und nach der Sekundärantikörperinkubation wurde wegen der Lichtempfindlichkeit von Alexa Fluor® 488 im abgedunkelten Raum gearbeitet. Anschließend folgten wieder drei Waschschritte für je 10 min. und eine Überschichtung mit DAPI-haltigem UltraCruz™ Mounting Medium. DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) bindet selektiv an DNA und bildet fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe. Es wird daher zur Kernfärbung eingesetzt (<http://www.roche-applied-science.com>). Die Zellen wurden anschließend von Frau Dr. Stefanie Weidtkamp-Peters (Arbeitskreis Prof. Dr. Claus Seidel, Institut für Physikalische Chemie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf) mit einem Olympus FV1000 Confocal Laser scanning-Mikroskop untersucht (verwendete Wellenlängen für DAPI: 405 nm Exzitation, 461 Emission; Verwendete Wellenlängen für Alexa Fluor® 488: 488 nm Exzitation, 520 nm Emission).

2.2.2.20 Nachweis der Überexpression auf funktioneller Ebene

Zum funktionellen Nachweis der Kupfertransporter-Überexpression wurden MTT-Assays (vgl. Kap. 2.2.3) mit CuSO₄ durchgeführt. Die Zellen wurden dabei über 72 h mit Kupfer inkubiert oder für 3 h und anschließend für weitere 48 h mit kupferfreiem Nährmedium.

Für den Nachweis der hCtr1-Überexpression erfolgte außerdem ein MTT-Assay mit einer Co-Inkubation mit Kupfer und 1 µM Chlorpromazin. Außerdem wurde ein Experiment durchgeführt, in dem für ca. 2,5 h mit 10 µM Chlorpromazin vorinkubiert und anschließend, nach einem Waschschritt mit PBS1x, 24 h lang mit Kupfer behandelt wurde. Die Zellen wurden danach bis zur Vermessung noch 72 h mit wirkstofffreiem Nährmedium weiter inkubiert.

2.2.3 Bestimmung der Sensitivität gegen Zytostatika mittels MTT-Assay

Der MTT-Assay ist eine weit verbreitete Methode, um die Zytotoxizität von Substanzen auf Zellen zu untersuchen. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) ist eine gelbe Substanz, die von mitochondrialen Dehydrogenasen zu der violett gefärbten Verbindung Formazan reduziert wird. Das Ausmaß der Reduktion von MTT kann über die Absorption des Formazans bestimmt werden und ist ein Maß für die Vitalität der Zellen. Je stärker die Zellen in ihrem Wachstum und ihrer Stoffwechselaktivität gehemmt werden, bzw. je mehr Zellen absterben, desto weniger Formazan wird gebildet. Trägt man nun die Absorptionen des Formazans gegen den dekadischen Logarithmus der entsprechenden molaren Substanzkonzentrationen auf, so ergibt sich eine sigmoidale Konzentrations-Effekt-

Kurve. Die nicht-lineare Regression dieser Kurve wird mit der Hillgleichung mit variabler Steigung (s. Formel 2) ermittelt.

Formel 2

$$y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{(1 + 10^{((\log \text{IC}_{50} - x) \cdot \text{Hillsteigung}))}}$$

y = Absorption
x = log[Zytostatikum], M
Bottom = niedrigster y – Wert
Top = höchster y – Wert
Hillsteigung = Steigung im Wendepunkt der Kurve
IC₅₀ = Substanzkonzentration mit 50% Vitalität versus Kontrolle

Anhand des Wendepunkts dieser Kurve kann der IC₅₀-Wert (= inhibitorische Konzentration 50%) ermittelt werden. Dies ist diejenige Substanzkonzentration, bei der die Vitalität der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 50% vermindert ist. Bildet man nun den Quotienten der IC₅₀-Werte zweier Zelltypen, ergibt sich hieraus ein Resistenz- bzw. Sensitivitätsfaktor, über den die verschiedenen Zellen miteinander verglichen werden können. Auf diese Weise wurde z.B. ermittelt, ob die Überexpression von hCtr1 bzw. hCtr2 im Vergleich zum Leervektor-Kontrollklon zu einer Veränderung der Sensitivität gegen Zytostatika führt. Neben dem IC₅₀-Wert wurde auch dessen negativer dekadischer Logarithmus (pIC₅₀) ermittelt. Da dieser als normal verteilt gilt, wurden statistische Tests mit pIC₅₀-Werten durchgeführt.

2.2.3.1 Durchführung des MTT-Assays

Der MTT-Assay kann in Platten verschiedener Größe durchgeführt werden. In der Regel wurde in dieser Arbeit mit 96-Well-Platten gearbeitet. Für die Experimente mit Docetaxel, Kupfer in Kombination mit Chlorpromazin und cisplatinhaltigen Liposomen wurde das 24-Well-Format gewählt. Die Überexpressionszellen wurden zur Induktion der Transkription der transfizierten Kupfertransportersequenz vier Tage vor Zusatz des Zytostatikums bzw. von CuSO₄ mit Induktionsmedium inkubiert. Während des Assays wurde Induktionsmedium ohne Selektionsantibiotika verwendet, da über den kurzen Zeitraum des Experiments nicht mit einem Verlust der künstlich eingebrachten DNA gerechnet werden musste.

2.2.3.2 MTT-Assay in 96-Well-Platten

Der Assay diente der Sensitivitätsbestimmung von Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen gegenüber verschiedenen Zytostatika sowie gegen Kupfer. Für die Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen

mussten die Platten mit Poly-L-Lysin beschichtet werden, da die Zellen nur sehr schlecht anhaften und sich während des Assays ablösen konnten. Jedes Well wurde dafür mit 40 µl Poly-L-Lysin-Lösung versetzt. Diese verblieb zum Einwirken für mind. 30 min. auf den Platten. Danach wurde die Lösung entfernt und jedes Well zweimal mit je 40 µl PBS 1x gespült. Die Platten wurden dann direkt verwendet oder bis zum Gebrauch bei 4-8°C gelagert. Die Zellen wurden wie unter 2.2.1.1. und 2.2.1.2. beschrieben geerntet und gezählt. Pro Well wurden i.d.R. 5000 Zellen ausgesät, für jede Konzentration der Testsubstanz in Triplikaten. Die Wells im äußeren Rand der Platte wurden wegen möglicher Verdunstungseffekte ausgespart und stattdessen mit je 90 µl PBS 1x oder autoklaviertem Reinstwasser befüllt. Die Zellen wuchsen mehrere Stunden oder über Nacht an. Danach wurden je 10 µl/Well der verschiedenen Verdünnungen der Testsubstanz mit Hilfe einer Multistep-Pipette zugesetzt und die Zellen für den gewünschten Zeitraum (wenn nicht anders angegeben für ca. 71 h) im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde jedes Well mit 20 µl MTT-Lösung versetzt und für 30-45 min. weiter inkubiert. Die Gesamtinkubationszeit mit der Testsubstanz betrug damit etwa 72 h. Traten in den unbehandelten Kontrollen die ersten Formazankristalle auf, wurde die Reaktion durch Entfernen des Überstands und anschließende Lyse mit 40-100 µl/Well DMSO gestoppt. Die Bildung größerer Mengen an Kristallen, die durch Verletzung der Zellmembranen zu einer Freisetzung von Dehydrogenasen und einer weiteren MTT-Umsetzung im Überstand hätten führen können, wurde dadurch vermieden. Das Formazan löste sich im zugesetzten DMSO und die Absorption wurde anschließend im Microplate-Reader Fluostar bei 544 nm vermessen. Um eine eventuelle Hintergrundabsorption durch Zellbestandteile zu berücksichtigen, wurde zusätzlich bei einer Wellenlänge von 690 nm vermessen und die erhaltenen Absorptionswerte in jedem Well von der entsprechenden Formazanabsorption subtrahiert. Mit diesen bereinigten Werten wurde die Auswertung vorgenommen.

Für MTT-Assays mit CuSO₄-Behandlung über 3 h wurden die Zellen nach Entfernung des kupferhaltigen Mediums vor der Messung für weitere 48 h mit kupferfreiem Induktionsmedium inkubiert. Für diesen kürzeren Zeitraum wurden pro Well 13'000 Zellen ausgesät.

2.2.3.3 MTT-Assay in 24-Well-Platten

Die Durchführung erfolgte prinzipiell wie im vorherigen Kapitel beschrieben. Pro Well wurden i.d.R. 30'000 Zellen ausgesät. Die verwendeten Volumina pro Well waren wie folgt:

- Poly-L-Lysinlösung und PBS1x zum Spülen: 250-300 µl
- Zellsuspension: 900 µl
- Lösung der Testsubstanz: 100 µl

- MTT-Lösung: 50 µl
- DMSO: 150 µl

Nach der Lyse in DMSO wurden 100 µl/Well der Formazanlösungen in eine 96-Well-Platte überführt und im Microplate-Reader Fluostar wie oben beschrieben vermessen.

2.2.3.4 MTT-Assay mit Cisplatin- und Kupfer-Coinkubation

Der Assay wurde wie in 2.2.3.2 beschrieben durchgeführt, jedoch wurden 8000 Zellen in 80 µl/Well ausgesät. Nach dem Anwachsen wurden 10 µl CuSO₄-Lösung bzw. für die Kontrollen 10 µl steriles Reinstwasser zugesetzt. Nach 2 h Inkubation im Brutschrank wurden pro Well 10 µl der entsprechenden Cisplatinverdünnungen dazu gegeben und die Zellen mit beiden Substanzen weitere 72 h inkubiert. Für einen Vergleich zwischen hCtr2-Klon und LV-Vergleichsklon konnte eine Kupferkonzentration von 10 µM auf der Platte verwendet werden. Für den hCtr1-Klon wurde eine Konzentration von nur 0,01 µM verwendet, da diese Zellen eine hohe Kupfersensitivität aufweisen und eine 74-stündige Inkubation mit 10 µM Kupfer nicht überlebt hätten.

2.2.3.5 MTT-Assay mit cisplatinhaltigen Liposomen (24-Well-Platten)

Die für diesen Assay benötigten Cisplatin-Liposomen und parallel dazu hergestellte NaCl-Vergleichsliposomen wurden freundlicherweise von Frau Michaela Borrmann (Arbeitskreis Prof. Dr. Gerd Bendas, Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um PEGylierte Liposomen. Der Cisplatingehalt der Liposomen wurde von Frau Borrmann durch flammenlose Atom-Absorptions-Spektrometrie bestimmt (zur Herstellung und Analyse der Liposomen vgl. Krieger et al. 2010). Aus dieser Stammlösung wurde mit NaCl-Lösung 0,9% (m/V) eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die maximale Cisplatinbeladung der Liposomen ist begrenzt, daher konnten nur acht verschiedene Konzentrationen verwendet werden. Die Lösungen wurden wie oben beschrieben durch Zugabe zu den Zellen auf der Platte zehnfach verdünnt, so dass die Endkonzentrationen wie folgt waren: 31,6 nM, 100 nM, 316 nM, 1 µM, 3,16 µM, 5,62 µM, 10 µM und 17,8 µM für. Von den Vergleichsliposomen, die NaCl 0,9% (m/V) enthielten, wurden entsprechende Verdünnungsreihen hergestellt. Als weiterer Vergleich diente jeweils eine Verdünnungsreihe mit freiem Cisplatin in den gleichen Konzentrationen wie die der Liposomenverdünnungen. Wegen der begrenzten Haltbarkeit wurden die Liposomenlösungen max. zwei Tage bei 4-8°C gelagert.

2.2.4 DNA-Platinierung und Uptake-Studien in Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen

Diese Untersuchungen wurden mittels ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry) durchgeführt. Bei der ICP-MS wird aus Argongas ein so genanntes Plasma erzeugt. Dabei werden Argonatome positiv ionisiert und mit Hilfe eines oszillierenden Magnetfelds ein Strom in das Gas induziert. Dieser führt zur Aufheizung und weiteren Ionisierung von Argon. Die Probe wird im Messgerät zerstäubt und im Plasma unter Verdampfung ebenfalls ionisiert. Diese Ionen werden im Hochvakuum durch elektromagnetische Felder von Photonen und Neutralteilchen abgetrennt und in einen Quadrupol-Massenfilter geleitet. Hier werden sie nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis getrennt und durch einen Detektor registriert (<http://www.icp-ms.de>; Stroh und Projahn 2011). Bei der DNA-Platinierung werden die Zellen mit Platinkomplex behandelt und anschließend die genomische DNA isoliert. Nach Lyse der DNA in HNO₃ wird die Platinmenge mittels ICP-MS bestimmt und auf die DNA-Menge bezogen. Das Ergebnis erlaubt eine Aussage über das Ausmaß der Bildung von DNA-Platinaddukten.

Es wurden 6,5 Mio jedes induzierten Flp-InTM T-RExTM-293-Klons in eine mit Polylysin beschichtete T75-Flasche ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Am Versuchstag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit Induktionsmedium versetzt, das 20 µM cDDP enthielt. Nach 2h wurden die Zellen direkt aufgearbeitet oder es wurde das Zytostatikum entfernt, die Zellen einmal mit 3 ml vorgewärmtem PBS 1x gewaschen und nach siebenstündiger weiterer Inkubation mit zytostatikafreiem Induktionsmedium bearbeitet. Als Kontrolle dienten Zellen, deren Nährmedium statt Zytostatikalösung eine entsprechende Menge NaCl-Lösung 0,9% (m/V) enthielt. Für die Aufarbeitung wurden die Zellen einmal mit 3 ml PBS 1x gewaschen und anschließend für 4 min. mit 3 ml Trypsin im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden abgeklopft und mit 7 ml eiskühlem Nährmedium in eine 50 ml PP-Röhre überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 1520 x g für 1 min. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml eiskaltem PBS 1x resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde das Pellet in 2 ml eiskaltem PBS 1x resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Der nächste Zentrifugationsschritt erfolgte bei 4°C und 18'620 x g für 1 min. Nach Absaugen des Überstands wurde das Pellet in 1,5 ml eiskaltem KHP 1x resuspendiert. Je Probe wurden 5-6 Aliquots à 25 µl für die Zellzahlbestimmung entnommen (für die Uptake-Messung) und in den Brutschrank gestellt. Außerdem wurden 300 µl der Suspension in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für die Uptakebestimmung bei -80°C eingefroren. Die restliche Zellsuspension wurde nochmals zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet für die DNA-Isolierung ebenfalls bei -80°C eingefroren. Für die Normalisierung der Uptakebestimmung wurden die dafür entnommenen 25 µl-Aliquots je nach Zelldichte mit jeweils 75-175 µl Eosinlösung 0,4% (m/V) versetzt und in einer Neubauerzählkammer gezählt. Die Zellzahl wurde wie in

Kap. 2.2.1.2. beschrieben berechnet und die Zellzahl in der für den Uptake entnommenen Probenmenge aus den Mittelwerten der jeweiligen Einzelzählungen bestimmt.

Für die Untersuchung der DNA-Platinierung wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut und die DNA mit dem my-Budget DNA Mini Kit nach Anleitung des Herstellers isoliert. Zum Verdau von RNA wurde an Stelle von 4 μl RNase A [100 mg/ml] 40 μl RNase A [10 mg/ml] eingesetzt. Die DNA-Konzentration wurde wie in Kapitel 2.2.5.7 beschrieben UV-spektrometrisch nach geeigneter Verdünnung in Tris-HCl-Puffer pH 7,0 bestimmt. Die Menge an DNA-Lösung wurde mit Hilfe einer Analysenwaage ausgewogen und eine Dichte von 1 angenommen. So konnte die Masse an gewonnener DNA bestimmt werden. Die DNA-Platinierung wurde dann als pg Platin/ μg DNA berechnet. Die DNA-Lösung wurde durch Gefriertrocknung und anschließende Vakuumzentrifugation getrocknet. Danach wurde jede DNA-Probe in 1,5 ml HNO_3 1% (V/V) durch Erwärmen gelöst und für 24 h bei 70°C im Trockenschrank lysiert. Um einen möglichen Verdunstungsverlust zu erfassen, wurden die Proben vor und nach dem Erhitzen gewogen und die entsprechenden Volumenverluste bei der Konzentrationsberechnung berücksichtigt.

Die Vermessung der Proben erfolgte mit einem Varian 820-MS ICP Mass-spectrometer der Firma Agilent Technologies im Arbeitskreis von Dr. Ralf Axel Hilger am Universitätsklinikum Essen in Zusammenarbeit mit Herrn Dennis Alex. Die Proben wurden in 15 ml PP-Röhren überführt und mit 0,5 % (V/V) internem Standard versetzt. Der interne Standard enthielt je 2 ppb Indium, Rhodium und Iridium in HNO_3 1% (V/V) mit Triton X 100 [500 $\mu\text{l/l}$]. Triton X 100 dient der Verminderung von Ablagerungen im Messgerät. Die Messwerte wurden anschließend auf den internen Standard bezogen, so dass eventuelle Probenverluste bei der Messung berücksichtigt und die Genauigkeit der Messung dadurch erhöht werden konnte. Vor der Messung wurde mit Standardverdünnungen eine Kalibriergerade erstellt (5, 10, 50, 100, 500, 1000 und 2000 ppt Platin). Anschließend wurde die erfolgreiche Kalibrierung durch Quantitätskontrollen (10, 100, 1000 und 2000 ppt Platin) überprüft. Die Kalibrierung wurde akzeptiert, wenn die gemessenen Werte max. 20% (bzw. 15% für die 10 ppt-Kontrolle) vom entsprechenden Kalibrierwert abweichen. Nach der Probenmessung wurde eine Qualitätskontrolle mit den gleichen Konzentrationen durchgeführt. Die Messung wurde wiederum bei einer maximalen Abweichung von 20 bzw. 15% vom Sollwert akzeptiert. Bei allen Messungen wurde der Gehalt der Platinisotope Pt^{194} , Pt^{195} und Pt^{196} untersucht. Die Messwerte waren für alle Isotope sehr ähnlich, i.d.R. wurde für die Auswertung jedoch das in der Natur am häufigsten vorkommende Isotop Pt^{195} verwendet.

Für die Bestimmung des Uptakes wurde die Zellsuspension aufgetaut, mit dem gleichen Volumen an HNO_3 2% (V/V) versetzt und mit HNO_3 1% (V/V) auf 1,5 ml aufgefüllt. Anschließend wurde wie oben beschrieben lysiert und nach geeigneter Verdünnung in HNO_3 1% (V/V) mit Triton X 100 [500 $\mu\text{l/l}$] und Zusatz von internem Standard der Pt-Gehalt gemessen. Dieser wurde für jede Probe auf die Zellzahl normalisiert. Die Ergebnisse wurden als Pt [pg]/Mio. Zellen berechnet.

2.2.5 Expressionsstudien auf Transkriptionsebene mittels RT-qPCR

Wird ein Gen in verschiedenen Zellen oder Geweben unterschiedlich stark transkribiert, so spiegelt sich dies in dem Vorkommen unterschiedlicher Mengen der entsprechenden mRNA wider. Es ist wahrscheinlich, dass die Zellen mit der größeren Anzahl an mRNA-Kopien auch mehr des entsprechenden Genprodukts bilden. Isoliert man RNA aus verschiedenen Proben, schreibt die mRNA mittels Reverser Transkription in DNA um (*copy-DNA bzw. c-DNA*) und untersucht diese mittels quantitativer PCR (qPCR), so lassen sich die Genexpressionen der verschiedenen Proben miteinander vergleichen. Hierbei handelt es sich um einer relative Quantifizierung. Das Prinzip der PCR wurde bereits in Kapitel 2.2.2.5 beschrieben. Bei der quantitativen PCR, auch Real-Time-PCR genannt, macht man sich den exponentiellen Zusammenhang der Reaktionskinetik für quantitative Bestimmungen zu Nutze. Diesen kann man verfolgen, wenn man dem Reaktionsansatz beispielsweise den Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I zusetzt. Dieser lagert sich in *doppelsträngige* DNA ein, wodurch seine Fluoreszenz um ein Vielfaches verstärkt wird. Nach jeder Elongationsphase wird die Fluoreszenzintensität gemessen (z.B. mit LED-Technik).

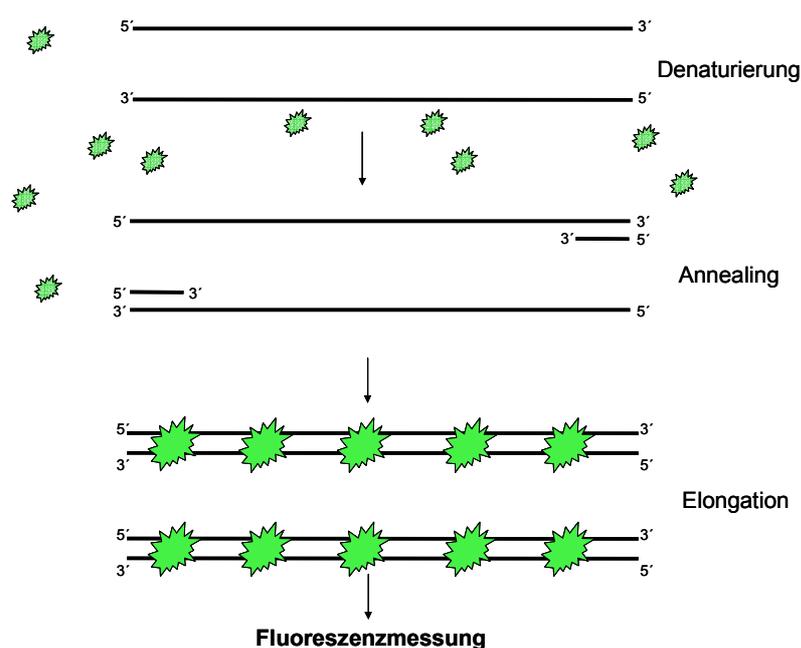


Abb. 2-4: Funktionsprinzip der qPCR

Da die Anzahl der DNA-Moleküle von Zyklus zu Zyklus steigt, nimmt auch die Fluoreszenz immer weiter zu. Während der ersten Zyklen ist sie noch schwach und von der Hintergrundfluoreszenz nicht zu unterscheiden, dann kommt es gemäß der DNA-Vervielfältigung zu einem exponentiellen Anstieg. Unter optimalen Reaktionsbedingungen kommt es zu einer Verdopplung der DNA-Menge in jedem Zyklus, die so genannte *Effizienz* der Reaktion ist $E=2$ bzw. 100%. Irgendwann flacht die Fluoreszenzkurve ab und geht in ein Plateau über. Dies ist durch den stetigen Verbrauch von Primern und dNTP sowie durch die begrenzte Aktivität der Polymerase zu erklären. Für eine quantitative Auswertung kann nur der exponentielle Teil der Reaktion verwendet werden. Die Vervielfältigung der DNA erfolgt hier nach folgendem mathematischen Zusammenhang:

Formel 3:

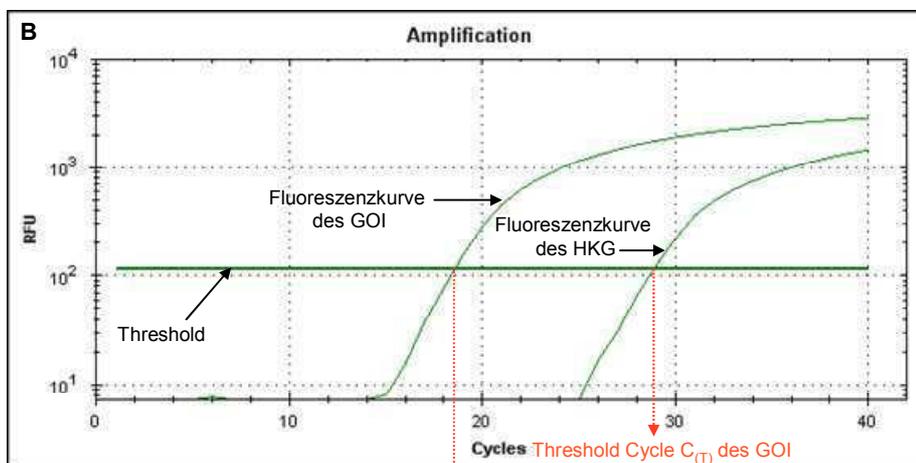
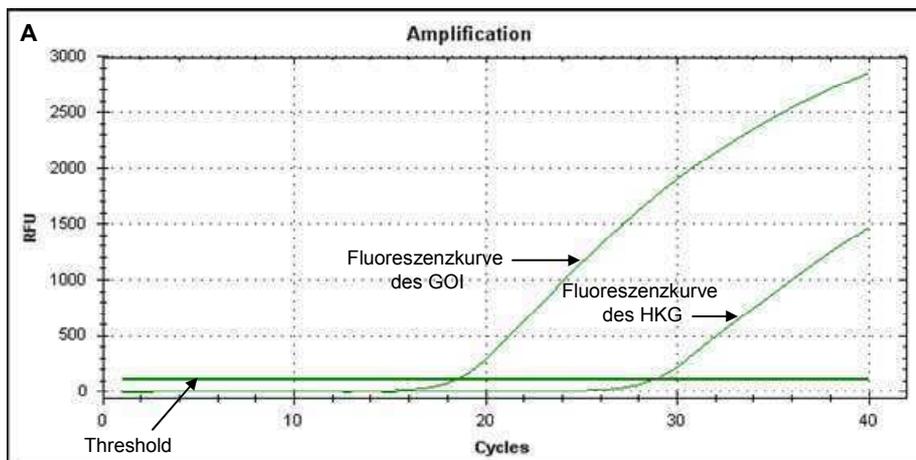
$$X_n = X_0 \cdot E^n$$

X_n = Anzahl der DNA – Moleküle nach n Zyklen

X_0 = Anzahl der DNA – Moleküle vor der Reaktion

E = Effizienz (im Idealfall = 2)

n = Anzahl der Zyklen



Threshold Cycle $C_{(T)}$ des HKG

Abb. 2-5: Beispielhafte Darstellung der Fluoreszenzkurve eines qPCR-Experiments (CFX Manager Software 1.5, Bio-Rad Laboratories, Hercules/USA). Aufgetragen sind die Fluoreszenzeinheiten (A) bzw. deren Logarithmus (B) über der Zykluszahl; GOI = Gene of Interest, HKG = Housekeeping-Gen.

Nach erfolgter Reaktion (über 35-40 Zyklen) wird die Fluoreszenzkurve angezeigt, wobei die Fluoreszenzintensität gegen die Zyklen aufgetragen wird. In den exponentiellen Bereich der Kurve wird ein sog. *Fluoreszenzschwellenwert (Threshold)* parallel zur X-Achse gelegt (Abb. 2-5 A). Dieser Bereich kann linear dargestellt und damit besser sichtbar gemacht werden, indem man die Kurve halblogarithmisch aufträgt (Abb. 2 -5 B).

Dort wo der Threshold die Kurve schneidet, wird auf der X-Achse der $C_{(T)}$ -Wert (Threshold Cycle) abgelesen, also der Zyklus, in dem die Fluoreszenz erstmalig den Threshold übersteigt.

Mit Hilfe der $C_{(T)}$ -Werte kann die Genexpression des Gene of Interest (GOI) in verschiedenen Proben verglichen werden. Da bei der RNA-Quantifizierung und der Reversen Transkription Ungenauigkeiten auftreten können, muss in jeder Probe ein interner Standard bestimmt werden. Dieser besteht aus der Expressionsbestimmung von ein bis drei so genannten Housekeeping-Genen (HKG). Dies sind meist Gene für Strukturproteine oder Enzyme, die relativ unabhängig von äußeren Einflüssen nahezu konstant exprimiert werden. Die Expression des GOI wird dann auf die Expression der HKG bezogen und damit als *normalisierte Expression* angegeben. Die Auswertung erfolgte in Anlehnung an die $2^{-\Delta\Delta C_{(T)}}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001) und die von van de Sompele et al. beschriebene Methode zur Normalisierung auf mehrere HKG (Vandesompele et al. 2002).

Jedes untersuchte Gen wurde in Duplikaten vermessen und die jeweiligen $C_{(T)}$ -Werte wurden bestimmt. Aus diesen wurden für jedes Gen der arithmetische Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) berechnet. Für beide HKG wurde jeweils der $\Delta C_{(T)}$ gebildet (s. Formel 4) und daraus die normalisierte Expression berechnet (s. Formel 5).

Formel 4:

| |
|--|
| $\Delta C_{(T) 1} = C_{(T)} (GOI) - C_{(T)} (HKG)_1$ $\Delta C_{(T) 2} = C_{(T)} (GOI) - C_{(T)} (HKG)_2$ $C_{(T)} : \text{Threshold Cycle (MW aus zwei Replikaten)}$ $1,2 : \text{HKG1 bzw. HKG2}$ |
|--|

Formel 5:

$$NE_1 = 2^{-\Delta C_{(T)1}}$$

$$NE_2 = 2^{-\Delta C_{(T)2}}$$

NE : Normalisierte Expression

Danach wurden die so erhaltenen, auf zwei verschiedene HKG normalisierten Expressionswerte gemittelt. In Anlehnung an die Berechnung der Quantities bei van de Sompele et al. wurde hierfür nicht das arithmetische sondern das geometrische Mittel verwendet, da dieses weniger anfällig gegenüber Ausreißern ist (Vandesompele et al. 2002).

Formel 6:

$$NE_{GEO} = \sqrt{NE_1 \cdot NE_2}$$

NE_{GEO} : Geometrischer Mittelwert

Innerhalb eines Experiments erfolgte die Fehlerfortpflanzung gemäß dem Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz mit der allgemeinen Formel (Wätzig et al. 2008):

Formel 7:

$$SD_{ges} = \sqrt{\sum SD_i^2 \cdot \left(\frac{\delta y}{\delta x_i}\right)^2}$$

SD_{ges} : Gesamts tan dardabweichung
 SD_i : S tan dardabweichung des Parameters x_i
 y : fehlerbehaftete Größe, abhängig von den Parametern x_1 bis x_n

Auf die Formeln 5-7 angewendet berechnete sich die Fehlerfortpflanzung wie folgt:

Formel 8:

$$SD_{\Delta C_{(T)}} = \sqrt{(SD_{C_{(T)GOI}})^2 + (SD_{C_{(T)HKG}})^2}$$

$$SD_{NE} = SD_{\Delta C_{(T)}} \cdot NE \cdot \ln 2$$

$$SD_{NE_{GEO}} = NE_{GEO} \cdot \sqrt{(SD_{NE_{HKG1}} / (2 \cdot NE_{HKG1}))^2 + (SD_{NE_{HKG2}} / (2 \cdot NE_{HKG2}))^2}$$

Zum Vergleich zweier Proben x und y wurden die gemittelten normalisierten Expressionen zueinander ins Verhältnis gesetzt (Fold change):

Formel 9:

$$\text{Fold change} = \frac{NE_{\text{GEO}(x)}}{NE_{\text{GEO}(y)}}$$

Der Fehler berechnete sich entsprechend:

Formel 10:

$$SD_{\text{Fold change}} = \frac{SD_{NE_{\text{GEO}(x)}}}{NE_{\text{GEO}(y)}}$$

Bei einer Mittelung der normalisierten Expressionen aus verschiedenen Experimenten wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung gebildet und daraus ggf. Fold Change-Werte berechnet.

Die Expression der vier Kupfertransporter wurde in Gewebeproben aus humanen Ovarialkarzinomen sowie in verschiedenen sensitiven und cisplatinresistenten Tumorzellpärchen (vgl. Tabelle 2-10) und den transfizierten Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen untersucht. Bei der RNA-Isolierung wurde darauf geachtet, dass die Konfluenz der Zellen 90-95% nicht überstieg, um Stress der Zellen und dadurch bedingte Expressionsänderungen zu vermeiden.

2.2.5.1 RNA-Isolierung

Für die Aufreinigung der Gewebeproben wurden das RNeasy[®] Minikit und das my-Budget RNA Mini Kit verwendet. Hierbei wird RNA an Kieselgel-Membranen in einer Art kleinen Chromatographiesäule gebunden und durch mehrere Waschschrte von anderen Bestandteilen befreit. Anschließend wird die RNA mit nucleasefreiem Wasser eluiert.

Für die Gewebezerkleinerung wurde ein Dismembrator mit passenden Teflongefäßen und Stahlkugeln verwendet, welche in flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurden. Die gefrorenen Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff transportiert und zügig unter Vermeidung des Auftauens der Probe grob zerkleinert und gewogen. Ca. 20-100 mg Probe wurden zusammen mit einer Stahlkugel in das vorgekühlte Teflongefäß gegeben und 10-40 sec. im Dismembrator zerkleinert. Das pulverisierte Gewebe wurde sofort in Lysepuffer überführt. Die Aufreinigung der RNA sowie der DNase-Verdau erfolgten nach den Herstellerangaben.

Die in Tabelle 2-10 aufgeführten Tumorzellpärchen wurden in T25-Flaschen kultiviert. Bei einer Konfluenz von maximal 90% wurden die Zellen auf Eis gestellt, der Überstand abgesaugt und mit 1 ml eiskaltem PBS 1x gewaschen. 400 µl Lysispuffer RL (my-Budget RNA Mini Kit) wurden auf dem Flaschenboden verteilt und die Zellen damit für 2 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber vollständig abgelöst, die Lösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C eingefroren. Für die RNA-Isolierung mit dem my-Budget RNA Mini Kit wurden die Proben auf Eis aufgetaut und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Die Flp-InTM T-RExTM-293-Klone wurden in T25-Flaschen kultiviert und die RNA mit dem my-Budget RNA Mini Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Der Gehalt der RNA-Proben wurden nach geeigneter Verdünnung in Reinstwasser oder TE 1x wie unter 2.2.5.7 beschrieben UV-spektrometrisch bestimmt.

2.2.5.2 Reverse Transkription (RT) von mRNA

Mit Hilfe einer reversen Transkriptase kann RNA in DNA umgeschrieben werden. Verwendet man Primer mit einem Poly-Thymidin-Rest, wird spezifisch nur mRNA umgeschrieben, da nur diese poly-adenyliert vorliegt. Für die RT wurde mit Oligo(dT)₂₃ anchored Primern gearbeitet und alle anderen Bestandteile aus dem High Capacity cDNA Archive Kit verwendet. Die Ansätze wurden nach dem in Tabelle 2-17 angegebenen Schema pipettiert und 2 h bei 37°C im PCR-Cycler inkubiert. Anschließend wurden jeder Probe 100 µl TE 1x zugesetzt und die cDNA bei -20 °C eingefroren. Vor der Verwendung wurden die Proben auf Eis aufgetaut.

| <i>Komponente</i> | <i>Menge</i> |
|--|--------------|
| RNA | ca. 1 µg |
| Reaktionspuffer 10x | 1 µl |
| dNTP 25x | 0,4 µl |
| Oligo(dT) ₂₃ -Primer [0,5 µg/µl] | 0,5 µl |
| Reverse Transkriptase [1:5 verdünnt in Ampuwa-Wasser] | 2,5 µl |
| Ampuwa-Wasser | ad 10 µl |

Tab. 2-17: Pipettierschema für die RT

2.2.5.3 Primerdesign

Einige Primer standen aus den Arbeiten von E. Gosepath, S. Weykam und C. Stratenschulte zur Verfügung. Da die vorhandenen hCtr1-Primer auch an das Ctr1-Pseudogen binden, wurden Primer synthetisiert, die spezifisch für hCtr1 sind („hCtr1-spezifisch“). Allerdings konnten hierbei keine Exon-Exon-Schnittstellen berücksichtigt werden, d.h. dass auch ggf. vorhandene Verunreinigungen genomischer DNA mit erfasst worden wären. Daher wurden die mit diesen Primern untersuchten Gewebeproben bei der RNA-Aufreinigung einem DNase I-Verdau unterworfen (vgl. Kapitel 2.2.5.1). Für das Design der Primersequenzen wurde das Programm Primer 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) verwendet. Die Länge eines Primers sollte für eine ausreichende Spezifität mind. 18 Basen betragen. Jedoch sollten Primer auch nicht zu lang sein, um eine effiziente Bindung zu gewährleisten. Daher wurden für die qPCR-Experimente Primer mit einer Länge zwischen 18 und 28 Basen verwendet. Die optimale Annealingtemperatur hängt mit der Schmelztemperatur zusammen, also der Temperatur, bei welcher die Hälfte der Primer an das Template gebunden vorliegt. Daher wurde darauf geachtet, dass Länge, der Gehalt an Guanin und Cytosin und die damit zusammenhängenden Schmelztemperaturen für den linken und rechten Primer jeweils ähnlich waren, um eine möglichst für beide Primer optimale Annealingtemperatur zu gewährleisten. Die resultierende Produktlänge für die qPCR lag bei 100-150 bp, was für eine Quantifizierung mit SYBR[®] Green-I optimal ist. Die Sequenzen der Primer für TBP sind bei Li et al. beschrieben (2009). Die Primer wurden von der Firma MWG/Operon synthetisiert.

2.2.5.4 Bestimmung der Primereffizienz

Von einer cDNA- oder geeigneten Plasmidlösung wurden 4-5 verschiedene Verdünnungen in TE 1x hergestellt und wie in Kap. 2.2.5.6 beschrieben eine qPCR durchgeführt. Trägt man die $C_{(T)}$ -Werte über dem dekadischen Logarithmus der relativen Konzentration auf, so ergibt sich eine Gerade. Liegt die Steigung nach linearer Regression bei -3,33, so entspricht dies einer Effizienz von 100%, d.h. die DNA wird in jedem Zyklus verdoppelt, die PCR verläuft also optimal. Mit Hilfe der Geradensteigung kann die Effizienz der Reaktion nach Formel 11 berechnet werden (vgl. Stratenschulte, Diplomarbeit 2005). In gewissem Maße sind Abweichungen von diesem Ideal tolerabel, wenn nur ein relativer quantitativer Vergleich zwischen verschiedenen Proben angestellt wird, da für alle Proben die gleichen Primer verwendet werden.

Formel 11:

$$E [\%] = \left(10^{\frac{1}{\text{Steigung}} - 1} \right) \cdot 100$$

2.2.5.5 Optimierung der Housekeeping-Gene

Housekeeping-Gene (HKG) codieren meist für Strukturproteine oder Enzyme. Sie werden idealerweise unabhängig von äußeren Einflüssen gleichmäßig stark exprimiert. Ein perfektes HKG gibt es nicht, aber es sind einige Gene bekannt, die diese Bedingung zumindest annähernd erfüllen. Für vergleichende Genexpressionsstudien, z.B. an sensitiven und zytostatika-resistenten Sublinien eines Tumorzelltyps, werden idealerweise im Vorfeld die besten 2-3 aus einer größeren Auswahl an HKG ermittelt. In dieser Arbeit wurde für die verwendeten Tumorzellpärchen eine HKG-Optimierung vorgenommen. Für die untersuchten Gewebeproben aus Ovarialkarzinomen wurden die Gene für Glucuronidase beta (GUSB) und TATA-Box binding protein (TBP) als HKG verwendet, die sich bei Li et al. für solche Proben als besonders geeignet erwiesen.

Für die HKG-Optimierung wurde wie unter 2.2.5.6 beschrieben eine qPCR mit einer Auswahl an Primern für HKG durchgeführt. Dabei wurden alle Tumorzellen in einem gemeinsamen PCR-Lauf untersucht. Da die Anzahl der Proben zu groß war, um Duplikate zu vermessen, wurden zwei PCR-Läufe mit je einem Replikat durchgeführt und daraus mittlere $C_{(T)}$ -Werte und Standardabweichungen berechnet. Aus diesen wurden für jede Probe und jedes untersuchte Kandidaten-HKG wie von van de Sompele et al. beschrieben gemäß Formel 12 Quantities gebildet. Diese wurden mit dem Programm geNorm ausgewertet. Letzteres ermittelt HKG die zwischen den zu vergleichenden Proben am gleichmäßigsten exprimiert werden und damit am besten zur Standardisierung geeignet sind. Die beiden besten Kandidaten wurden für die nachfolgenden Untersuchungen als HKG ausgewählt (Vandesompele et al. 2002; geNORM manual).

Formel 12:

$$Q = E^{(C_{(T)\min} - C_{(T)i})}$$

Q = Quantity
 E = Effizienz (2 bei 100%)
 $C_{(T)\min}$ = kleinster $C_{(T)}$ – Wert unter allen Proben
 $C_{(T)i}$ = $C_{(T)}$ – Wert der jeweiligen Probe
 Q = 1 für die Probe mit dem kleinsten $C_{(T)}$ – Wert,
 also der höchsten Expression

2.2.5.6 Durchführung der qPCR

Zunächst wurde – um die Anzahl der notwendigen Pipettierschritte zu reduzieren – eine Mischung aus PCR-Mastermix und cDNA der jeweiligen Probe hergestellt (s. Tab. 9). Pro Well wurden dabei 0,6 – 1 μ l cDNA-Lösung eingesetzt. Die einzelnen Reaktionskompo-

nenten wurden dann wie in Tab. 10 angegeben in die einzelnen Wells der Reaktionsplatte pipettiert. Nach dem Pipettieren der Primer wurde die Platte um 90° gedreht, damit es bei dem nachfolgenden Pipettierschritt nicht zu Kreuzkontaminationen kam. Die Reaktionskomponenten wurden anschließend kurz herunter zentrifugiert und nach dem in Tabelle 2-20 angegebenen Protokoll im Thermocycler inkubiert. Zu diesem Protokoll gehörte auch eine sich an die Amplifikation anschließende Schmelzkurvenbestimmung. Da die entstandenen PCR-Produkte einen von ihrer Länge und ihrem Mengenanteil an Adenosin/Thymidin- bzw. Guanosin/Cytidin-Paaren spezifischen Schmelzpunkt aufweisen, lässt sich hierüber die Spezifität der Reaktion überprüfen. Dabei erhöht der Thermocycler sukzessive die Temperatur von 65 bis 95°C und misst in Abständen von 0,5°C die Fluoreszenzintensität. Trägt man diese gegen die Temperatur auf, erhält man eine Fluoreszenzkurve. Am Schmelzpunkt des PCR-Produkts kommt es auf Grund der Aufspaltung der Wasserstoffbrücken im DNA-Doppelstrang zur Freisetzung des SYBR®Green-I-Farbstoffs und damit zu einem starken Abfall der Fluoreszenz. Trägt man die erste Ableitung der Fluoreszenzkurve über der Temperatur auf, so ist bei einer spezifischen Reaktion nur ein distinkter Peak zu beobachten, der dem Schmelzpunkt entspricht. Dies bedeutet, dass nur das gewünschte PCR-Produkt entstanden ist. Die Reaktion war also spezifisch und die Daten können für die quantitative Bestimmung verwendet werden.

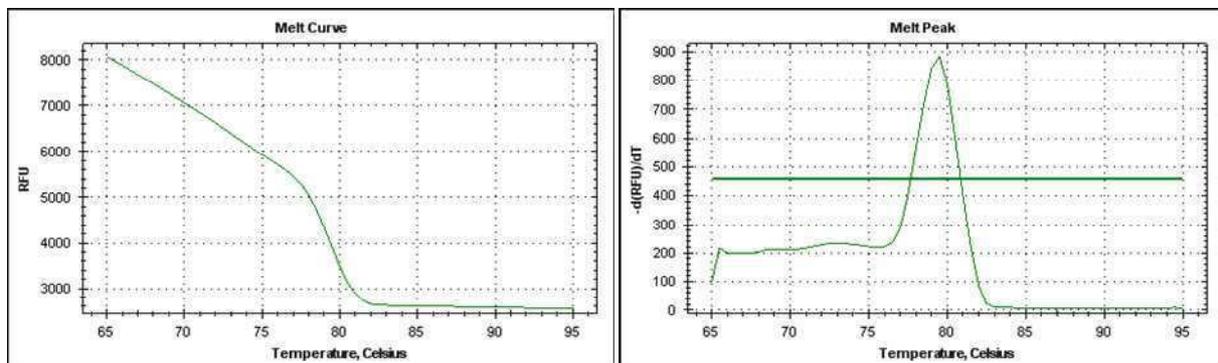


Abb. 2-6: Beispielhafte Darstellung einer Schmelzpunktkurve eines qPCR-Produkts sowie der Auftragung der ersten Ableitung zur Bestimmung des Schmelzpunkts.

Für jede Probe wurden die gewünschten Genes of Interest (GOI) sowie zwei Housekeeping-Gene (HKG) jeweils in Duplikaten vermessen.

| Komponente | Volumen [μ l] Pro Well (Gewebeproben und Überexpressionsklone) | Volumen [μ l] Pro Well (Tumorzellen) |
|---|---|--|
| Power SYBR [®] Green PCR Master Mix | 5 | 5 |
| cDNA-Lösung | 0,6 | 1 |
| Ampuwa-Wasser | 0,4 | - |

Tab. 2-18: qPCR - Pipettierschema I

| Komponente | Volumen [μ l] |
|-------------------------|--------------------|
| cDNA/Mastermix-Mischung | 6 |
| Primer Mischung | 4 |
| Gesamtvolumen | 10 |

Tab. 2-19: qPCR - Pipettierschema II

| Schritt Nr. | Teilreaktion | Temperatur [$^{\circ}$ C] | Zeit |
|-------------|--|----------------------------|-------------------------|
| 1 | Erste Denaturierung/Polymerase- Aktivierung | 95 | 15 min. |
| 2 | Denaturierung | 94 | 20 sec. |
| 3 | Annealing | 57 | 30 sec. |
| 4 | Elongation | 72 | 35 sec. |
| Plateread | Fluoreszenzmessung | | |
| | 39 x Wiederholung ab Schritt 2 | | |
| 5 | Finale Elongation | 50 | 1 min. |
| 6 | Schmelzpunktkurve | 65-95; Inkrement: 0,5 | 0,5 sec./Inkrement |
| Plateread | Fluoreszenzmessung | | nach jedem Inkrement |
| 7 | Abkühlung | 16 | ∞ |

Tab. 2-20: qPCR – Protokoll

2.2.5.7 UV-spektroskopische Quantifizierung von Nucleinsäuren

Nucleinsäuren zeigen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Sofern die Absorptionen im Bereich von 0,1-1 liegen, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen

Absorption und Gehalt (40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA entsprechen einer Absorption von 1). Durch diesen Zusammenhang lassen sich Nucleinsäurekonzentrationen aus der Absorption berechnen (s. Formel 13). Um das Ausmaß an Verunreinigungen durch Proteine zu beurteilen, die in nachfolgenden Reaktionen einen störenden Einfluss haben könnten, wurde außerdem eine Absorptionsmessung bei 280 nm durchgeführt. Der Quotient Abs_{260nm}/Abs_{280nm} sollte in einem Bereich von ca. 1,8-2 liegen (Schrimpf 2002).

Formel 13:

| |
|---|
| $C_{dsDNA} [\mu\text{g} / \text{ml}] = A_{260} \cdot 50 \cdot \text{VF}$ $C_{RNA} [\mu\text{g} / \text{ml}] = A_{260} \cdot 40 \cdot \text{VF}$ $A_{260} = \text{Absorption bei 260 nm}$ $\text{VF} = \text{Verdünnungsfaktor}$ |
|---|

2.2.6 Agarose-Elektrophoresen mit Nucleinsäuren

Nucleinsäuren tragen durch die Phosphatreste der Nucleotide eine negative Gesamtladung. In einem elektrischen Feld wandern sie in Richtung Anode. Das Verhältnis aus Größe und Ladung ist für alle Nucleinsäuren gleich (eine negative Ladung pro Nucleotid). Daher können Nucleinsäuren durch Elektrophorese auf Grund ihrer unterschiedlichen Größe voneinander getrennt werden. Dies dient der Aufreinigung oder Identifizierung bzw. bei RNA-Elektrophoresen der Überprüfung der Integrität. Für die beiden zuletzt genannten Anwendungen wurde den Proben SYBR[®]Green-II-Lösung zugesetzt, welches nach Komplexbildung mit Nucleinsäuren und Anregung mit UV-Strahlung ebenfalls stark fluoresziert. Auf diese Weise konnten Nucleinsäuren unterschiedlicher Größe als Banden identifiziert werden. Für die Bestimmung der Größe wurde die Lage dieser Banden mit denen eines Standards („Leiter“) mit Nucleinsäuren verschiedener, bekannter Größen verglichen. SYBR[®]Green-II dient in erster Linie dem Nachweis von RNA und einsträngiger DNA. Doppelsträngige DNA (dsDNA) kann hiermit jedoch ebenfalls angefärbt werden. Da in dieser Arbeit keine genaue Quantifizierung der dsDNA durchgeführt wurde, konnte auch hier mit SYBR[®]Green-II gearbeitet werden.

Für die Trennung von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau wurde auf die Verwendung von SybrGreen[®]II andere interkalierende Farbstoffe verzichtet, da dies zu Mutationen führen kann. Dadurch hätten sich möglicherweise Probleme bei der Klonierung ergeben. Stattdessen wurde das Agarosegel mit Kristallviolett versetzt (vgl. nachfolgendes Kapitel.)

2.2.6.1 DNA-Elektrophoresen

Agarose wurde zu 1,2 bzw. 1% (m/V) in TAE-Puffer 1x durch wiederholtes Aufkochen und Rühren gelöst. Die Lösung wurde unter weiterem Rühren auf etwa 50°C abkühlen gelassen und das Gel in eine Gießform mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde dieses in die mit TAE 1x gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und der Kamm für die Probetaschen vorsichtig entfernt.

Um zunächst den Erfolg der PCR für die Klonierung zu überprüfen, wurden 3-5 µl PCR-Produkt mit einer entsprechenden Menge an Loading Dye 6x + SDS so gemischt, dass dieser danach einfach konzentriert vorlag. Die Mischung wurde bei 65°C für 10 min. erhitzt. Dabei wurden durch das enthaltene SDS andere PCR-Bestandteile wie die Polymerase und BSA denaturiert und so die Laufeigenschaften der DNA verbessert. Dies erhöhte die Vergleichbarkeit zu den Banden der ebenfalls aufgetragenen DNA-Leiter und damit die Identifizierung der korrekten Größe des PCR-Produkts. Zum Schluss wurden jeder Probe sowie der DNA-Leiter 1-2 µl SYBR[®]Green-II-Lösung [1:100] zugesetzt und die Taschen beladen.

Für die Aufreinigung des geschnittenen pcDNA5/FRT/TO[®]-Plasmids nach dem Restriktionsverdau (vgl. Kap. 2.2.2.9) wurden der Agaroselösung vor dem Gießen des Gels wenige Tropfen einer Kristallviolett-Lösung zugesetzt. Die Proben wurden hier nur mit einer geeigneten Menge Gelladepuffer ohne SDS-Zusatz versetzt.

Die Elektrophoresen liefen bei ca. 85 Volt bis zu einer geeigneten Laufhöhe der DNA-Banden.

2.2.6.2 RNA-Elektrophoresen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erscheinen im UV-Licht bei intakter RNA zwei distinkte Banden der ribosomalen RNA (18S und 28S). Messenger-RNA-Moleküle sind zu klein und können nicht detektiert werden. Ein „Bandenschmier“ weist auf die Degradation der rRNA hin. Damit ist auch von einer degradierten mRNA auszugehen und die Proben können für RT-qPCR-Experimente nicht verwendet werden.



Abb. 2-7: Elektrophorese mit RNA-Proben; *links*: degradierte, *rechts*: intakte RNA

Um eine Kontamination mit RNasen so gering wie möglich zu halten, wurden Bechergläser, Spatel und Alufolie zum Einwiegen der Agarose über Nacht bei 220°C im Trockenschrank erhitzt. Kunststoffgeräte wurden mit einer Lösung von 0,1 M NaOH und 1 mM EDTA (gelöst in DEPC-Wasser) und anschließend mit DEPC-Wasser abgespült. Für das Agarosegel, sowie die Herstellung und Verdünnung von HEPES-Puffer wurde ebenfalls DEPC-Wasser verwendet. Die Zusammensetzung des Gels ist in Tabelle 2-21 angegeben. Formaldehyd dient der Denaturierung der einsträngigen RNA, um die Laufeigenschaften im Agarosegel zu verbessern.

| <i>Komponente</i> | <i>Menge</i> |
|-------------------------|--------------|
| Agarose | 1,2 g |
| DEPC-Wasser | 54 ml |
| HEPES-Puffer 10x | 6 ml |
| Formaldehydlösung [37%] | 1 ml |

Tab. 2-21: Zusammensetzung des Agarosegels 2% (m/V) für RNA-Elektrophoresen

Die Agarose wurde durch mehrmaliges Aufkochen und Rühren in DEPC-Wasser gelöst. Danach wurde der HEPES-Puffer zugegeben und unter Rühren auf ca. 50°C abkühlen gelassen. Anschließend wurde die Formaldehydlösung zugesetzt und das Gel in eine Gießform mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde dieses in die mit HEPES-Puffer 1x gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und der Kamm für die Probetaschen vorsichtig entfernt. Von jeder RNA-Probe wurde ein Volumen abgefüllt, das ca. 2 µg RNA enthielt und mit so viel Loading dye 6x versetzt, dass dieser in der Mischung einfach konzentriert vorlag. Alternativ konnte auch Loading dye 2x verwendet werden. Nach dem Zusatz von je 1-2 µl SYBR[®]Green-II-Lösung [1:100] wurden die Proben in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese lief bei 100 Volt über ca. 45 min. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht analysiert.

2.2.7 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot

2.2.7.1 Proteinisolierung

Es wurden je 1 Mio Zellen in T75- bzw. 2,5 Mio Zellen in T175-Flaschen ausgesät und vier Tage mit Induktionsmedium oder zum Vergleich mit Nährmedium ohne Doxycyclin kultiviert. Für die Proteinisolierung wurde auf Eis gearbeitet. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 3 ml eiskaltem PBS 1x gewaschen. Anschließend wurden 0,5 ml Lysispuffer No. 6 durch Schwenken in der Zellkulturflasche verteilt und die Zellen mit einem Schaber abgelöst. Das Lysat wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C

30 min. lang geschüttelt. Danach erfolgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei $18'620 \times g$ und 4°C . Dabei wurden andere Bestandteile wie z.B. DNA gefällt, während die Proteine in der Lösung verblieben. Dieser Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und aliquotiert. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurden die Proben - sofern nicht anders angegeben – im Verhältnis 1:1 mit Lämmli-puffer 2x bei 95°C verdünnt und für 5 min. erhitzt. Dies führt zur Denaturierung der Proteine und zur Anlagerung von SDS in stöchiometrischen Mengen. Die Nettoladung der Proteine wird dadurch negativ und alle Proteine haben dasselbe Masse/Ladungsverhältnis. Dies ist die Voraussetzung dafür, dass die Proteine ausschließlich nach ihrer Masse getrennt werden und Eigenladungen keinen Einfluss auf die Beweglichkeit haben.

Für einige Versuche wurden die Proben vor der SDS-PAGE anderweitig behandelt. Dies ist im Ergebnisteil entsprechend vermerkt.

2.2.7.2 Membranpräparation

Vier Tage vor der Präparation wurden pro Zelltyp zweimal je 3 Mio Zellen in T175-Flaschen ausgesät. Für eine Induktion der Überexpression wurde doxycyclinhaltiges Nährmedium verwendet. Während der gesamten Membranpräparation wurde auf Eis gearbeitet. Das Nährmedium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 5 ml eiskaltem PBS 1x gewaschen. Anschließend wurden erneut 2-3 ml des eiskalten PBS 1x auf die Zellen gegeben und diese mit einem Schaber abgeerntet. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und in eine 50 ml PP-Röhre überführt. Dabei wurden für jeden Zelltyp die Zellsuspensionen aus beiden T175-Flaschen vereint. Die Zellsuspension wurde mehrmals für je 20 sec. mit einem Ultra-Turrax[®] bearbeitet. Das Homogenisat wurde in autoklavierte Zentrifugiergefäße überführt und bei $600 \times g$ und 2°C für 2 min. zentrifugiert. Hierdurch wurde die Fraktion der Zellkerne abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und erneut zentrifugiert (ca. $25'000 \times g$, 2°C , 10 min.). Die Pellets wurden in je 1,5 ml resuspendiert, in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei ca. $20'000 \times g$ und 2°C für 10 min. zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde wiederholt und die Pellets anschließend in 60-80 μl eiskaltem Lysepuffer No. 9 mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. Die Proben wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert. Der Proteingehalt wurde mittels BCA-Assay bestimmt (s. unter 2.2.7.4). Ein Teil der Aliquots wurde direkt wie im vorherigen Kapitel beschrieben mit Lämmli-puffer aufgekocht und ebenfalls bei -80°C eingefroren.

2.2.7.3 Behandlung mit Dimerisierungsreagenz

HCtr2- und EV-Zellen wurden zu 1 Mio Zellen/T75-Flasche ausgesät und über vier Tage mit Induktionsmedium kultiviert. Das Nährmedium wurde entfernt und frisches Nährmedium mit 1% (V/V) Stammlösung des Dimerisierungsreagenz EGS (Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat) gelöst in DMF; Endkonzentration auf den Zellen: 1 mM) zu den Zellen gegeben. Als Kontrolle dienten ebenfalls mit EGS behandelte EV-Zellen, sowie hCtr2-Zellen, welchen anstelle der EGS-Lösung 1% (V/V) DMF in das Nährmedium gegeben wurde. Die Zellen wurden eine halbe Stunde bei RT inkubiert, anschließend geerntet und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 150 µl Lysispuffer No. 6 aufgenommen und die Proteine wie in Kapitel 2.2.7.1 beschrieben isoliert. Nach Gehaltsbestimmung mittels BCA-Assay und Aufkochen in β -Mercaptoethanol enthaltendem Lämmli-puffer wurden SDS-PAGE und Westernblot wie in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben durchgeführt.

2.2.7.4 Gehaltsbestimmung mittels BCA-Assay

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass die Proteine der Probe Cu^{2+} -Ionen aus dem Reagenz quantitativ zu Cu^{1+} reduzieren. Bicinchoninsäure bildet mit letzteren einen violetten Komplex, dessen Absorption bei 544 nm bestimmt werden kann (Holtzhauer 2009). Zur quantitativen Bestimmung werden die Absorptionen der Verdünnungsreihe eines Standardproteins gegen die entsprechende Proteinkonzentration aufgetragen. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz besteht hier im Absorptionsbereich von ca. 0,1-1 ein linearer Zusammenhang. Durch lineare Regression erhält man die Gleichung der Standardgeraden, über die die Proteinkonzentration der Proben berechnet werden kann.

Die Proben wurden in Reinstwasser oder PBS 1x so verdünnt, dass eine Absorption im linearen Bereich gewährleistet war (i.d.R. 1:10). In eine 96-Well Platte wurden pro Well je nach vorhandener Probenmenge 12 oder 24 µl Probe bzw. BSA-Standardverdünnung und 100 µl oder 200 µl der Reagenzienmischung pipettiert. Jede Probe bzw. Standardlösung wurde in Duplikaten aufgetragen. Die Platte wurde für 30 min. im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 544 nm im Fluostar Microplate-Reader vermessen. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen erfolgte wie oben beschrieben anhand der BSA-Standardgeraden.

2.2.7.5 Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

In dieser Arbeit wurden 1 mm dicke Gele mit einem Acrylamidgehalt von 12% im Trenngel und 5% im Sammelgel verwendet.

| <i>Komponente</i> | <i>Volumen</i> |
|------------------------------|----------------|
| Rotiphorese® Gel 30 [37,5:1] | 2,4 ml |
| Reinstwasser | 2,1 ml |
| Trenngelpuffer 4x | 1,5 ml |
| APS-Lösung 10% | 60 µl |
| TEMED | 6 µl |

Tab. 2-22: Zusammensetzung des Trenngels

Die Bestandteile wurden in eine 15 ml PP-Röhre gegeben und vorsichtig unter Vermeidung einer Luftblasenbildung gemischt. Mit einer Pipette wurden ca. 4,5 ml zwischen die Glasplatten der Gelgießapparatur gegeben und mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um eine glatte Grenze zwischen Sammel- und Trenngel zu erhalten.

| <i>Komponente</i> | <i>Volumen</i> |
|------------------------------|----------------|
| Rotiphorese® Gel 30 [37,5:1] | 0,5 ml |
| Reinstwasser | 1,75 ml |
| Sammelgelpuffer 4x | 0,75 ml |
| APS-Lösung 10% | 30 µl |
| TEMED | 3 µl |

Tab. 2-23: Zusammensetzung des Sammelgels

Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde der Isopropanol gründlich entfernt, ca. 1,5 ml der Sammelgellösung auf das Trenngel pipettiert und ein Kamm eingesetzt. Nach dem Erstarren des Sammelgels wurden die Glasplatten in angefeuchtetes Papier eingewickelt und zur vollständigen Polymerisation einige Stunden oder über Nacht bei 4-8°C gelagert.

Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit SDS-Laufpuffer 1x befüllt. Der Kamm wurde aus dem Gel entfernt und die so entstandenen Taschen mit Laufpuffer gespült. Die mit Lämmli-puffer versetzten Proben wurden auf Eis aufgetaut und ein der gewünschten Proteinmenge entsprechendes Volumen in die Taschen pipettiert (max. 20 µl). Als Leiter wurden 5-10 µl des PageRuler™ mit vorgefärbten Standardproteinen verwendet. Die Elektrophorese lief zunächst bei 80 V bis an der Leiter durch Ausbildung der verschiedenen Banden der Übergang zwischen Sammel- und Trenngel festgestellt werden konnte (ca. 20-30 min.). Daraufhin wurde die Spannung auf 140-160 V erhöht bis die gewünschte Trennung erreicht war (ca. 1 h).

2.2.7.6 Westernblot

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Semi-Dry-Methode verwendet. Dabei werden Gel und Membran mit puffergetränkten Filterpapieren zwischen zwei Elektroden gepresst. Senkrecht zur Laufrichtung der Elektrophorese wird eine Spannung angelegt, so dass die negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran übertragen werden. Auf der Membran sind die Proteine leichter zu handhaben, da sie für Reagenzien leichter zugänglich sind und nicht diffundieren, und weil die Membran stabiler ist als das Polyacrylamid-Gel.

Filterpapiere und PVDF-Membran wurden in der Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Die Membran wurde für 10 sec. in Methanol aktiviert (benetzbar gemacht) und für mindestens 15 min. in Semi-Dry-Puffer äquilibriert.

Nacheinander wurden in Semi-Dry-Puffer getränkte Filterpapiere (je nach Dicke 1-3) und die Membran auf die Anode gelegt. Das Gel wurde zwischen den Glasplatten entfernt und das Sammelgel abgeschnitten. Das Trenngel wurde auf die Membran überführt und mit 1-3 getränkten Filterpapieren bedeckt. Es wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen eingeschlossen wurden. Der Kathodendeckel wurde aufgesetzt und das Blotting durchgeführt (Stromstärke: 40 mA pro Membran für 1 h).

Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockingpuffer geschwenkt, um nicht besetzte Bindungsstellen der Membran zu blockieren und so eine unspezifische Adsorption der Antikörper zu verhindern.

Die Antikörper wurden in der gewünschten Konzentration in Blockingpuffer verdünnt. Die Primärantikörperlösungen konnten mehrfach verwendet werden und wurden je nach Stabilität eingefroren (Anti- β -Actin) oder nach Zusatz von 0,02% (m/V) Natriumazid bei 4-8°C gelagert (Anti-hCtr2). Die Membran wurde über Nacht bei 4-8°C in der Primärantikörperlösung geschwenkt. Anschließend wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membran zweimal mit TBST 1x und einmal mit TBS 1x für je 30 min. gewaschen. Danach wurde mit der entsprechenden Sekundärantikörperlösung 1 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Diese wurde wegen der Empfindlichkeit der Meerrettichperoxidase (HRP) immer frisch hergestellt. Es folgten wiederum drei Waschschrte (s.o.) und anschließend die Entwicklung des Blots.

Als Nachweis für eine gleichmäßige Auftragung bzw. gleiche Gesamtproteinmengen in den verschiedenen Proben wurde der Housekeeper β -Actin mit entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern nachgewiesen. Dies erfolgte entweder zusammen mit dem Nachweis des Zielproteins durch Mischung der entsprechenden Antikörper oder anschließend,

nachdem die zuerst verwendeten Antikörper durch sog. Stripping von der Membran entfernt worden waren(s.u.).

Bei der Entwicklung des Blots wurden die Banden der nachzuweisenden Proteine durch die HRP des spezifisch gebundenen Sekundärantikörpers sichtbar gemacht: diese setzt Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedion) zu einem Phthalat im angeregten Triplettzustand um. Durch den Übergang in den Singulettzustand, werden Photonen freigesetzt. Diese Chemilumineszenz kann mit einer Kamera erfasst werden (Sell 2009).

Die Membran wurde in einen ultraklaren PP-Entsorgungsbeutel überführt, der an drei Seiten aufgeschnitten war. Durch Überstreichen des Beutels wurde die Membran von überschüssigem Puffer befreit. Anschließend wurde 1 ml Western Blot Reagenz auf die Membran gegeben (je 500 µl Lösung A und B/Luminol Reagenz von Santa Cruz oder alternativ 990 µl Lösung A + 10 µl Lösung B/ECL-Reagent von Amersham). Nach 1-2 min. Inkubationszeit wurde das überschüssige Reagenz durch erneutes Überstreichen des Beutels entfernt und die Lumineszenz mit dem INTAS Imager aufgenommen. Für einen semi-quantitativen Vergleich der Proben wurde der 1x1-Binningmode/Single gewählt. Das bedeutet, dass jeder Pixel einzeln abgebildet und nur eine Aufnahme gemacht wird. Andere Einstellungen der Kamera können mehrere Pixel zusammenfassen (z.B. 4x4-Binningmode) oder mehrere Bilder überlagern, um die Intensität der Banden zu erhöhen. Diese Einstellungen sind jedoch laut Hersteller für einen semiquantitativen Vergleich ungeeignet und wurden daher nur für erste Probeaufnahmen verwendet. Die Verschlusszeit der Kamera richtete sich nach der Lumineszenzintensität der nachzuweisenden Banden. Die vorgefärbte Leiter wurde ebenfalls fotografisch festgehalten und zur Identifizierung der Proteinbanden über das Molekulargewicht herangezogen.

Für das Stripping wurde die Membran zunächst durch zweimaliges Schwenken in TBST 1x für je 30 min. gewaschen und äquilibriert. Danach wurde die Membran für 30 min. in Strippingpuffer inkubiert. Die Zusammensetzung und der pH-Wert des Puffers sorgen für eine selektive Entfernung der Antikörper von den Proteinen, ohne dass letztere von der Membran abgelöst werden. Die Membran wurde anschließend kurz mit Reinstwasser gespült, für 30 min. in TBST 1x geschwenkt und für 10 sec. in Methanol aktiviert. Anschließend wurde die Membran geblockt, mit den Antikörpern für den β -Actin-Nachweis inkubiert und entwickelt.

2.2.8 Statistik

Für die statistische Auswertung der MTT-Daten wurden die auf die jeweilige Kontrolle normalisierten Absorptionswerte der einzelnen Experimente zur Mittelung gepoolt und

daraus eine nicht-lineare Regression erstellt. Für die statistische Auswertung wurden die als normal verteilt geltenden pIC_{50} -Werte und deren Standardfehler herangezogen. Der Vergleich zwischen verschiedenen Zelltypen erfolgte mittels ungepaarten t-Tests.

Für qPCR-Experimente wurde anhand von normalisierten Expressionswerten aus Tumorzellen sowie aus Gewebeproben jeweils mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf das Vorliegen einer Normalverteilung geprüft (18 bzw. 23 Proben). Der Test bewertete die Daten beider Probenarten als normal verteilt. Auch wenn die Anzahl der Proben in jeder Gruppe relativ gering war, so wurde auf Grund des positiven Tests in beiden Fällen von einer zumindest annähernden Normalverteilung der qPCR-Daten ausgegangen. Daher wurden für die Auswertung der ungepaarte t-Test (Vergleich jeweils sensitiver und resistenter Zellsublinien) bzw. die One-way-ANOVA-Analyse mit anschließendem Tukey's Multiple Comparison Test (Vergleich mehrerer Gruppen von Gewebeproben) verwendet. Hierfür wurden die arithmetischen Mittelwerte und Standardabweichungen aus den normalisierten Expressionen gebildet. Für die Tumorzellen wurden diese für den jeweiligen Zelltyp aus den Expressionswerten der einzelnen PCR-Läufe berechnet. Für die Gewebedaten wurden die normalisierten Expressionen aller Proben einer Gruppe gemittelt.

Für die Korrelationsanalyse der Gewebeexpressionen mit prognostischen Parametern wurden die Proben wie im Ergebnisteil beschrieben in die Kategorien niedrige bzw. hohe Expression und bessere bzw. schlechtere Prognose eingeteilt. Die Korrelationsanalyse erfolgte anschließend mittels Fisher's Exact-Test (einzelne Transporterexpressionen) oder mittels χ^2 -Test (kombinierte Expression von hCtr1 und hCtr2).

Für die Daten aus den ICP-MS-Messungen wurden ebenfalls arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und unter Annahme einer Normalverteilung mit dem ungepaarten t-Test ausgewertet.

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism[®] 4.00 durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Kapitel 3 in Form von Mittelwerten und Standardfehlern dargestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Überexpression und funktionelle Untersuchungen von hCtr1 und hCtr2

3.1.1 Nachweis der Überexpression von hCtr1 und hCtr2

3.1.1.1 Transkriptionsebene – RT-qPCR

Zunächst wurde die Überexpression auf Ebene der mRNA mittels reverser Transkription (RT) und quantitativer PCR (qPCR) überprüft. Es wurde von zwei verschiedenen Passagen der Zellen RNA isoliert. Untersucht wurden mit Doxycyclin induzierte und nicht induzierte Überexpressionsklone sowie doxycyclinbehandelte Leervektor-Kontrollzellen („EV“ = empty vector). Die Induktion mit Doxycyclin erfolgte über 4-5 Tage vor der RNA-Isolierung. Für einen weiteren Vergleich dienten die mit Doxycyclin behandelte Ursprungszelllinie Flp-InTM T-RExTM-293 („293“) und unbehandelte EV-Zellen. Als Housekeeping-Gene (HKG) wurden Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2D2 (UBE2D2) und β -Actin verwendet. Letzteres ist ein häufig verwendetes HKG und das β -Actin-Protein diente auch für den Überexpressionsnachweis von hCtr2 auf Proteinebene als Housekeeper (s. Abschnitt 3.1.1.2). UBE2D2 wurde von Eva Gosepath bereits für verschiedene Zelllinien als geeignetes HKG ermittelt, u.a. auch für die Zelllinie HEK293 (Gosepath 2007). Auf eine weitere Optimierung der HKG wurde für die Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen verzichtet, da diese sich außer durch die im Vektor vorhandene hCtr-Sequenz bzw. das Vorhandensein des Leervektors genetisch nicht unterscheiden.

Wie in Tabelle 3-1 gezeigt, unterschieden sich doxycyclinbehandelte und nicht behandelte EV-Zellen in ihrer hCtr-Expression nicht voneinander. Daher wurden diese Expressionsdaten vor dem Vergleich mit den Überexpressionsklonen gemittelt (s. Tab. 3-2 und 3-3).

| GOI | hCtr1 | | hCtr2 | |
|-------------|-------------|--------|-------------------------------------|-------------------------|
| | EV [+] | EV [-] | EV [+] | EV [-] |
| Norm. Expr. | 0,03 ± 0,01 | 0,03 | (2,14 ± 0,77) x 10 ⁻³ | 2,22 x 10 ⁻³ |
| n | 2 | 1 | 2 | 1 |

Tab. 3-1: Normalisierte Expressionen von hCtr1 und hCtr2 in doxycyclinbehandelten (+) und unbehandelten (-) Leervektorzellen; n = Anzahl der cDNA-Chargen

Für beide RNA-Isolierungen wurde bei den induzierten Überexpressionsklonen ein deutlicher Anstieg der Transkription des entsprechenden Transporters im Vergleich zur Leervektorkontrolle festgestellt. Berücksichtigt man, dass hCtr2 in EV-Zellen ca. 13-fach geringer exprimiert wird als hCtr1, so lag das Ausmaß der erreichten Überexpression für beide Transporter in einer ähnlichen Größenordnung. Bezieht man jedoch die Expressionen

der jeweiligen Überexpressionsklone entsprechend auf die des EV-Klons (Bildung des Fold-Change-Werts), so ergab sich im Mittel eine signifikante Transkriptionssteigerung von hCtr1 um Faktor 41,7 bzw. eine mehr als 2300-fache, signifikante Überexpression von hCtr2 (jeweils $p < 0,01$). Auch für die nicht induzierten Überexpressionsklone zeigte sich, dass die transfizierten Sequenzen trotz des Tetracyclinrepressors zu einem gewissen Grad abgelesen wurden. Hierbei ergaben sich im Vergleich zu EV-Zellen mittlere Fold-Change-Werte von 2,32 (hCtr1) und 95,2 (hCtr2). Für hCtr2-Zellen war dieser Unterschied hochsignifikant ($p < 0,001$). Als weitere Kontrollen wurden die Expressionen von hCtr1 und hCtr2 auch in dem jeweils den anderen Transporter überexprimierenden Zelltyp untersucht. Es zeigten sich hierbei weitgehend ähnliche Expressionsniveaus wie in Leervektorzellen. Auch die Ursprungszelllinie unterschied sich mit Fold-Change-Werten von 1,37 (hCtr1) bzw. 0,96 (hCtr2) nicht wesentlich von EV-Zellen. Abbildung 3-1 und die Tabellen 3-2/3-3 zeigen eine Zusammenstellung der Daten.

Die in diesen Messungen untersuchten Zellen stammten für jeden Zelltyp aus einem Einzelklon, bei dem mit X-Gal keine Blaufärbung auftrat und der gleichzeitig keine Resistenz mehr gegen Zeocin aufwies. Für alle weiteren Experimente wurden ausschließlich Zellen dieser Klone verwendet.

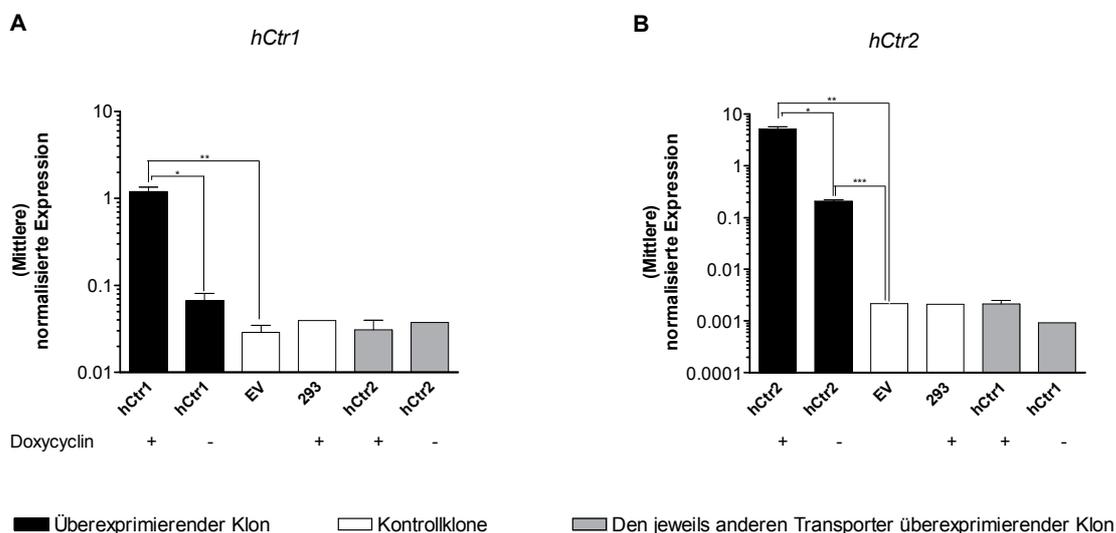


Abb. 3-1: Normalisierte Expressionen von (A) hCtr1 bzw. (B) hCtr2 in Leervektor- (EV) und Überexpressionsklonen sowie der Ursprungszelllinie (293), mit (+) bzw. ohne (-) Doxycyclin, logarithmisch skaliert. Gezeigt ist jeweils der arithmetische Mittelwert (MW) und SEM (Standardfehler des Mittelwerts) der normalisierten Expressionen aus zwei cDNA-Chargen ($n=2$) bzw. die normalisierten Expressionen eines Experiments ($n=1$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten t-Tests; Irrtumswahrscheinlichkeiten: * ($p \leq 0,05$): signifikant, ** ($p < 0,01$): sehr signifikant, *** ($p < 0,001$): hochsignifikant

| Expression von hCtr1 | Kontrollen | | Induzierte Klone | | Nicht induzierte Klone | |
|----------------------|------------|-------------|------------------|-------------|------------------------|-------|
| | 293 | EV | hCtr1 | hCtr2 | hCtr1 | hCtr2 |
| Norm. Expr. | 0,04 | 0,03 ± 0,01 | 1,20 ± 0,15 | 0,03 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,04 |
| Expression vs.EV | ↔ | - | ↑↑ | ↔ | ↑ | ↔ |
| Fold Change vs. EV | 1,37 | - | 41,7 | 1,07 | 2,32 | 1,30 |
| p | - | - | < 0,01 | n.s. | n.s. | - |
| n | 1 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 |

| Expression von hCtr2 | Kontrollen | | Induzierte Klone | | Nicht induzierte Klone | |
|----------------------|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------|-------------------------|-------------|
| | 293 | EV | hCtr1 | hCtr2 | hCtr1 | hCtr2 |
| Norm. Expr. | 2,09 x 10 ⁻³ | (2,17 ± 0,45) x 10 ⁻³ | (2,13 ± 0,38) x 10 ⁻³ | 5,09 ± 0,63 | 0,93 x 10 ⁻³ | 0,21 ± 0,01 |
| Expression vs.EV | ↔ | - | ↔ | ↑↑↑ | ↓ | ↑↑ |
| Fold Change vs. EV | 0,96 | - | 0,98 | 2350 | 0,43 | 95,2 |
| p | - | - | n.s. | < 0,01 | - | < 0,001 |
| n | 1 | 3 | 2 | 2 | 1 | 2 |

Tab. 3-2/3-3: Normalisierte Expressionen von hCtr1 bzw. hCtr2 in Leervektor- (EV) und Überexpressionsklonen sowie der Ursprungszelllinie (293). Für n=1 ist das normalisierte Expressionslevel gezeigt. Für n=2 ist jeweils MW ± SEM aus 2 cDNA-Chargen angegeben. Der Fold-Change-Wert gibt jeweils den Faktor der Expressionsänderung im Vergleich zu EV-Zellen an. Änderungen ≥ Faktor 1,5 sind mit den Symbolen ↑ bzw. ↓ dargestellt, Faktoren > 10 mit ↑↑, Faktoren > 100 mit ↑↑↑; ↔ kennzeichnet Unterschiede < Faktor 1,5. Die Statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten t-Tests; Irrtumswahrscheinlichkeiten: p > 0,05: nicht signifikant (n.s.), p ≤ 0,05: signifikant, p < 0,01: sehr signifikant, p < 0,001: hochsignifikant

3.1.1.2 Überexpression von hCtr2 – Nachweis auf Proteinebene

SDS-PAGE und Western Blot

Für hCtr2 wurde die Überexpression auf Proteinebene u.a. mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot nachgewiesen. Hierfür wurden über vier Tage mit Doxycyclin induzierte Überexpressionszellen verwendet und Gesamtproteinlysate oder Membranisolate gewonnen. Als Vergleich dienten hCtr1- und EV-Zellen. Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit reduzierendem Lämmli-puffer für 5-10 min auf 95°C erhitzt. In beiden Versuchen konnte für hCtr2-Zellen eine deutliche Bande bei einem Molekulargewicht (MG) knapp unterhalb von 17 kDa gefunden werden (Abbildung 3-2, A+B). Dies stimmte gut mit dem Molekulargewicht des hCtr2-Monomers überein (MG = 15,7 kDa). In hCtr1- und EV-Zellen war die Expression des hCtr2-Proteins so gering, dass es unter den verwendeten

Versuchsbedingungen nicht nachweisbar war. In einem weiteren Experiment wurden Gesamtproteinproben von hCtr2-Zellen sowohl mit als auch ohne Induktion im Vergleich zu Proben aus EV-Zellen untersucht. Hierbei konnten die Ergebnisse der qPCR-Messung auch auf Proteinebene bestätigt werden: auch ohne Induktion mit Doxycyclin trat bereits eine sichtbare Expression von hCtr2 auf, mit Induktion wurde diese deutlich gesteigert (Abbildung 3-2, C).

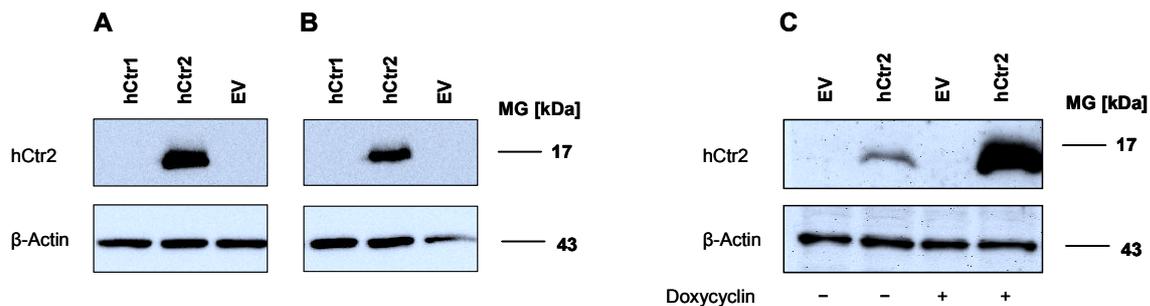
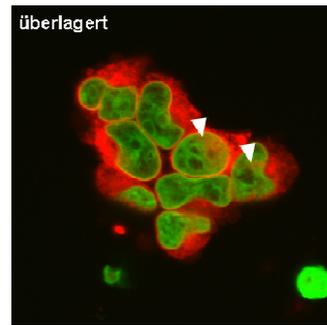
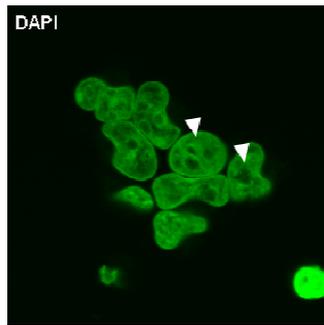
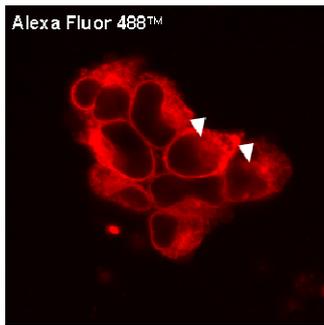


Abb. 3-2: Nachweis von hCtr2 auf Proteinebene mittels SDS-PAGE und Western Blot, β -Actin diente als Ladekontrolle. (A) Gesamtproteinlysate, (B) Membranisolate, (C) Gesamtproteinlysate von EV- und hCtr2-Zellen mit (+) und ohne (-) Doxycyclininduktion

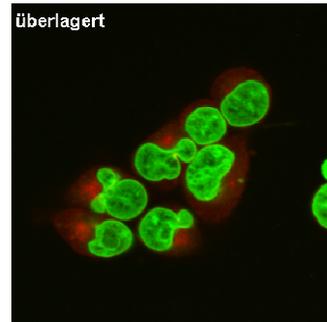
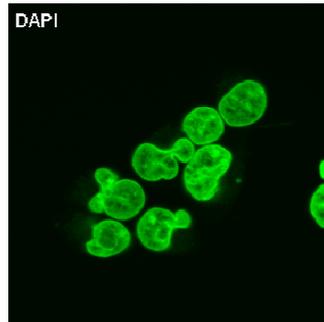
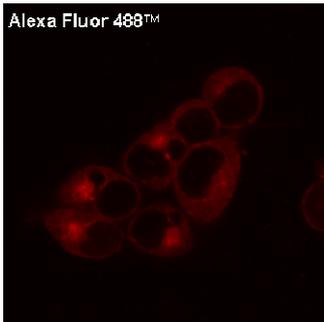
Immunfluoreszenzmikroskopie

Ein weiterer Nachweis der Überexpression von hCtr2 wurde durch Immunostaining mit Anti-hCtr2-Primärantikörper und Alexa FluorTM 488-markiertem Sekundärantikörper und anschließender konfokaler Fluoreszenzmikroskopie erbracht. Die mikroskopische Untersuchung wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Claus Seidel (Institut für Physikalische Chemie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf) durchgeführt. Um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers an Zellbestandteile auszuschließen, wurde eine Probe von hCtr2-Zellen mit Sekundärantikörper allein behandelt (Kontrolle). In dieser Probe wurde keinerlei Fluoreszenz des Farbstoffs Alexa FluorTM 488 nachgewiesen. Es wurden induzierte Zellen aller drei Klone untersucht. Auch in diesem Versuch zeigte sich eine deutliche Überexpression von hCtr2 in den hCtr2-Zellen. Das Protein war hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Dies stimmt mit Befunden aus der Literatur überein, dass hCtr2 v.a. in Vesikeln zu finden ist (v. d. Berghe et al. 2007). Auch bei hCtr1- und EV-Zellen zeigte sich eine vergleichbare intrazelluläre Lokalisation. Hier war die stärkste Fluoreszenz in der Nähe des Zellkerns zu beobachten. Dies lässt eine etwas höhere hCtr2-Menge im Bereich des rauen endoplasmatischen Retikulums oder des Golgiapparates vermuten. Bei den hCtr2-Zellen war das gesamte Zytoplasma stark gefärbt. Auch in manchen Zellkernen war hCtr2 in diffuser Verteilung zu sehen. Dies stimmt mit Literaturdaten von Blair et al. überein (2010).

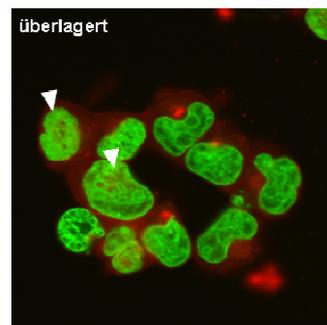
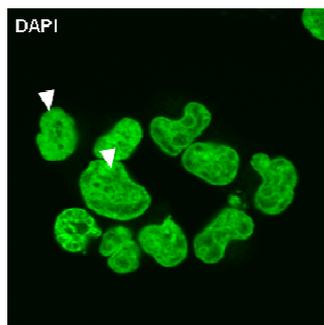
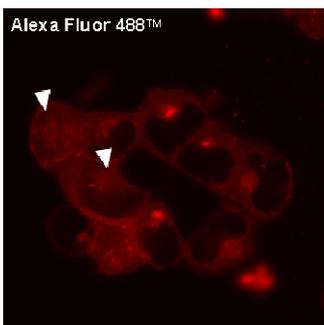
hCTR2-Zellen



EV-Zellen



hCTR1-Zellen



Kontrolle

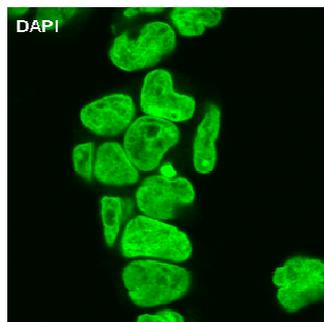
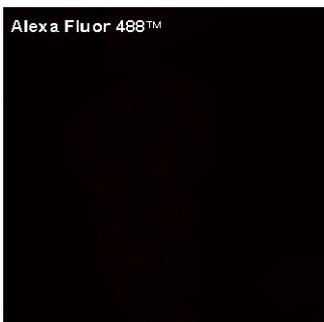


Abb. 3-3: Konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie nach Markierung von hCtr2 mit Anti-hCtr2-Antikörper und Alexa Fluor 488TM-markiertem Sekundärantikörper. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. *Pfeilspitzen:* Diffuse Lokalisation von hCtr2 im Zellkern. Kontrolle: hCtr2-Zellen, die nur mit Sekundärantikörper behandelt wurden. Die Abbildungen zeigen Single-Slice-Aufnahmen.

Da dies auch bei hCtr1-Zellen auftrat, ist es unwahrscheinlich, dass es in hCtr2-Überexpressionszellen artifiziell zu dieser Lokalisation kam. Ob die stark gefärbte Zone um den

Zellkern in hCtr2-Zellen durch eine hCtr2-Lokalisation in der Kernmembran bedingt war oder ob es sich hierbei um das stark gefärbte Zytoplasma handelte, war in diesem Experiment nicht eindeutig festzustellen. Die Fluoreszenz-Aufnahmen der Klone hCtr1 und EV zeigen keine Hinweise auf eine Anfärbung der Kernmembran. Die Aufnahmen sind in Abbildung 3-3 dargestellt.

3.1.1.3 Überexpression von hCtr1 und hCtr2 – Nachweis auf funktioneller Ebene

Die Überexpression der beiden Kupfertransporter wurde auch funktionell durch MTT-Assays mit CuSO_4 nachgewiesen. Zunächst wurden die Zellen über einen Zeitraum von ca. 72 h mit CuSO_4 behandelt (Abbildung 3-4). Dies führte bei induzierten hCtr1-Zellen bei niedrigen CuSO_4 -Konzentrationen zu einem deutlich stärkeren Vitalitätsverlust als in den beiden anderen Zelltypen. In einem Konzentrationsbereich von 10^{-5} M bis 10^{-4} M kam es jedoch zu einem erneuten Anstieg der Absorption, bevor die Zellen bei noch höheren Konzentrationen schließlich ganz abstarben. Bei hCtr2- und EV-Zellen sowie bei nicht induzierten hCtr1-Zellen trat dieser Effekt nicht auf (Abb. 3-4 A und C).

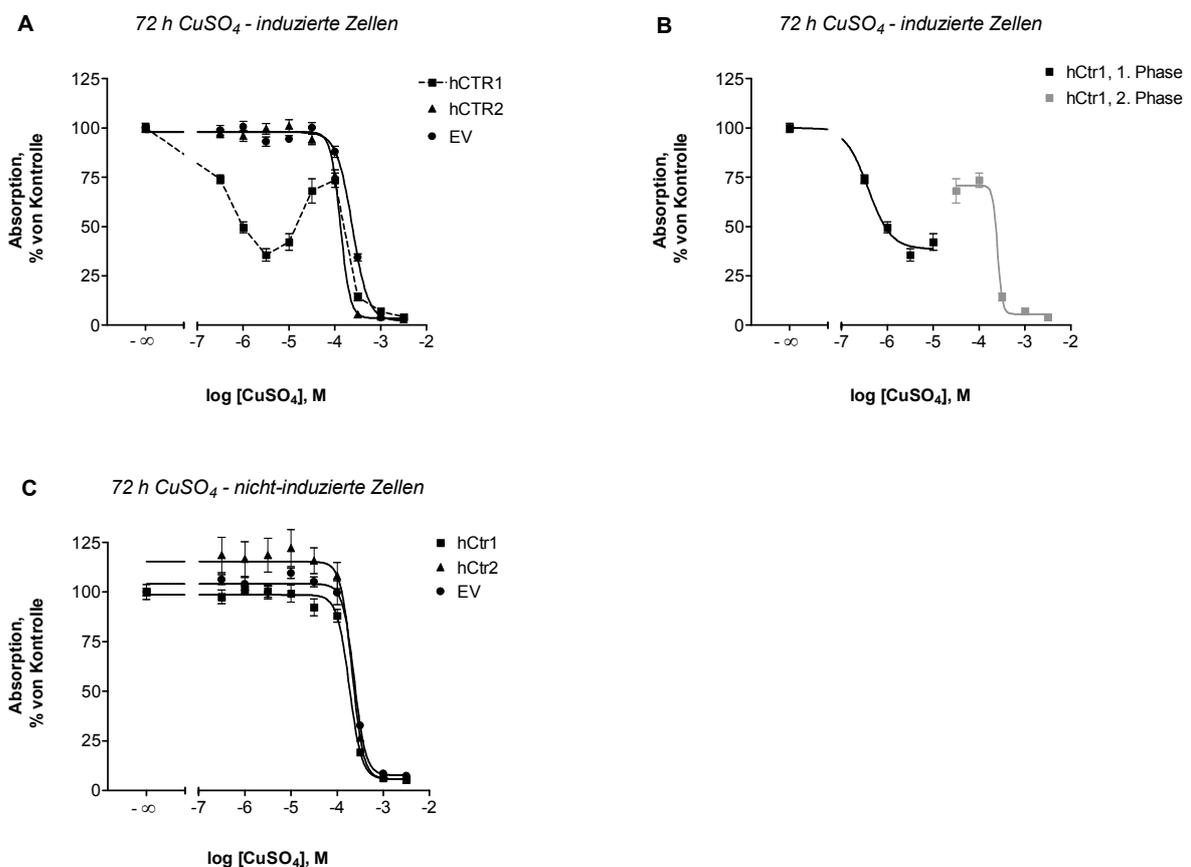


Abb. 3-4: KEK für die Behandlung mit CuSO_4 über 72 h, ermittelt durch MTT-Assays und anschließende nicht-lineare Regression. Für induzierte hCtr1-Zellen war keine einfache Regression möglich (unterbrochene Linie in (A)). In (B) ist für hCtr1-Zellen eine biphasische Auswertung gezeigt; (C): nicht-induzierte Zellen. Die Abbildung zeigt die gemittelten Kurven aus 5 - 7 Experimenten mit

jeweils 3 Replikaten ± SEM. Die Absorptionswerte sind auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle prozentualisiert dargestellt.

| CuSO ₄ , 72 h | [+] | | | [-] | | |
|--------------------------|-------------|----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | EV | hCtr1 | hCtr2 | EV | hCtr1 | hCtr2 |
| IC ₅₀ [µM] | 240 | 0,38 253 | 132 | 236 | 185 | 211 |
| pIC ₅₀ ± SEM | 3,62 ± 0,02 | 6,42 ± 0,06 3,60 ± 1,62 | 3,88 ± 0,03 | 3,63 ± 0,03 | 3,73 ± 0,03 | 3,68 ± 0,06 |
| Cu-Sensitivität vs. EV | – | ↑ ↔ | ↑ | – | ↑ | ↔ |
| Faktor | – | 628 1,05 | 1,81 | – | 1,27 | 1,11 |
| p | – | < 0,001 n.s. | < 0,001 | – | < 0,05 | n.s. |
| n | 7 | 7 | 6 | 6 | 6 | 5 |

Tab. 3-4: Angegeben sind die gemittelten Daten sowie Sensitivitätsfaktoren im Vergleich zu entsprechend behandelten EV-Zellen, hCtr1 [+]: oben 1. Phase, unten 2. Phase. Die pIC₅₀-Werte wurden für die statistische Auswertung mittels ungepaarten t-Tests verwendet; Irrtumswahrscheinlichkeiten: p > 0,05: nicht signifikant (n.s.); p ≤ 0,05: signifikant; p < 0,001: hochsignifikant. Signifikante Sensitivitätsunterschiede sind mit den Symbolen ↑ bzw. ↓ dargestellt; ↔ kennzeichnet nicht signifikante Unterschiede.

Vermutlich handelte es sich um eine durch Kupferionen bedingte Internalisierung und Degradation des hCtr1-Proteins, wie sie von Petris et al. 2003 beschrieben wurde. Hierdurch war eine einfache nicht-lineare Regression für induzierte hCtr1-Zellen nicht möglich. Daher wurde für diese eine biphasische Regression durchgeführt (vgl. Abb. 3-4 B) und für beide Phasen der Konzentrations-Effekt-Kurve (KEK) ein IC₅₀-Wert bestimmt (Tabelle 3-4). Es zeigte sich in der ersten Phase der Konzentrations-Effekt-Kurve eine jeweils hochsignifikante Erhöhung der Kupfersensitivität um mehr als Faktor 600 im Vergleich zu EV-Zellen und um Faktor 346 gegenüber hCtr2-Zellen (Abb. 3-4 A/B und Tab. 3-4). Auch im Vergleich zu nicht mit Doxycyclin behandelten hCtr1-Zellen konnte die Sensitivität durch Induktion hochsignifikant um Faktor 484 erhöht werden. Für die zweite Phase der Konzentrations-Effekt-Kurve ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen hCtr1- und EV-Zellen. Die Überexpression des hCtr1-Proteins scheint also bei höheren Kupferkonzentrationen durch Internalisierung kompensiert zu werden.

Induzierte hCtr2-Zellen zeigten eine hochsignifikante Erhöhung der Kupfersensitivität gegenüber mit Doxycyclin behandelten EV-Zellen (Faktor 1,81) sowie eine signifikante Sensitivitätserhöhung gegenüber nicht induzierten hCtr2-Zellen (Faktor 1,60).

Zwischen EV-Zellen waren erwartungsgemäß keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Doxycyclinbehandlung festzustellen. Nicht induzierte hCtr2-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede zu EV-Zellen. So scheint die mittlere Expressionsstärke von hCtr2 bei hCtr2-Zellen ohne Doxycyclinbehandlung noch nicht für eine Erhöhung der Kupfersensitivität

auszureichen, wohingegen die weitere Expressionssteigerung durch Induktion mit Doxycyclin zu einer geringfügigen, aber hochsignifikanten Sensitivierung gegen Kupferionen führt.

Für nicht induzierte hCtr1-Zellen war die Kupfersensitivität gegenüber EV-Zellen ebenfalls signifikant erhöht, im Vergleich zu induzierten hCtr1-Zellen jedoch wesentlich geringfügiger (Faktor 1,27).

Da für die hCtr1-Internalisierung ein Clathrin-abhängiger Endocytoseweg vermutet wird (Petris et al. 2003) und dieser durch Chlorpromazin gehemmt werden kann, erfolgte in einem weiteren Versuch mit hCtr1-Zellen eine Vorbehandlung der Zellen mit 10 μ M Chlorpromazin für ca. 2,5 h, ein anschließender Waschschrift mit PBS1x und Inkubation mit CuSO_4 für 24 h. Danach wurden die Zellen bis zur MTT-Messung mit wirkstofffreiem Nährmedium für 72 h weiter inkubiert. Als Kontrolle dienten ansonsten gleich behandelte hCtr1-Zellen, die ohne Zusatz von Chlorpromazin inkubiert wurden.

CuSO_4 + Chlorpromazin

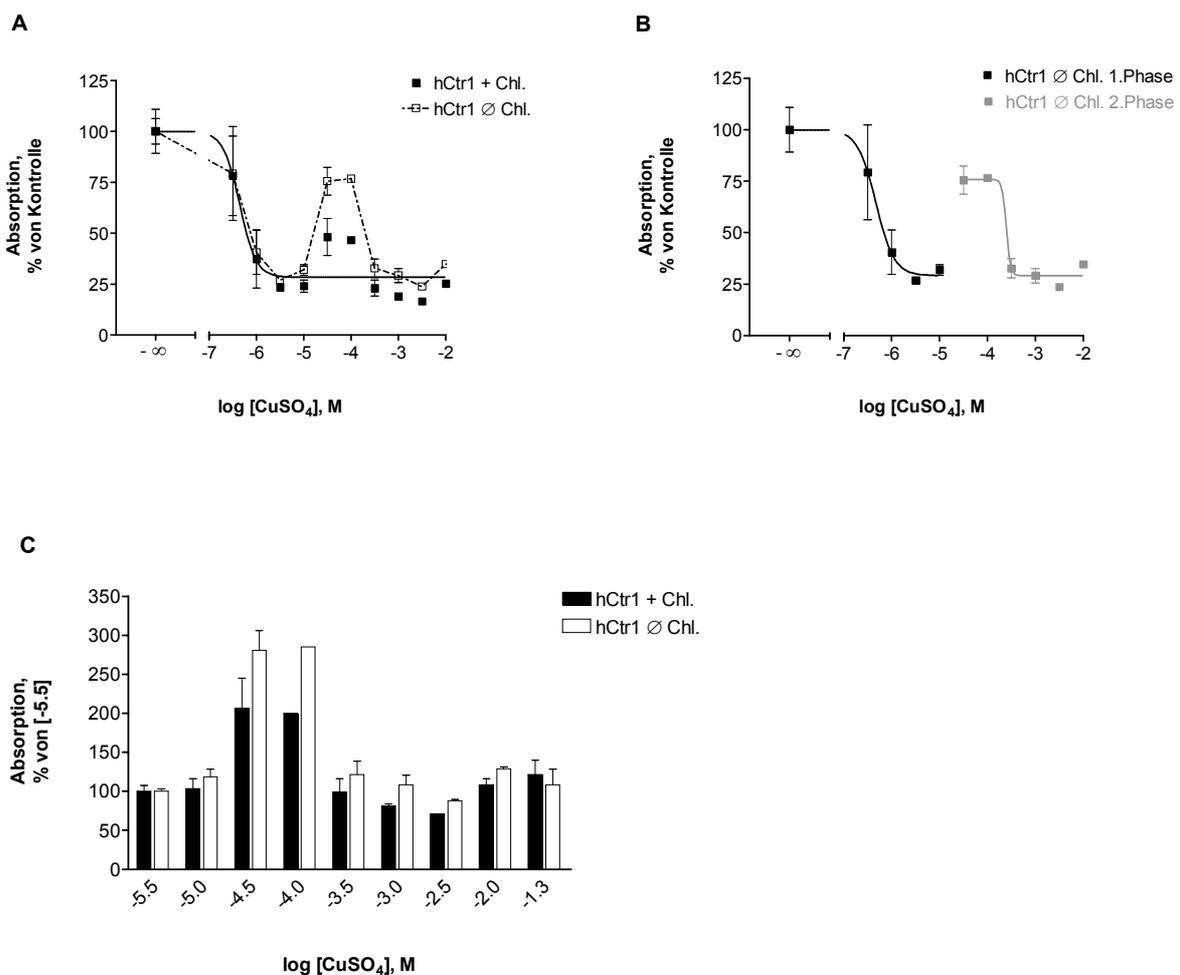


Abb. 3-5: (A) KEK von induzierten hCtr1-Zellen für CuSO_4 über 24 h mit (+ Chl.) oder ohne (\emptyset Chl.) 2,5-stündige(r) Vorinkubation mit 10 μ M Chlorpromazin, ermittelt durch MTT-Assay und anschließende nicht-lineare Regression. Für Zellen ohne Chlorpromazinbehandlung konnte keine einfache Regression durchgeführt werden (unterbrochene Linie). (B) Biphasische nicht-lineare

Regression für hCtr1-Zellen ohne Chlorpromazinbehandlung. Die Abbildung zeigt das Ergebnis aus einem MTT-Assay mit 2 Replikaten \pm SEM. Die Absorptionswerte sind auf die jeweilige nicht mit CuSO_4 behandelte Kontrolle prozentualisiert dargestellt. (C) Darstellung des prozentualen Wiederanstiegs der Absorption durch hCtr1-Internalisierung mit und ohne Chlorpromazinbehandlung. Die Absorptionen wurden jeweils auf den Wert der niedrigsten Absorption der ersten Phase der KEK ($10^{-5.5}$ M) prozentualisiert.

Durch Chlorpromazin wurde der Internalisierungseffekt zwar nicht vollständig aufgehoben, konnte aber so weit vermindert werden, dass eine einfache nicht-lineare Regression möglich war (Abbildung 3-5). Der IC_{50} -Wert lag in diesem Experiment bei 24-stündiger CuSO_4 -Inkubation bereits bei nur $0,44 \mu\text{M}$ und war nahezu identisch mit dem IC_{50} -Wert der ersten Phase der Konzentrations-Effekt-Kurve für die Kontrollzellen ohne Chlorpromazinbehandlung ($0,47 \mu\text{M}$). Wie in Abbildung 3-5 C dargestellt konnte bei den Kupferionenkonzentrationen mit dem stärksten Internalisierungseffekt ($10^{-4.5}$ M und 10^{-4} M) der Wiederanstieg der Zellvitalität durch Chlorpromazin um 74% bzw. 85% vermindert werden. Dies lässt vermuten, dass hier tatsächlich der von Petris et al. beschriebene Internalisierungseffekt vorlag.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde schließlich für nur 3 h mit CuSO_4 behandelt, dieses dann vorsichtig entfernt und die Zellen mit frischem Nährmedium für 48 h weiterkultiviert. Durch diese nur kurze Wirkdauer der Kupferionen konnte der oben beschriebene Internalisierungseffekt nahezu vollständig verhindert werden (Abb. 3-6). Daher wurde diese Art der Versuchsdurchführung für eine weitere Gegenüberstellung von induzierten hCtr1-Zellen mit den anderen beiden Klonen gewählt. Es zeigte sich auch hier eine signifikant höhere Kupfersensitivität der hCtr1-Zellen im Vergleich zu den EV- und hCtr2-Klonen um Faktor 18,3 bzw. 17,6 (jeweils $p < 0,05$, s. Abbildung 3-6 und Tabelle 3-5). Dagegen war hier kein signifikanter Unterschied zwischen hCtr2- und EV-Zellen festzustellen.

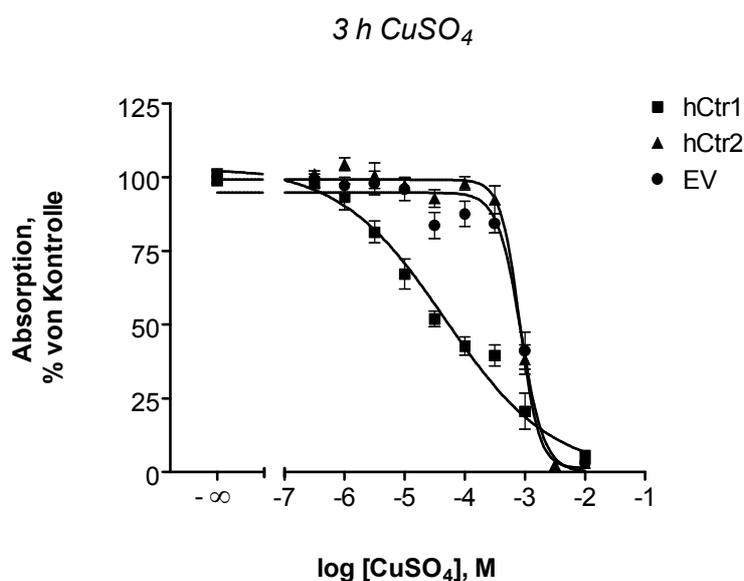


Abb. 3-6: Konzentrations-Effekt-Kurven für die Behandlung von induzierten Zellen mit CuSO_4 über 3 h und anschließender 48-stündiger Auswaschphase, ermittelt durch MTT-Assays und anschließende nicht-lineare Regression. Die Abbildung zeigt die gemittelten Kurven aus 3 - 4 Experimenten mit jeweils 3 Replikaten \pm SEM. Die Absorptionen sind auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle prozentualisiert dargestellt.

| <i>CuSO₄</i> , 3 h | EV | hCtr1 | hCtr2 |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| IC ₅₀ [μM] | 861 | 47,2 | 829 |
| pIC ₅₀ \pm SEM | 3,07 \pm 0,04 | 4,33 \pm 0,16 | 3,08 \pm 0,02 |
| Cu-Sensitivität vs. EV | – | ↑ | ↔ |
| Faktor | – | 18,3 | 1,04 |
| p | – | < 0,05 | n.s. |
| n | 4 | 3 | 4 |

Tab. 3-5: Angegeben sind die gemittelten Daten sowie Sensitivitätsfaktoren im Vergleich zu entsprechend behandelten EV-Zellen. Die pIC₅₀-Werte wurden für die statistische Auswertung mittels ungepaarten t-Tests verwendet; Irrtumswahrscheinlichkeiten: p > 0,05: nicht signifikant (n.s.); p ≤ 0,05: signifikant. Signifikante Sensitivitätsunterschiede sind mit dem Symbol ↑ dargestellt; ↔ kennzeichnet nicht signifikante Unterschiede.

3.1.2 Oligomerbildung von hCtr2

Ob hCtr2 – ähnlich wie hCtr1 – Oligomere bildet, ist noch nicht genau bekannt. Van den Berghe und Kollegen fanden jedoch Di- und Trimere in transient mit vsvG-markiertem hCtr2 transfizierten HEK293T-Zellen (vsvG = vesicular-stomatitis-virus glycoprotein) (v.d. Berghe et al. 2007). Um in den hCtr2-Zellen ein mögliches Vorkommen von Oligomeren nachzuweisen, wurden induzierte hCtr2- und EV-Zellen mit zwei unterschiedlichen Methoden untersucht. Zum einen wurden zwei Aliquots eines Proteinlysats aus hCtr2-Zellen einmal mit reduzierendem und einmal mit nicht-reduzierendem Lämmli-puffer versetzt und statt zu erhitzen für 20-30 min bei RT inkubiert. In einem zweiten Experiment wurden hCtr2-Zellen vor der Proteinisolierung mit dem Dimerizer EGS (Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat)) versetzt. Als Kontrolle dienten hierbei sowohl hCtr2-Zellen, die statt mit EGS nur mit dem entsprechenden Lösemittel inkubiert wurden, zum anderen ebenfalls mit EGS behandelte EV-Zellen. Die im Anschluss gewonnenen Proteinproben wurden mit reduzierendem Lämmli-puffer erhitzt. Die Proben aus beiden Versuchsansätzen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das hCtr2-Protein durch Western Blot nachgewiesen. Sowohl die mit EGS als auch die mit nicht-reduzierendem Lämmli-puffer behandelten hCtr2-Proben zeigten neben dem Monomer bei knapp 17 kDa eine weitere Bande bei ca. 26 kDa, während anders behandelte hCtr2-Proben diese Bande nicht oder nur in sehr schwacher Ausprägung

aufwiesen. In der EGS-behandelten EV-Probe wurde keine der beiden Banden detektiert (Abbildung 3-7 B). Vermutlich handelte es sich bei dieser zweiten Bande um ein Dimer. Auch wenn ein solches rechnerisch ein Molekulargewicht von ca. 32 kDa aufweisen sollte, könnten durch die Dimerform auftretende veränderte Eigenschaften in der elektrophoretischen Beweglichkeit zu einem apparenten Molekulargewicht von ca. 26 kDa führen. Bei v. d. Berghe et al. wurde nach EGS-Behandlung ebenfalls eine zusätzliche Bande in diesem Größenbereich (ca. 24 kDa) nachgewiesen, daneben jedoch auch ein potentiell Trimer bei etwa 35 kDa. Letzteres konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig gefunden werden. Banden, die bei noch höheren Molekulargewichten detektiert wurden (v.a. 55, 95 und > 170 kDa), traten unabhängig von der Art der Probenbehandlung immer wieder auf und konnten auch in hCtr1- und EV-Zellen beobachtet werden. Vermutlich handelte es sich hierbei eher um unspezifische Antikörperbindungen als um oligomere Formen des hCtr2-Proteins.

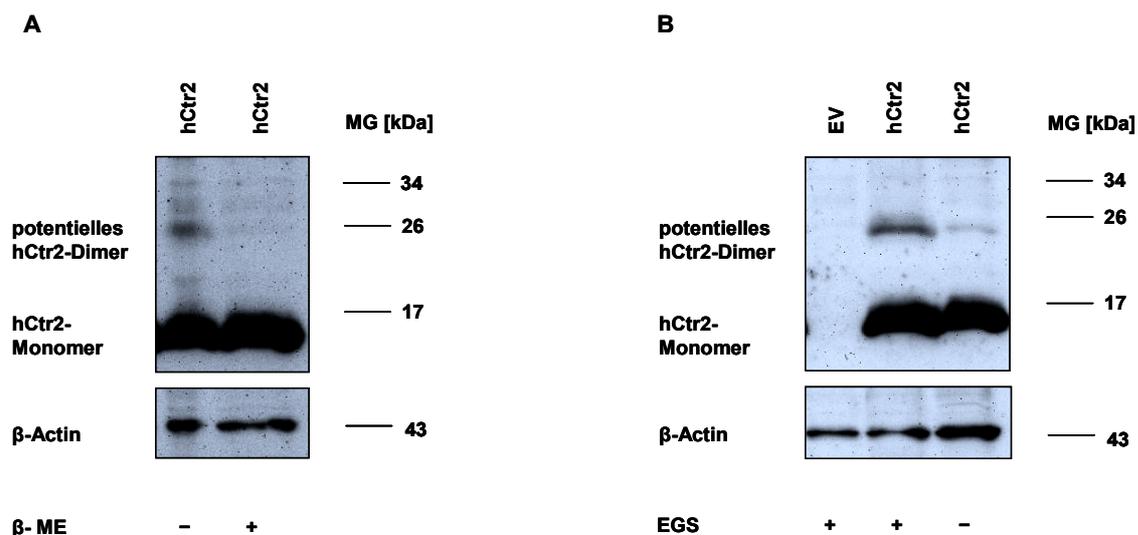


Abb. 3-7: Nachweis von hCtr2-Oligomeren mittels SDS-PAGE und Western Blot, β-Actin diente als Ladekontrolle. (A) Gesamtproteinlysate aus induzierten hCtr2-Zellen mit (+) und ohne (-) β-Mercaptoethanol (β-ME). (B) Gesamtproteinlysate aus induzierten EV- und hCtr2-Zellen mit und ohne EGS

3.1.3 Einfluss der Überexpression von hCtr1 und hCtr2 auf die Expression von ATP7A und ATP7B sowie von CCS und HAH1

Die Aufnahme, intrazelluläre Verteilung und der Efflux von Kupferionen sind in der Zelle streng geregelt. Daher stellte sich die Frage, ob die starke Überexpression von hCtr1 bzw. hCtr2 in induzierten Zellen einen Einfluss auf die Expression des jeweils anderen hCtr hat. Wie der Abbildung 3-1, sowie der Tabelle 3-2/3-3 zu entnehmen ist, wiesen hCtr2-Zellen

keine signifikanten Unterschiede in der hCtr1-Expression im Vergleich zu EV-Zellen auf. Die hCtr2-Expression war nur in nicht induzierten hCtr1-Zellen leicht um ca. Faktor 2 vermindert. Da in induzierten hCtr1-Zellen keine signifikante Veränderung gegenüber der EV-Kontrolle feststellbar war, ist ein Einfluss der hCtr1-Überexpression auf die hCtr2-Transkription jedoch unwahrscheinlich.

Des Weiteren wurde in induzierten Zellen die Expression der Kupfer-ATPasen und der Kupferchaperone CCS („copper chaperone for superoxide dismutase“) und HAH1 („Human copper transport protein HAH1“) ebenfalls mittels qPCR untersucht. Als HKG dienten auch hier UBE2D2 und β -Actin. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Abbildung 3-8 zeigt die gemittelten normalisierten Expressionen, die Tabellen 3-6/3-7 außerdem die Fold-Change-Werte bezogen auf EV-Zellen. Die ATP7B-Expression war in hCtr2-Zellen 1,83-fach und in hCtr1-Zellen um Faktor 4,35 erhöht. Für ATP7A war in hCtr2-Zellen kein Unterschied zur Leervektorkontrolle festzustellen, in hCtr1-Zellen zeigte sich eine nur leichte Expressionserhöhung um Faktor 1,65. Keiner dieser Unterschiede war im t-Test signifikant. Für CCS und HAH1 konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen Überexpressions- und Leervektorzellen festgestellt werden.

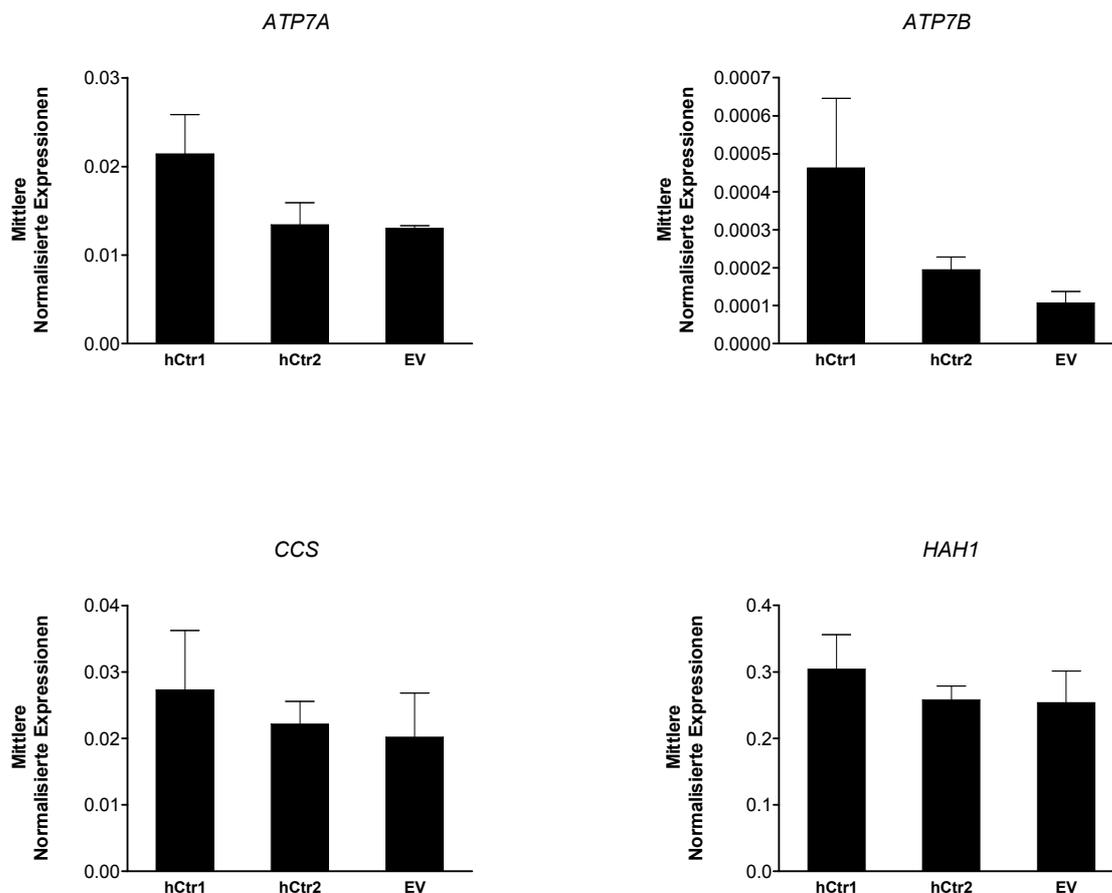


Abb. 3-8: Normalisierte Expressionen der Kupfer-ATPasen ATP7A und ATP7B, sowie der Kupferchaperone CCS und HAH1 in induzierten Überexpressions- und EV-Zellen. Gezeigt sind MW

und SEM aus 2 cDNA-Chargen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten t-Tests; es waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

| GOI | ATP7A | | | ATP7B | | |
|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Klon | EV | hCtr1 | hCtr2 | EV | hCtr1 | hCtr2 |
| Norm. Expr. | $(13,0 \pm 0,32) \times 10^{-3}$ | $(21,4 \pm 4,44) \times 10^{-3}$ | $(13,4 \pm 2,50) \times 10^{-3}$ | $(1,07 \pm 0,29) \times 10^{-4}$ | $(4,63 \pm 1,82) \times 10^{-4}$ | $(1,95 \pm 0,33) \times 10^{-4}$ |
| Expr. vs.EV | – | ↑ | ↔ | – | ↑ | ↑ |
| Fold Change vs. EV | 1,00 | 1,65 | 1,03 | 1,00 | 4,35 | 1,83 |
| p | – | n.s. | n.s. | – | n.s. | n.s. |
| n | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

| GOI | CCS | | | HAH1 | | |
|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Klon | EV | hCtr1 | hCtr2 | EV | hCtr1 | hCtr2 |
| Norm. Expr | $(20,2 \pm 6,66) \times 10^{-3}$ | $(27,3 \pm 8,94) \times 10^{-3}$ | $(22,2 \pm 3,36) \times 10^{-3}$ | $0,25 \pm 0,05$ | $0,30 \pm 0,05$ | $0,26 \pm 0,02$ |
| Expr. vs.EV | – | ↔ | ↔ | – | ↔ | ↔ |
| Fold Change vs. EV | 1,00 | 1,35 | 1,10 | 1,00 | 1,20 | 1,02 |
| p | – | n.s. | n.s. | – | n.s. | n.s. |
| n | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

Tab. 3-6/3-7: MW ± SEM der normalisierten Expressionen und daraus berechnete Fold-Change-Werte, bezogen auf EV-Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten t-Tests; n = 2 cDNA-Chargen (mit jeweils einer Messung in Duplikaten); Irrtumswahrscheinlichkeiten: p > 0,05: nicht signifikant (n.s.). Fold-Change-Werte ≥ 1,5 sind mit dem Symbol ↑ dargestellt; ↔ kennzeichnet kleinere Unterschiede.

Eine Gegenüberstellung der beiden Überexpressionsklone ergab höhere Expressionen in hCtr1-Zellen für ATP7A (Faktor 1,60) und ATP7B (Faktor 2,37), jedoch waren auch diese Unterschiede nicht signifikant.

Ein Vergleich der Expressionen zwischen den verschiedenen untersuchten GOI ist nur näherungsweise möglich, da die Effizienzen der verschiedenen Primer zwar ähnlich aber nicht identisch sind. Dennoch lässt sich aus den Expressionsdaten ableiten, dass ATP7B deutlich weniger stark transkribiert wurde als ATP7A oder die Kupferchaperone. Daher ist es unwahrscheinlich, dass eine veränderte ATP7B-Expression für den Transport von Kupferionen oder Platinkomplexen in diesem Zellsystem eine wesentliche Rolle spielt.

3.1.4 Einfluss der Überexpression auf die Sensitivität gegen Zytostatika

Für den Transporter hCtr1 ist bekannt, dass er Platinkomplexe binden und transportieren kann. Er sorgt vermutlich für einen Teil des cDDP-Uptakes in die Zelle und trägt so positiv zur Wirkung des Arzneistoffs bei (Kruh 2003; Abada und Howell 2010). Der mögliche Beitrag von hCtr2 bei Aufnahme, Verteilung und Wirkung von Platinkomplexen in Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Als Vergleich wurden neben Cisplatin und Carboplatin auch andere Chemotherapeutika in Zytotoxizitätsassays untersucht, die sich strukturell von Platinkomplexen unterscheiden.

3.1.4.1 Sensitivität gegen Platinkomplexe

Cisplatin

In Abbildung 3-9 sind die mittleren Konzentrations-Effekt-Kurven aus 8-10 (induzierte Zellen) bzw. 7 (nicht induzierte Zellen) MTT-Assays gezeigt. Die einzelnen Versuche wurden mit drei Replikaten je Konzentration durchgeführt. Der Boxplot zeigt Lage und Streuung der IC_{50} -Werte über die einzelnen Versuche.

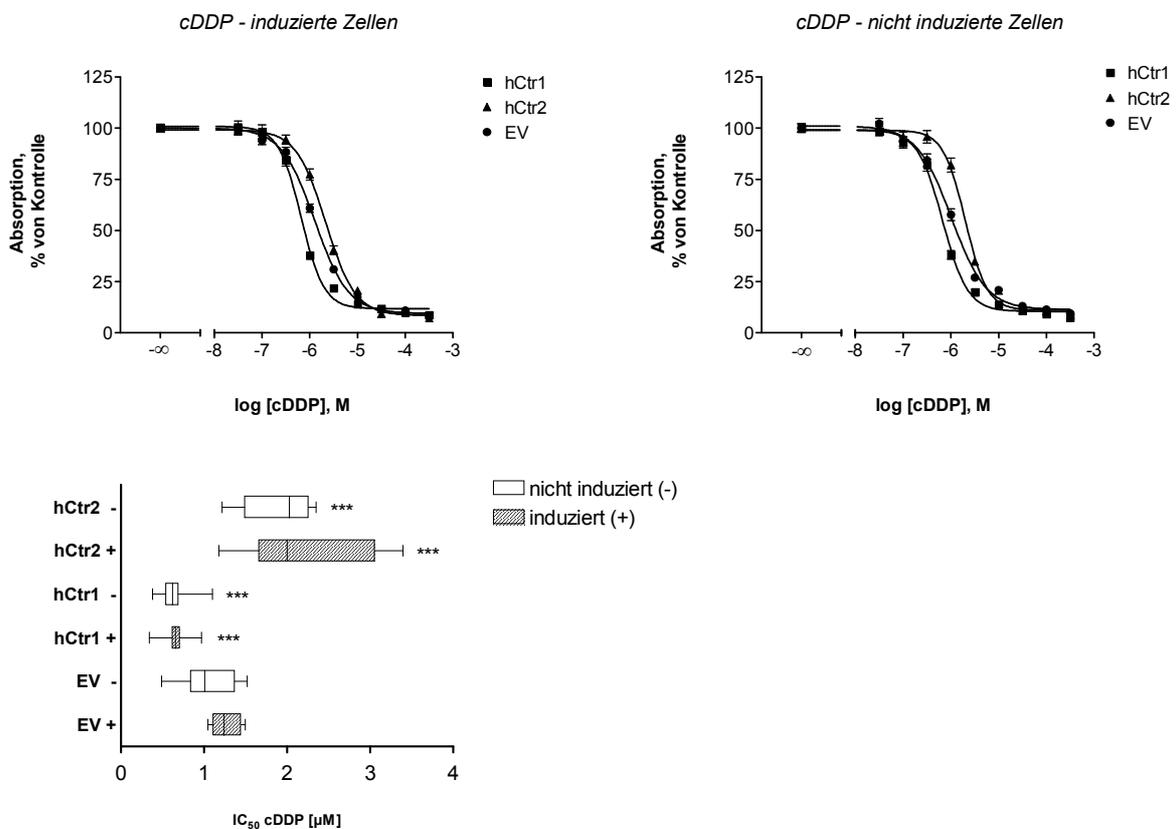


Abb. 3-9: Oben: Konzentrations-Effekt-Kurven für die Behandlung mit cDDP über 72 h, ermittelt durch MTT-Assays und anschließende nicht-lineare Regression. Die Abbildung zeigt die gemittelten Kurven aus 7 - 10 Experimenten mit jeweils 3 Replikaten \pm SEM. Die Absorptionswerte sind auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle prozentualisiert dargestellt.

Unten: Boxplot der IC₅₀-Werte mit 25%- und 75%-Quartile, Median und Spannweite. Asteriske markieren signifikante Unterschiede gegenüber der gleich behandelten EV-Kontrolle; p < 0,001 (***): hochsignifikant.

Wie erwartet, zeigte sich für induzierte hCtr1-Zellen im Vergleich zur EV-Kontrolle eine Linksverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve. Der Sensitivitätsfaktor betrug 1,92 (p < 0,001). Für hCtr2-Zellen zeigte sich dagegen ein umgekehrtes Bild: die Sensitivität nahm gegenüber EV-Zellen leicht – aber hochsignifikant – um den Faktor 1,70 ab. Um zu untersuchen, ob diese Veränderungen der Empfindlichkeit gegen cDDP nur bei den induzierten, also stark überexprimierenden Zellen auftraten, wurden ebenfalls nicht induzierte Zellen untersucht. Erstaunlicherweise waren die Ergebnisse sehr ähnlich. Es traten die gleichen Effekte in ähnlichem Ausmaß auf wie bei induzierten Zellen: für hCtr1 erhöhte sich die Sensitivität um Faktor 1,53 für hCtr2 verminderte sie sich um das 1,94-fache. Tabelle 3-8 zeigt eine Zusammenstellung der gemittelten IC₅₀- und pIC₅₀-Werte, sowie die statistischen Daten.

| cDDP | [+] | | | [-] | | |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | EV | hCtr1 | hCtr2 | EV | hCtr1 | hCtr2 |
| IC ₅₀ [µM] | 1,28 | 0,66 | 2,17 | 1,03 | 0,67 | 2,00 |
| pIC ₅₀ ± SEM | 5,89 ± 0,02 | 6,18 ± 0,02 | 5,66 ± 0,02 | 5,99 ± 0,03 | 6,17 ± 0,02 | 5,70 ± 0,02 |
| Sensitivität vs. EV | – | ↑ | ↓ | – | ↑ | ↓ |
| Faktor | – | 1,92 | 1,70 | – | 1,53 | 1,94 |
| p | – | < 0,001 | < 0,001 | – | < 0,001 | < 0,001 |
| n | 8 | 8 | 10 | 7 | 7 | 7 |

Tab. 3-8: Angegeben sind die gemittelten Daten sowie Sensitivitätsfaktoren im Vergleich zu entsprechend behandelten EV-Zellen. Die pIC₅₀-Werte wurden für die statistische Auswertung mittels ungepaarten t-Tests verwendet; Irrtumswahrscheinlichkeiten: p < 0,001: hochsignifikant. Signifikante Sensitivitätsunterschiede sind mit den Symbolen ↑ bzw. ↓ dargestellt.

Der Vergleich von hCtr1- und hCtr2-Zellen ergab für induzierte Zellen eine um Faktor 3,26 geringere Sensitivität der hCtr2-Zellen, bei den nicht induzierten Zellen betrug der Faktor 2,98 (jeweils p < 0,001).

Cisplatin in Kombination mit Kupfersulfat

Ein weiterer interessanter Aspekt war die Frage, ob Kupferionen und cDDP um den Transport durch hCtr1 und hCtr2 konkurrieren, z.B. durch gleiche extrazelluläre Bindungsdomänen oder einen identischen Transportmechanismus. Um dies zu untersuchen, wurden MTT-Assays durchgeführt, bei welchen den Zellen 2 h vor Beginn der Inkubation mit

cDDP CuSO₄ zugesetzt wurde. Dabei wurden basierend auf den Konzentrations-Effekt-Kurven für die 72 stündige CuSO₄-Inkubation Konzentrationen verwendet, die für den jeweiligen Zelltyp noch nicht im toxischen Bereich lagen (10 µM für hCtr2- und EV-, 0,01 µM für hCtr1-Zellen). Nach Zugabe von cDDP blieben beide Substanzen für weitere 3 Tage auf den Zellen. Als Kontrollen dienten ansonsten gleich behandelte Zellen ohne CuSO₄-Inkubation. Unter diesen Versuchsbedingungen traten für keinen der Klone signifikante Unterschiede zwischen mit CuSO₄ co-inkubierten Zellen und solchen ohne Kupferbehandlung auf (Abbildung 3-10). Die Absorptionen wurden für die KEK jeweils auf die weder mit CuSO₄ noch mit cDDP behandelte Kontrolle prozentualisiert. CuSO₄ allein hatte in den verwendeten Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum, da die beiden nicht mit cDDP inkubierten Kontrollen unabhängig vom CuSO₄-Zusatz keine Absorptionsunterschiede aufwiesen. Abbildung 3-10 zeigt eine Gegenüberstellung der verschiedenen Zelltypen jeweils mit und ohne Kupferbehandlung, Abbildung 3-11 die pIC₅₀-Werte.

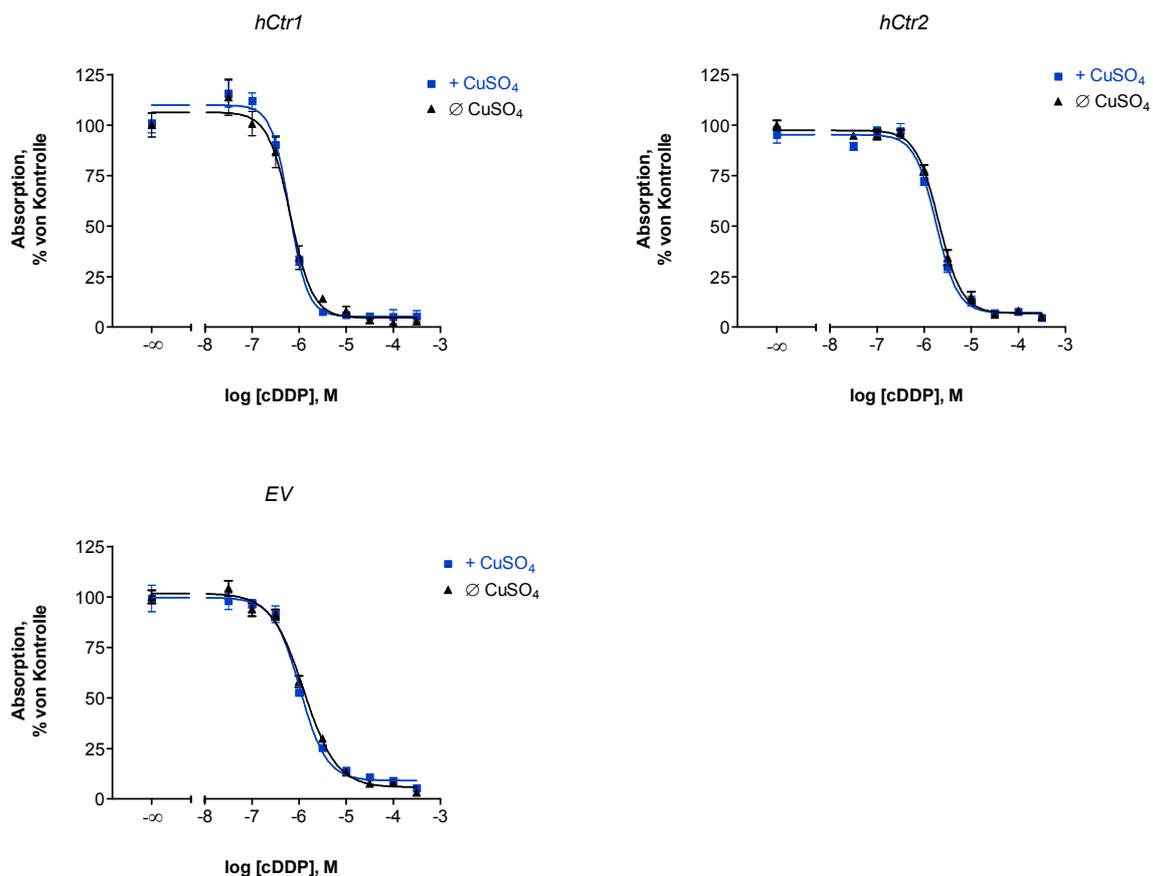


Abb. 3-10: Konzentrations-Effekt-Kurven für die Co-Inkubation mit cDDP und CuSO₄ über 72 h, ermittelt durch MTT-Assays und anschließende nicht-lineare Regression. Die Abbildung zeigt die (gemittelten) Daten aus 1 – 2 Experimenten mit jeweils 3 Replikaten ± SEM. Die Absorptionen wurden jeweils auf die weder mit CuSO₄ noch mit cDDP behandelte Kontrolle prozentualisiert. *Blaue Kurven:* mit CuSO₄ (IC₅₀-Werte [µM]: 1,05 (EV), 0,63 (hCtr1) und 1,81 (hCtr2)), *schwarze Kurven:* ohne CuSO₄ (IC₅₀-Werte [µM]: 1,26 (EV), 0,65 (hCtr1) und 2,04 (hCtr2)).

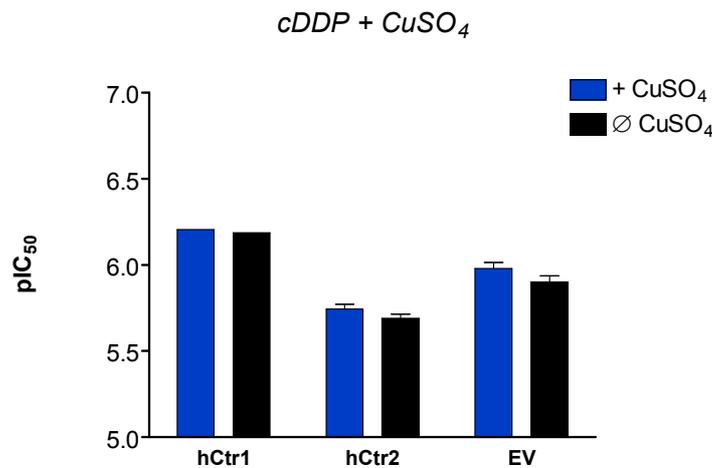


Abb. 3-11 Dargestellt sind die (mittleren) pIC₅₀-Werte (± SEM) mit und ohne Co-Inkubation mit CuSO₄ (n=1 für hCtr1-Zellen, n=2 für hCtr2- und EV-Zellen).

Liposomales Cisplatin

Um den Einfluss des cDDP-Uptakes in die Zelle durch hCtr1 oder hCtr2 weiter zu untersuchen, wurden MTT-Assays mit cDDP-beladenen Liposomen durchgeführt. Die Fragestellung hierbei war, ob durch diese Formulierung eine Umgehung der Effekte von hCtr1 und hCtr2 durch endozytotische Aufnahme in die Zelle möglich ist. Die Liposomen enthielten in ihrer Hülle Polyethylenglykol-Ketten, wie sie in Stealth-Liposomen für die bessere Bioverfügbarkeit im Patienten eingesetzt werden, jedoch keine spezifischen Liganden für ein Targeting von Zelloberflächenproteinen. Die Liposomen wurden freundlicherweise von Professor Bendas vom Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn zur Verfügung gestellt und von Frau Michaela Borrmann hergestellt (vgl. Krieger et al. 2010). Als Kontrollen wurden parallel MTT-Assays mit physiologische Kochsalzlösung enthaltenden Liposomen in den gleichen Verdünnungsstufen, sowie mit entsprechenden Konzentrationen an freiem cDDP durchgeführt. Es wurden drei Experimente durchgeführt, wobei induzierte Zellen verwendet wurden. Anschließend wurden die Effekte der Liposomenbehandlung zwischen hCtr1- und hCtr2-Zellen verglichen. EV-Zellen wurden als Kontrolle ebenfalls untersucht. Abbildung 3-12 zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurven der einzelnen Behandlungsformen für die drei Zelltypen. Alle Klone zeigten wie erwartet eine signifikant höhere Sensitivität gegenüber cDDP-beladenen Liposomen als gegen wirkstofffreie Liposomen ($p < 0,01$ für hCtr1-Zellen, $p < 0,05$ für hCtr2- und EV-Zellen). Letztere zeigten zwar ebenfalls toxische Effekte, allerdings erst bei deutlich höheren Konzentrationen. Der zytotoxische Effekt war also in den cDDP-Liposomen auf den Wirkstoff zurückzuführen. Die gemittelten IC₅₀-Werte betragen 1,71 μM (EV-Zellen), 0,48 μM (hCTR1-Zellen) und 2,46 μM (hCtr2-Zellen). In allen Zelltypen war freies cDDP in vergleichbarem Ausmaß etwas toxischer

als liposomales cDDP (Faktoren: 2,88 für EV-Zellen, 2,29 für hCtr1- und 2,01 für hCtr2-Zellen). Vermutlich hatte die Liposomenhülle hier einen abschirmenden Effekt. Signifikant war dieser Unterschied nur in EV-Zellen ($p < 0,05$). Da er aber mit dem der beiden anderen Klone vergleichbar war, ist nicht davon auszugehen, dass es sich hierbei um einen relevanten Unterschied zwischen EV-Zellen und Überexpressionsklonen handelt.

Die höhere Sensitivität von hCtr1-Zellen gegen cDDP im Vergleich zu hCtr2-Zellen wurde in Abschnitt 3.1.4.1 bereits gezeigt. Auch für die liposomale Formulierung zeigten hCtr1-Zellen eine signifikant um Faktor 5,07 höhere Empfindlichkeit ($p < 0,01$, vgl. Tab. 3-9). Für die parallel ermittelten IC_{50} -Werte für freies cDDP zeigte sich für hCtr1-Zellen ebenfalls eine signifikant höhere Sensitivität in vergleichbarem Ausmaß (Faktor 5,75, $p < 0,01$).

Eine Umgehung der mit freiem cDDP beobachteten Effekte von hCtr1 bzw. hCtr2 war diesen Ergebnissen zufolge mit der liposomalen Zubereitung also nicht möglich.

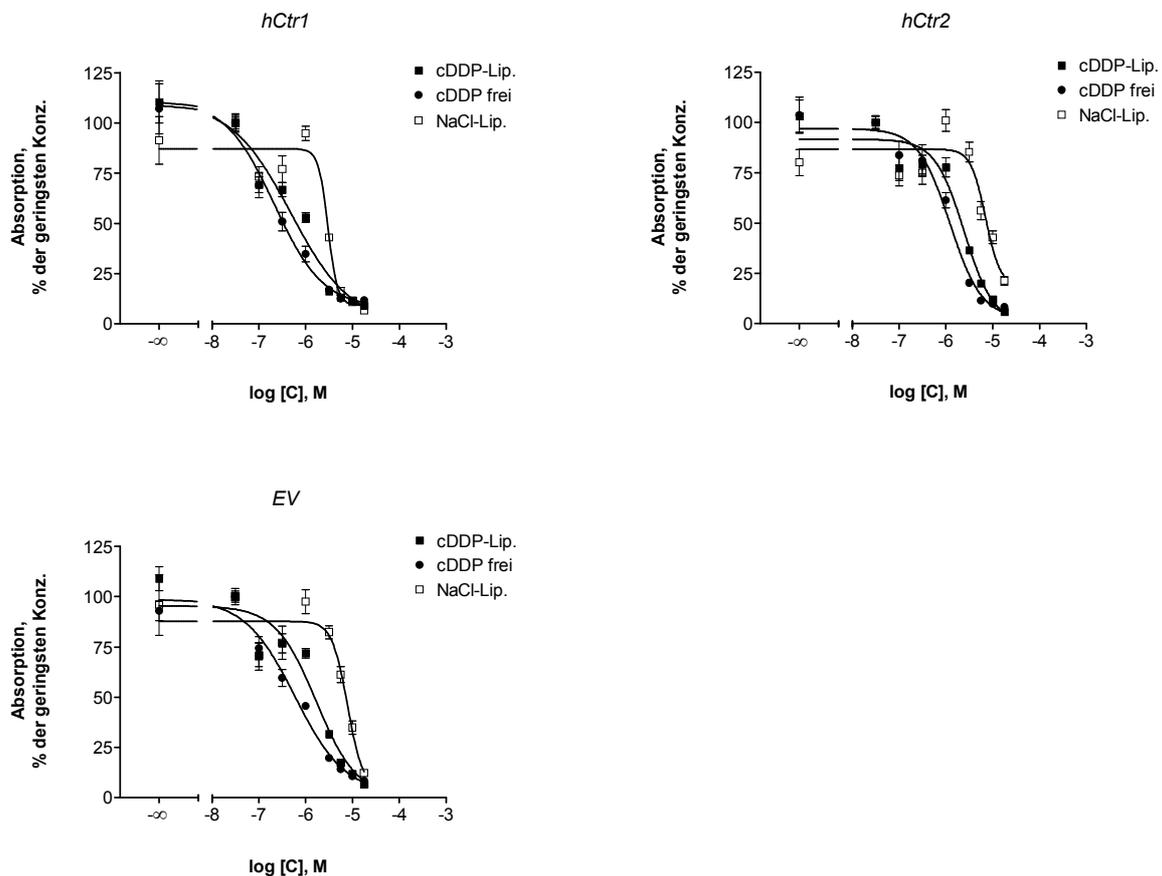


Abb. 3-12: Gemittelte Konzentrations-Effekt-Kurven aus 3 MTT-Assays mit je 3 Replikaten \pm SEM. Gezeigt sind jeweils die Gegenüberstellungen der drei Behandlungsarten, freies cDDP, liposomales cDDP und wirkstofffreie NaCl-Liposomen für jeden Zelltyp. Die Absorptionen wurden auf die jeweils geringste Konzentration prozentualisiert.

| cDDP | frei | | liposomal | |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | hCtr1 | hCtr2 | hCtr1 | hCtr2 |
| IC ₅₀ [µM] | 0,21 | 1,22 | 0,48 | 2,46 |
| pIC ₅₀ ± SEM | 6,67 ± 0,10 | 5,91 ± 0,08 | 6,32 ± 0,12 | 5,61 ± 0,08 |
| Faktor hCtr2 vs. hCtr1 | 5,75 | | 5,07 | |
| p | < 0,01 | | < 0,01 | |
| n | 3 | 3 | 3 | 3 |

Abb. 3-9: IC₅₀-Werte sowie pIC₅₀-Werte ± SEM für freies und liposomales cDDP in hCtr1- und hCtr2-Zellen (gemittelte Daten aus 3 MTT-Assays); Irrtumswahrscheinlichkeiten: p < 0,01: sehr signifikant.

Carboplatin

Der Einfluss von hCtr1 und hCtr2 auf die Sensitivität gegen Platinkomplexe wurde in induzierten Zellen auch für CBDCA untersucht. Ähnlich wie in den Versuchen mit cDDP waren hCtr1-Zellen auch gegen CBDCA signifikant sensitiver als EV-Zellen (Faktor 1,80) und hCtr2-Zellen waren signifikant um Faktor 1,50 weniger sensitiv. Vergleicht man die beiden Überexpressionsklone miteinander, so waren hCtr1-Zellen 2,97-mal sensitiver als hCtr2-Zellen (p < 0,01). Abbildung 3-13 zeigt die gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven für CBDCA, Tabelle 3-10 gibt die wichtigen Kenngrößen und die statistischen Daten an.

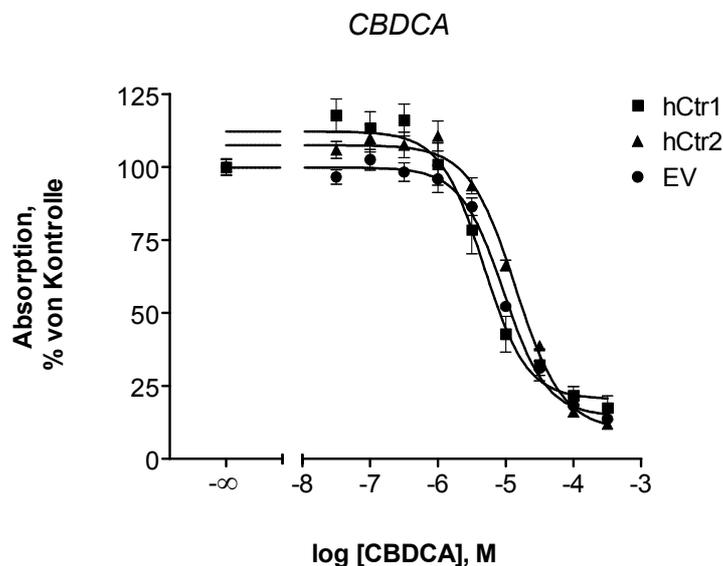


Abb. 3-13: Konzentrations-Effekt-Kurven für die Behandlung von induzierten Zellen mit CBDCA über 72 h, ermittelt durch MTT-Assays und anschließende nicht-lineare Regression. Die Abbildung zeigt die gemittelten Kurven aus 2 - 4 Experimenten mit jeweils 3 Replikaten ± SEM. Die Absorptionswerte sind auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle prozentualisiert dargestellt.

| CBDCA | EV | hCtr1 | hCtr2 |
|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| IC₅₀ [µM] | 9,32 | 4,71 | 14,0 |
| pIC₅₀ ± SEM | 5,03 ± 0,04 | 5,33 ± 0,08 | 4,85 ± 0,05 |
| Sensitivität vs. EV | – | ↑ | ↓ |
| Faktor | – | 1,80 | 1,50 |
| p | – | < 0,05 | < 0,05 |
| n | 4 | 2 | 4 |

Tab. 3-10: Angegeben sind die gemittelten Daten sowie Sensitivitätsfaktoren im Vergleich zu entsprechend behandelten EV-Zellen. Die pIC₅₀-Werte wurden für die statistische Auswertung mittels ungepaarten t-Tests verwendet; Irrtumswahrscheinlichkeiten: p ≤ 0,05: signifikant. Signifikante Sensitivitätsunterschiede sind mit den Symbolen ↑ bzw. ↓ dargestellt.

3.1.4.2 Sensitivität gegen Zytostatika anderer chemischer Struktur

Um zu untersuchen, ob der bei Platinkomplexen beobachtete Einfluss der hCtr1- bzw. hCtr2-Expression auf die Sensitivität mit deren chemischer Struktur in Zusammenhang steht oder ob es sich um unspezifische Effekte handelte, wurden auch Zytostatika mit anderer Struktur untersucht.

Doxorubicin

Doxorubicin gehört zu den Anthracyclinen. Es handelt sich um ein Molekül, das in seiner chemischen Struktur keinerlei Ähnlichkeit mit Platinkomplexen aufweist. Eine vergleichbare Wechselwirkung mit Kupfertransportern wie bei Platinkomplexen ist bei Vorliegen einer Strukturabhängigkeit letzterer daher unwahrscheinlich.

hCtr2-Zellen waren im Vergleich zur EV-Kontrolle etwas weniger sensitiv (Faktor 1,49). Dieser Unterschied war signifikant. Da in der Literatur Effekte auf die Zytotoxizität von Doxorubicin durch dessen Wechselwirkung mit Kupfer beschrieben wurden (Iyengar 1983; Cova et al. 1990), könnte eine durch die hCtr2-Überexpression bedingte Veränderung des intrazellulären Kupferstoffwechsels mit der verminderten Doxorubicinsensitivität der hCtr2-Zellen in Zusammenhang stehen. Allerdings zeigte sich für hCtr1-Zellen kein Unterschied in der IC₅₀ im Vergleich zu EV-Zellen. Um diesen Zusammenhang einer möglichen Wechselwirkung zwischen Kupferionen und Doxorubicin weiter zu untersuchen, wurde ein MTT-Assay mit gleichzeitiger Inkubation mit Doxorubicin und CuSO₄ – analog wie unter „cDDP in Kombination Kupfersulfat“ beschrieben – durchgeführt. Hierbei wirkte sich der Kupferionenzusatz weder in hCtr1- noch in hCtr2-Zellen auf die IC₅₀-Werte aus (Abbildung 3-15). Die verminderte Sensitivität der hCtr2-Zellen kann daher nicht eindeutig erklärt werden.

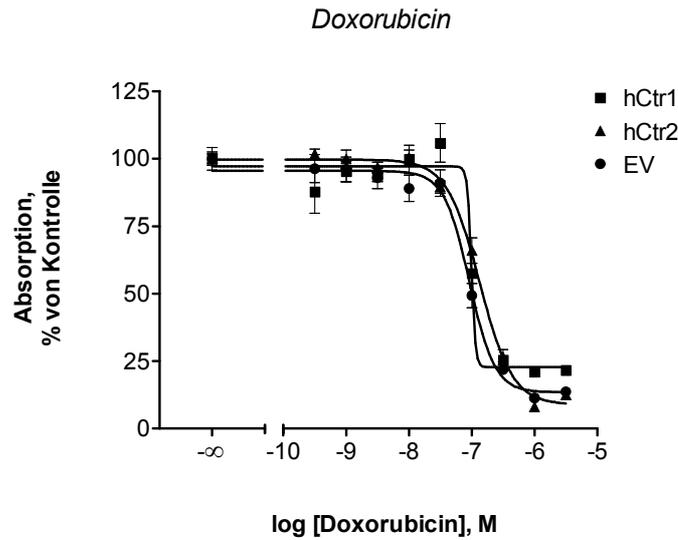


Abb. 3-14: (Gemittelte) KEK ± SEM aus 1 (hCtr1) bzw. 3 (hCtr2 und EV) MTT-Assays, gemessen in Triplikaten. Die Absorptionen wurden für jeden Zelltyp auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert.

| <i>Doxorubicin</i> | EV | hCtr1 | hCtr2 |
|---------------------------|-------------|-------|-------------|
| IC ₅₀ [nM] | 92,0 | 99,1 | 133 |
| pIC ₅₀ (± SEM) | 7,04 ± 0,04 | 7,00 | 6,88 ± 0,03 |
| Sensitivität vs. EV | — | ↔ | ↓ |
| Faktor | — | 1,08 | 1,49 |
| p | — | — | < 0,05 |
| n | 3 | 1 | 3 |

Tab. 3-11: Dargestellt sind IC₅₀- und pIC₅₀-Werte (hCtr1) bzw. die IC₅₀-Werte der gemittelten Kurven (hCtr2 und EV) und entsprechende pIC₅₀-Werte (± SEM) für Doxorubicin sowie Sensitivitätsunterschiede gegenüber EV-Zellen und statistische Angaben; p ≤ 0,05: signifikant. Signifikante Sensitivitätsunterschiede sind mit dem Symbol ↓ dargestellt, ↔ kennzeichnet nicht signifikante Unterschiede.

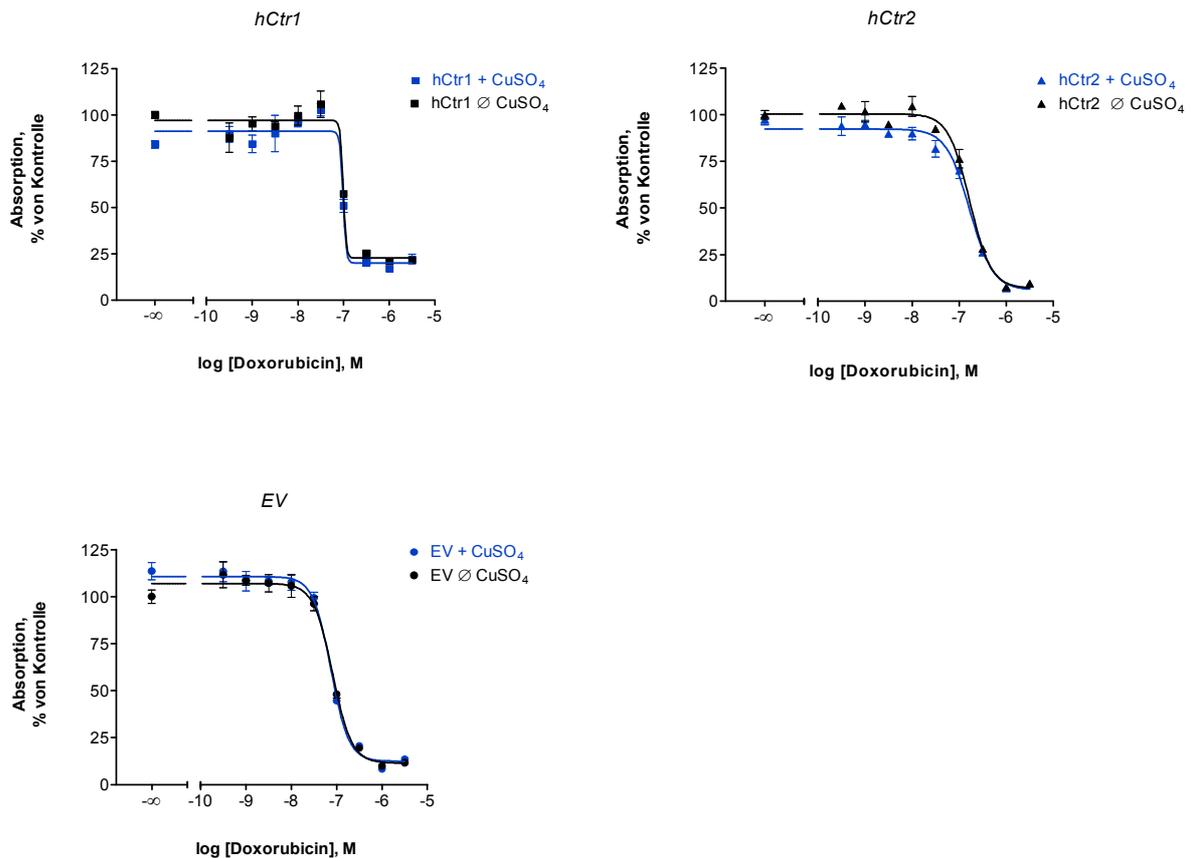


Abb. 3-15: Konzentrations-Effekt-Kurven aus einem MTT-Assay ($MW \pm SEM$ aus 3 Replikaten) mit Co-Inkubation von Doxorubicin und $CuSO_4$ ($10 \mu M$ für hCtr2- und EV-, $0,01 \mu M$ für hCtr1-Zellen). Die Absorptionen wurden jeweils auf die weder mit $CuSO_4$ noch mit Doxorubicin behandelte Kontrolle prozentualisiert. *Blaue Kurven:* mit $CuSO_4$; IC_{50} -Werte in [nM]: 97,9 (hCtr1); 166 (hCtr2); 74,2 (EV); *Schwarze Kurven:* ohne $CuSO_4$; IC_{50} -Werte in [nM]: 99,1 (hCtr1); 167 (hCtr2); 81,0 (EV)

Docetaxel

Mit dem Zytostatikum Doxorubicin konnte die Fragestellung, ob die veränderten Sensitivitäten der Überexpressionsklone gegen Platinkomplexe mit deren Struktur zusammenhängen, nicht eindeutig geklärt werden. Daher wurde mit Docetaxel ein weiteres Zytostatikum untersucht, das ebenfalls keine strukturelle Verwandtschaft mit den Platinkomplexen besitzt und von dem keine Wechselwirkung mit Kupferionen bekannt ist. Hierfür wurden 3 MTT-Assays mit Docetaxel an induzierten Überexpressions- und EV-Zellen durchgeführt. Abbildung 3-16 zeigt die gemittelten Kurven, Tabelle 3-12 die entsprechenden Kenngrößen. Im t-Test ergaben sich hier keine signifikanten Unterschiede für die pIC_{50} -Werte zwischen Überexpressions- und EV-Zellen. Auch hCtr1- und hCtr2-Zellen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

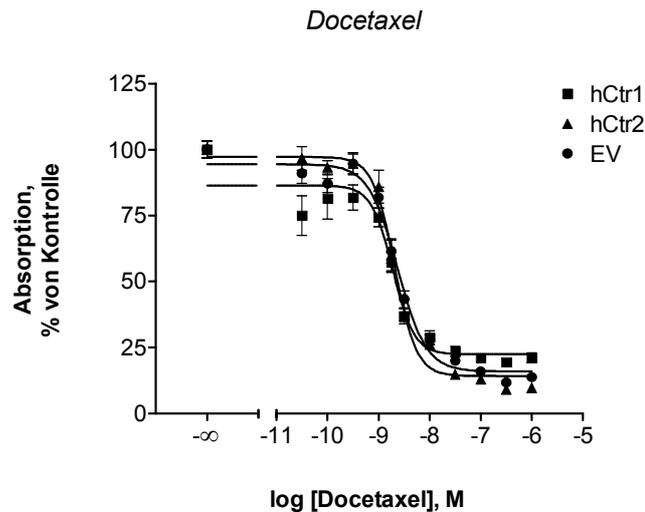


Abb. 3-16: Konzentrations-Effekt-Kurven für die Behandlung von induzierten Klonen mit Docetaxel über 72 h, ermittelt durch MTT-Assays und anschließende nicht-lineare Regression. Die Abbildung zeigt die gemittelten Daten aus 3 Experimenten mit jeweils 3 Replikaten ± SEM. Die Absorptionswerte sind auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle prozentualisiert dargestellt.

| <i>Docetaxel</i> | EV | hCtr1 | hCtr2 |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|
| IC ₅₀ [nM] | 2,34 | 1,90 | 2,06 |
| pIC ₅₀ ± SEM | 8,63 ± 0,04 | 8,72 ± 0,05 | 8,69 ± 0,03 |
| Sensitivität vs. EV | — | ↔ | ↔ |
| Faktor | — | 1,23 | 1,13 |
| p | — | n.s. | n.s. |
| n | 3 | 3 | 3 |

Tab. 3-12: Angegeben sind die gemittelten Daten aus 3 MTT-Assays, Sensitivitätsunterschiede im Vergleich zu EV-Zellen sowie die Irrtumswahrscheinlichkeiten der statistischen Auswertung; p >0,05: nicht signifikant (n.s.).

3.1.5 cDDP-Uptake und DNA-Platinierung

Um den Einfluss der hCtr-Proteine auf die Aufnahme von cDDP in die Zellen (Uptake) und die Vernetzung der DNA (Bildung von cDDP-DNA-Addukten) zu untersuchen, wurden induzierte Zellen für 2 h mit 20 µM cDDP behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mehrmals gewaschen. Aus einem Teil der Zellen wurde jeweils die genomische DNA isoliert, die restlichen Zellen für die Uptake-Bestimmung verwendet. Das Experiment

wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Für die DNA-Platinierung wurden außerdem zwei weitere Versuche durchgeführt, bei welchen die Zellen nach der zweistündigen Behandlung für weitere 7 h mit cDDP-freiem Nährmedium weiterkultiviert wurden (Auswaschphase). Der Platingehalt wurde bei Herrn Dr. Ralf Hilger (Innere Klinik & Poliklinik/Tumorforschung, Universitätsklinikum Essen), mittels ICP-MS bestimmt und auf die Zellzahl bzw. die DNA-Menge normalisiert. Abbildung 3-17 zeigt die gemittelten Werte aus allen Experimenten. Im Anhang sind diese Werte auch tabellarisch dargestellt. Als Kontrollen wurden auch Zellen untersucht, die nicht mit cDDP inkubiert wurden. Für die daraus gewonnenen DNA-Proben ergaben sich Platinkonzentrationen außerhalb des Kalibrierbereichs (< 5 pg/ml). Für die unbehandelten Ganzzellproben lagen die Werte entweder ebenfalls unterhalb von 5 pg/ml (in zwei Experimenten) oder betrug zwischen 8,1 und 12,7% der Werte von behandelten Proben (in einem Experiment). Die durch aus der Umwelt stammendes Platin hervorgerufene Verunreinigung wurde daher als vernachlässigbar angesehen und nicht in die Auswertung einbezogen. hCtr1-Zellen zeigten einen signifikant um Faktor 1,56 höheren Platin-Uptake als EV-Zellen.

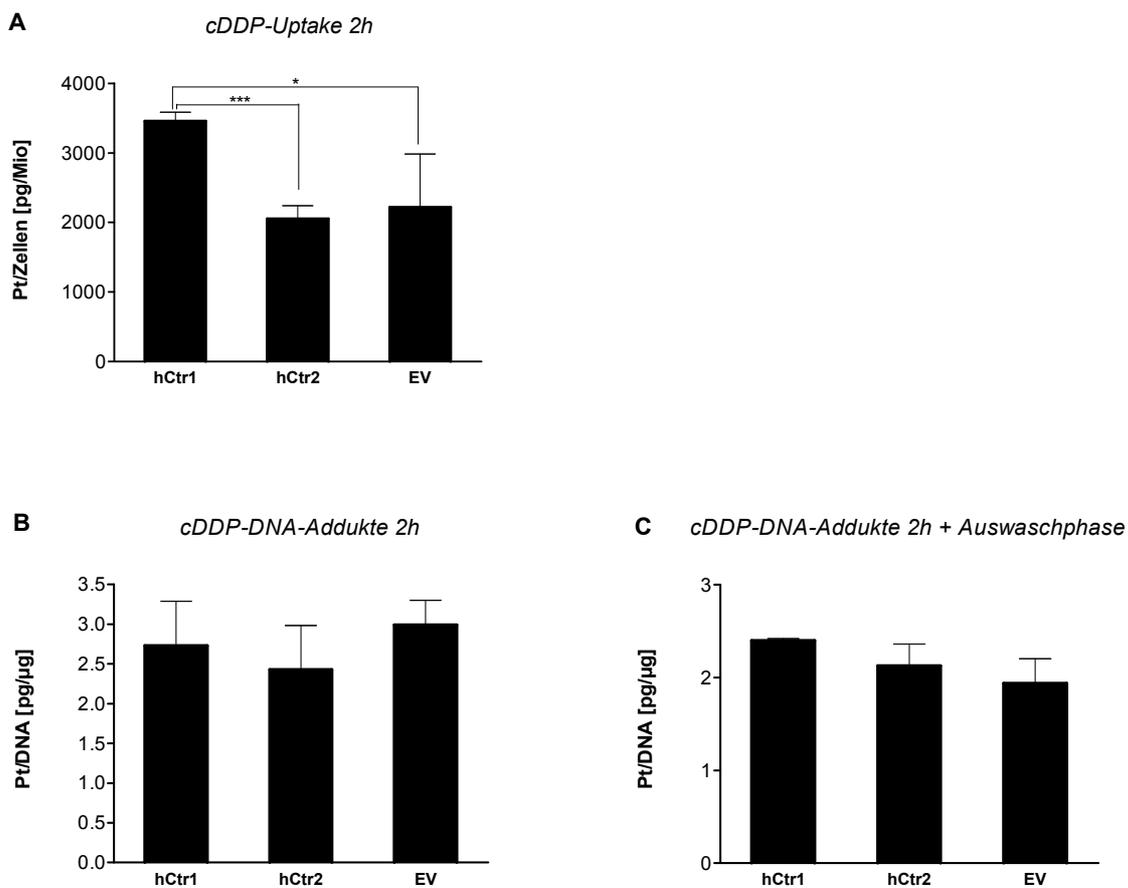


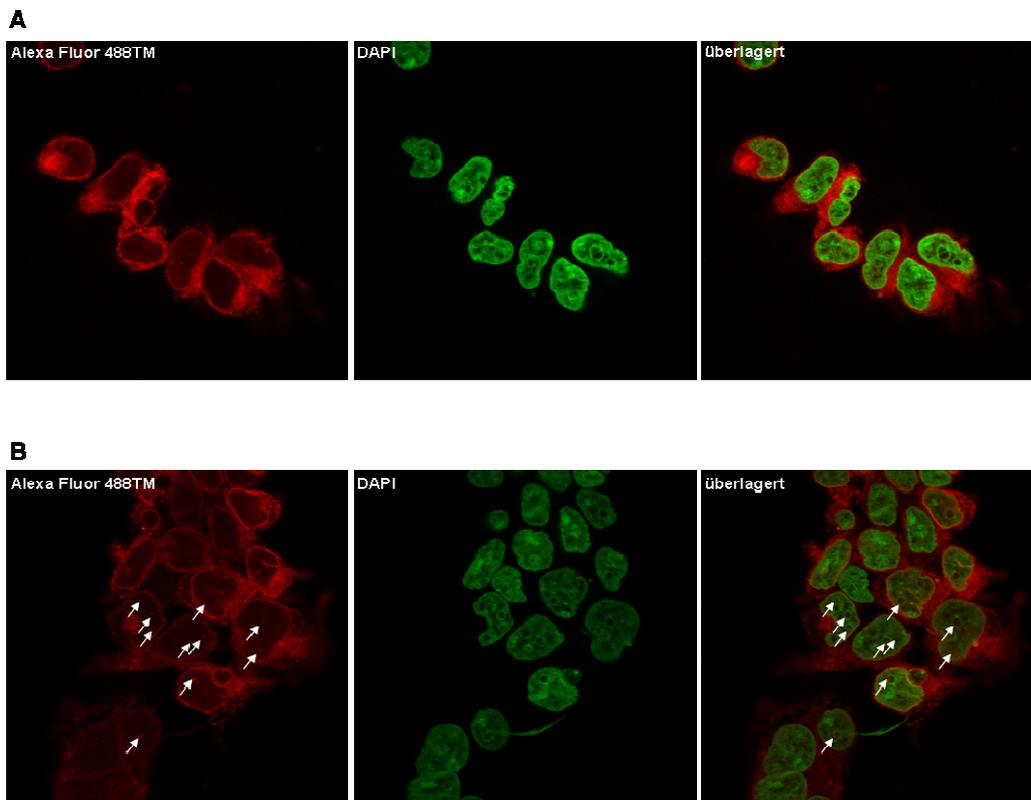
Abb. 3-17: (A) cDDP-Uptake (n=3); (B) DNA-Platinierung nach 2 h Inkubation ohne Auswaschen (n=3); (C) DNA-Platinierung nach 2 h Inkubation und anschließender siebenstündiger Auswaschphase (n=2). Gezeigt sind jeweils MW \pm SEM; Irrtumswahrscheinlichkeiten für die Auswertung mittels ungepaarten t-Tests: $p \leq 0,05$ signifikant (*), $p < 0,001$: hoch signifikant (***)

Im Vergleich zu hCtr2-Zellen war der Uptake in hCtr1-Zellen ähnlich stark erhöht, und zwar hochsignifikant um Faktor 1,68.

Die DNA-Platinierung war direkt nach der zweistündigen cDDP-Inkubation in hCtr1- und hCtr2-Zellen etwas niedriger als in EV-Zellen, nach der siebenstündigen Auswaschphase war es umgekehrt. Insgesamt waren die Unterschiede bei der Platin-DNA-Adduktbildung jedoch nicht signifikant.

3.1.6 Lokalisation von hCtr2 nach Behandlung mit Cisplatin

Wie in Abbildung 3-3, Kapitel 3.1.1.2 gezeigt, befindet sich hCtr2 sowohl in überexprimierenden Zellen als auch in den beiden anderen Zelltypen hauptsächlich im Zytoplasma, vermutlich in Vesikelmembranen. Z.T. konnte der Transporter auch diffus im Zellkern verteilt lokalisiert werden. Nach Behandlung von hCtr2-Zellen mit 20 μ M cDDP für 6 h traten jedoch hCtr2-Foci im Zellkern auf. Diese waren immer in oder direkt neben Nucleoli lokalisiert, welche man als Bereiche ohne DNA-Färbung durch den DNA-Interkalator DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) erkennen kann.



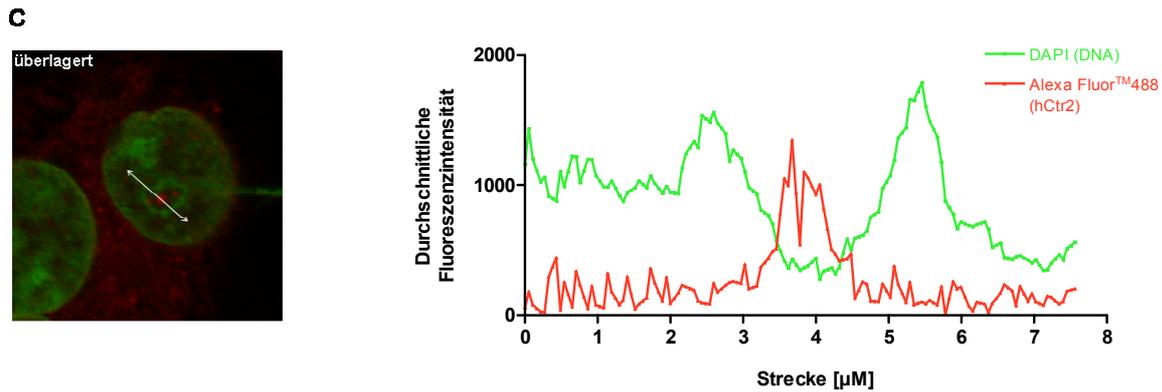


Abb. 3-18: (A) Unbehandelte hCtr2-Zellen. (B) hCtr2-Zellen nach Behandlung mit 20 µM cDDP für 6 h. Die Pfeile markieren hCtr2-Foci in Nucleoli. (C) Vergrößerte Detailansicht aus (B) und Auftragung der Fluoreszenzintensitäten in dem durch den Pfeil markierten Bereich gegen die vermessene Strecke

Des Weiteren wurden über einen definierten Bereich die Fluoreszenzintensitäten von DAPI und AlexaFluorTM488 gegen die Strecke aufgetragen. Auch hier zeigte sich deutlich, dass sich das Minimum der DAPI-Fluoreszenz und das Maximum der AlexaFluorTM488-Fluoreszenz überlagerten (Abbildung 3-18 C). Da in unbehandelten hCtr2-Zellen keine Foci in Nucleoli gefunden werden konnte, ist es unwahrscheinlich, dass die hCtr2-Überexpression hier zu einer artifiziellen Kompartimentierung geführt hat. Vielmehr ist zu vermuten, dass die veränderte Lokalisation auf den Einfluss von cDDP zurückgeführt werden kann.

3.2 Expression von hCtr1, hCtr2, ATP7A und ATP7B in Tumorzelllinien unterschiedlicher Cisplatinempfindlichkeit

Die Expression der vier Kupfertransporter hCtr1, hCtr2, ATP7A und ATP7B wurde in verschiedenen Tumorzelllinien auf Transkriptionsebene mittels RT-qPCR untersucht. Von jeder Zellart wurden die ursprüngliche Zelllinie („basal“) sowie eine zu einem gewissen Grad gegen cDDP resistente Sublinie („cisR“) verwendet, die durch wiederholte Behandlung mit cDDP aus den Ursprungszellen gewonnen wurde (Eckstein et al. 2009). Die Zellpärchen und Zytotoxizitätsdaten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Alexandra Hamacher zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien stammen aus Mamma-, Zungen- und Ovarialkarzinomen und wiesen bereits im Basalzustand recht unterschiedliche Sensitivitäten gegen Cisplatin auf. Die Optimierung der HKG mittels geNorm wurde für alle verwendeten Zellen gemeinsam durchgeführt. Dies ermöglichte einen Vergleich nicht nur zwischen basalen und resistenten Sublinien, sondern auch der verschiedenen Zelltypen untereinander. RPL13 und huPO erwiesen sich als stabilste HKG. Für den Vergleich der jeweiligen basalen und cisplatinresistenten Zellen eines Pärchens wurden die Fold Change-Werte gebildet. Hierfür wurden jeweils die normalisierten Expressionen in der resistenten Sublinie durch die der

entsprechenden Ursprungszelllinie geteilt („cisR vs. basal“, vgl. Tabelle 3-14). Die Abbildungen 3-19 A-E zeigen die normalisierten Expressionen der vier Kupfertransporter in den verschiedenen Zelllinien.

Für hCtr1 existiert ein Pseudogen (hCtr1 ψ), dessen Transkript von Møller et al. in humanen Fibroblasten gefunden wurde (Møller et al. 2000). Daher wurde in den untersuchten Zelllinien die normalisierte Expression von hCtr1 mit zwei verschiedenen Primerpärchen bestimmt: „hCtr1-Primer“, die sowohl hCtr1 als auch hCtr1 ψ erfassen und „hCtr1-spezifische Primer“, die nur an cDNA von hCtr1, nicht jedoch von hCtr1 ψ binden können. Letztere überspannen jedoch keine Exon-Exon-Schnittstellen, sodass evtl. in der Probe vorhandene Reste genomischer DNA mit erfasst worden sein könnten. Wie in den Abbildungen 3-19 A und B zu sehen ist, ergaben beide Messungen jedoch ähnliche Werte für die normalisierte Expression von hCtr1. Auch die Fold-Change-Werte zwischen basalen und resistenten Subzelllinien (s. Tabelle 3-14) waren gut vergleichbar. Diese Daten sprechen dafür, dass in keiner der Zelllinien eine nennenswerte Menge an hCtr1 ψ -Transkripten oder an Resten genomischer hCtr1- bzw. hCtr1 ψ -Sequenzen vorlag und beide Experimente vergleichbar sind.

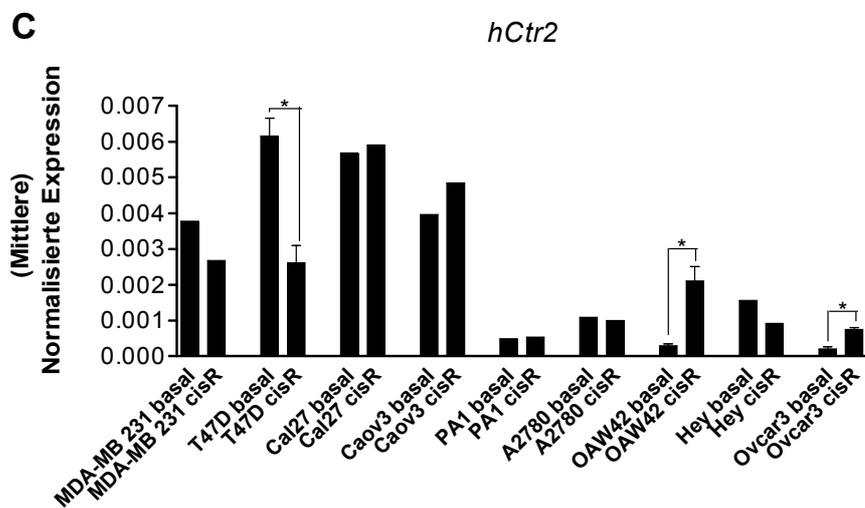
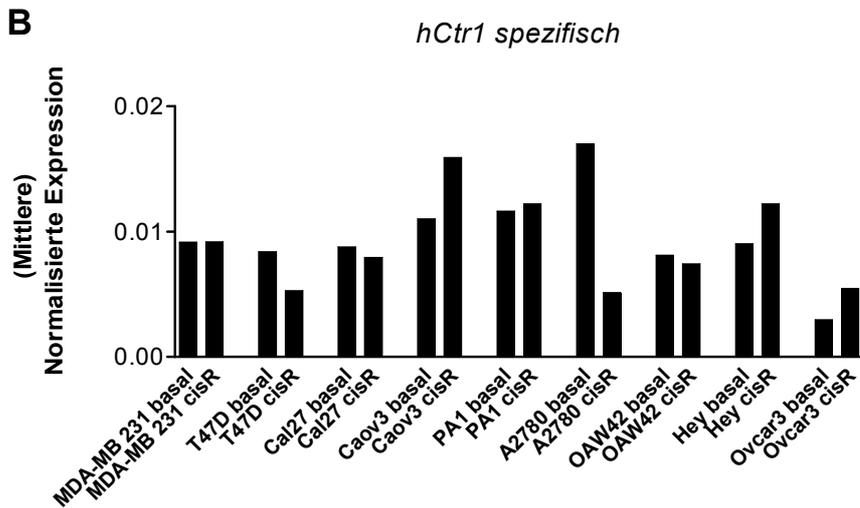
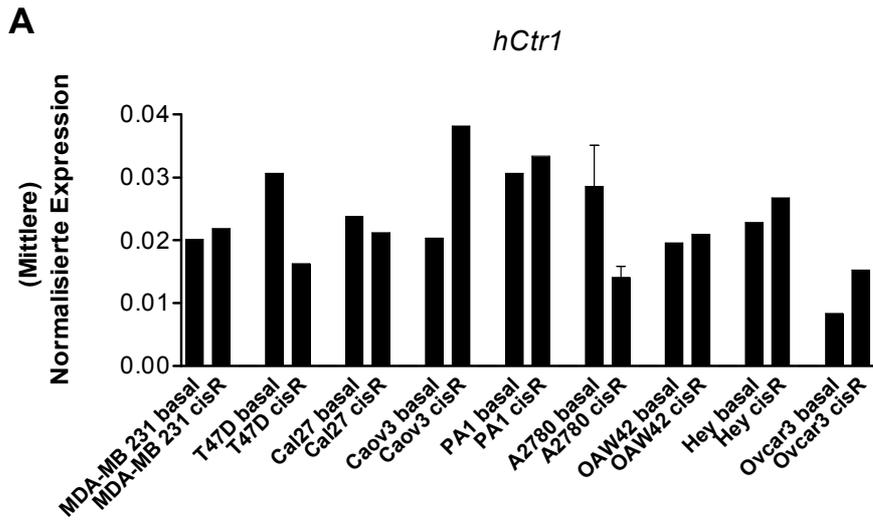
Für hCtr1 zeigten sich zwischen allen Zelltypen relativ geringe Expressionsunterschiede, während die Expressionsniveaus der anderen drei Transporter von Zelllinie zu Zelllinie stärker schwankten. Dabei war hCtr2 in Cal27-Zellen (Zungenkarzinom) sowie in MDA-MB231 und basalen T47D-Zellen (Mammakarzinome) stärker exprimiert als in den meisten Tumorzellen ovariellen Ursprungs. Von letzteren zeigten nur Caov3-Zellen ein vergleichbares Expressionsniveau zu MDA-MB231.

Für die Expression von ATP7A und ATP7B ließen sich keine Gemeinsamkeiten der Ovarialkarzinome im Vergleich zu Zellen anderer Gewebetypen feststellen.

Wie an Hand der IC₅₀-Werte in Tabelle 3-13 ersichtlich ist, konnte für den Vergleich über alle Zellarten keine direkte Korrelation zwischen der Sensitivität gegenüber Cisplatin und den normalisierten Expressionen der vier Kupfertransporter abgeleitet werden.

| cDDP IC ₅₀ [μM] | MDA-MB 231 | T47D | Cal27 | Caov3 | PA1 | A2780 | OAW42 | Hey | Ovcar3 |
|----------------------------|------------|------|-------|-------|------|-------|-------|-----|--------|
| basal | 33 | 10 | 7,8 | 0,83 | 0,55 | 1,1 | 0,5 | 5,3 | 6,3 |
| cisR | 52 | 22 | 45 | 5,1 | 4,6 | 15 | 8,7 | 26 | 15 |

Tab. 3-13: IC₅₀-Werte gegen cDDP in den verwendeten Tumorzelllinien



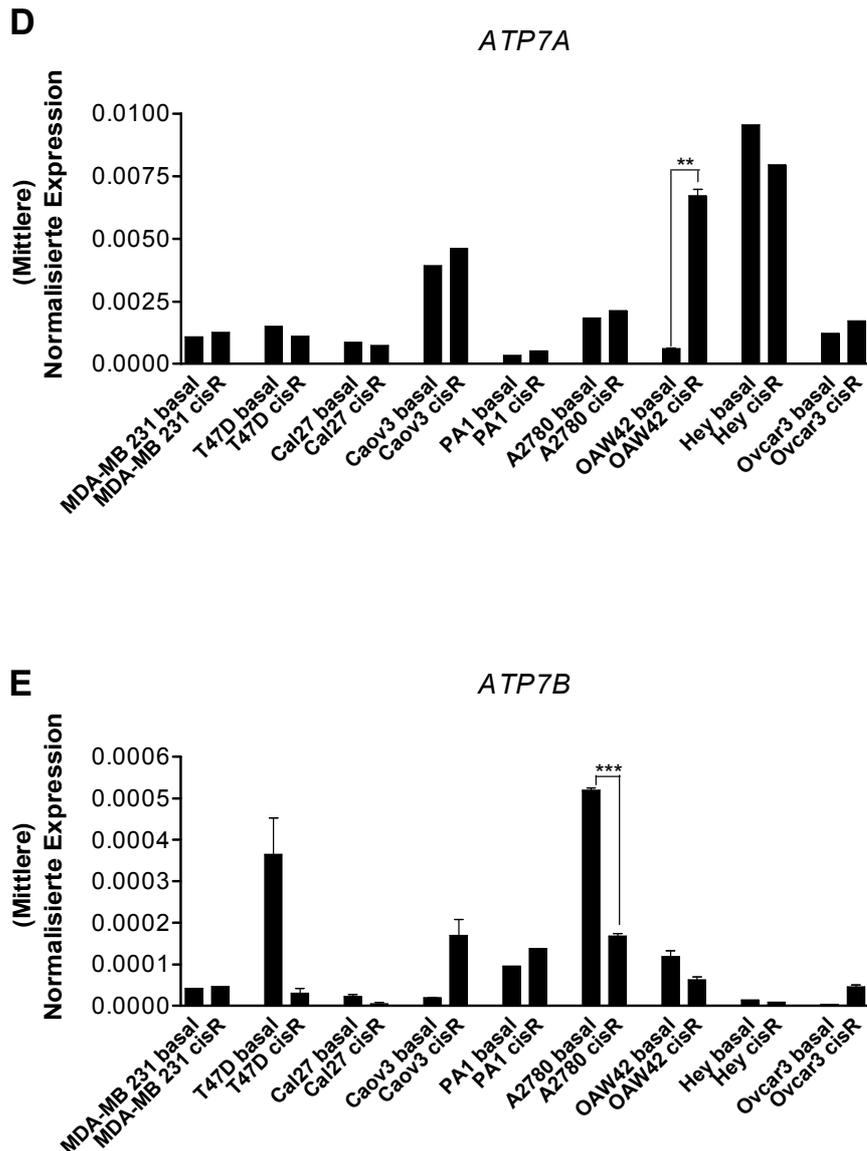


Abb. 3-19 A-E: Gezeigt sind die normalisierten Expressionen der vier Kupfertransporter in Pärchen aus ursprünglichen („basal“) und cDDP-resistenten („cisR“) Tumorzellen aus einem PCR-Lauf bzw. MW ± SEM aus 2-4 PCR-Läufen (für Proben mit Expressionsunterschieden ≥ Faktor 2 im ersten PCR-Lauf, vgl. Tab. 3-14). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten t-Tests; $p \leq 0,05$: signifikant (*); $p < 0,01$: sehr signifikant (**); $p < 0,001$: hochsignifikant (***).

Vergleicht man jeweils die basale und cDDP-resistente Sublinie eines Zelltyps miteinander, so war die Expression von hCtr1 für Caov3 und Ovcar3 mit Fold Change-Werten von 1,87 bzw. 1,83 etwas höher in resistenten als in basalen Zellen. Ein umgekehrtes Bild zeigte sich bei A2780- und T47D-Zellen. Hier exprimierten die resistenten Sublinien hCtr1 weniger stark als die basalen Zellen (Fold Change-Werte: 0,45 und 0,53).

hCtr2 war bei Ovcar3- und OAW42-Zellen in den resistenten Zellen deutlich stärker exprimiert (Fold Change-Werte: 4,38 bzw. 6,84). Gleichzeitig wiesen die resistenten OAW42-Zellen 11,3-fach erhöhte mRNA-Level für ATP7A auf, während bei Ovcar3 cisR ATP7B 11,7-

mal stärker abgelesen wurde als in der basalen Sublinie. Bei T47D und Hey wiesen dagegen die basalen Zellen stärkere hCtr2-Expressionen auf, der Unterschied zwischen den beiden Sublinien war hier jedoch geringer ausgeprägt als in Ovc3- und OAW42-Zellen (Fold Change-Werte: 0,38 bzw. 0,59).

Für ATP7A zeigten sich außer für OAW42-Zellen keine deutlichen Unterschiede zwischen basalen und resistenten Sublinien. ATP7B war sehr heterogen exprimiert, bei Caov3-Zellen zeigte die resistente Sublinie höhere Werte (Fold-Change 6,41), bei A2780-, Cal27- und T47D wiesen dagegen die basalen Zellen z.T. deutlich höhere mRNA-Level auf (Fold Change-Werte 0,32, 0,08 und 0,07). Für Zellpärchen mit Expressionsunterschieden zwischen basalen und resistenten Sublinien von \geq Faktor 2, sowie für die ATP7B-Expression in den bezüglich der hCtr2- und ATP7A-Expression interessanten OAW42-Zellen, wurden mit den cDNA-Proben noch ein bis drei weitere PCR-Läufe durchgeführt und aus den normalisierten Expressionen jeweils das arithmetische Mittel und der Standardfehler des Mittelwerts berechnet. Diese Werte wurden mittels ungepaarten t-Tests statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3-15 bis 3-18 zusammengefasst.

| Fold-Change cisR vs. basal | hCtr1 | | hCtr1-spez. | | hCtr2 | | ATP7A | | ATP7B | |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | FC | SD |
| MDA-MB 231 | 1,08 | 0,04 | 1,01 | 0,07 | 0,71 | 0,04 | 1,17 | 0,07 | 1,12 | 0,22 |
| T47D | 0,53 | 0,02 | 0,63 | 0,04 | 0,38 | 0,02 | 0,73 | 0,03 | 0,07 | 0,02 |
| Cal27 | 0,89 | 0,06 | 0,91 | 0,06 | 1,04 | 0,03 | 0,87 | 0,05 | 0,08 | 0,15 |
| Caov3 | 1,87 | 0,03 | 1,44 | 0,06 | 1,22 | 0,04 | 1,17 | 0,05 | 6,41 | 0,78 |
| PA1 | 1,09 | 0,03 | 1,05 | 0,05 | 1,09 | 0,07 | 1,49 | 0,17 | 1,43 | 0,22 |
| A2780 | 0,45 | 0,06 | 0,30 | 0,04 | 0,92 | 0,01 | 1,16 | 0,01 | 0,32 | 0,00 |
| OAW42 | 1,08 | 0,06 | 0,92 | 0,04 | 6,84 | 0,53 | 11,3 | 0,28 | 0,54 | 0,02 |
| Ovc3 | 1,83 | 0,12 | 1,85 | 0,09 | 4,38 | 0,20 | 1,39 | 0,06 | 11,7 | 0,92 |
| Hey | 1,17 | 0,04 | 1,36 | 0,10 | 0,59 | 0,02 | 0,83 | 0,01 | 0,63 | 0,21 |

Tab. 3-14: Fold-Change-Werte (FC) der vier Kupfertransporter in Pärchen aus ursprünglichen („basal“) und cDDP-resistenten („cisR“) Tumorzellen, wobei die Expression jeder resistenten Sublinie auf die der jeweiligen basalen Zelllinie bezogen wurde. Die Werte wurden aus den jeweiligen Geomitteln (GEO) berechnet (ein PCR-Lauf mit je zwei Replikaten, vgl. Anhang). Unterschiede ≥ 2 sind fett gedruckt.

| GOI | hCtr1 | |
|----------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Zelllinie | A2780 sens | A2780 cis R |
| Norm. Expr. | $(28,5 \pm 6,58) \times 10^{-3}$ | $(14,0 \pm 1,83) \times 10^{-3}$ |
| Expr. vs. sens | - | ↓ |
| FC vs. sens | $1,00 \pm 0,23$ | $0,49 \pm 0,06$ |
| p | n.s. | |
| n | 2 | 2 |

| GOI | hCtr2 | | | | | |
|----------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Zelllinie | T47D sens | T47D cisR | OAW42 sens | OAW42 cisR | Ovcar3 sens | Ovcar3 cisR |
| Norm. Expr. | $(6,15 \pm 0,51) \times 10^{-3}$ | $(2,61 \pm 0,48) \times 10^{-3}$ | $(3,03 \pm 0,53) \times 10^{-4}$ | $(2,11 \pm 0,39) \times 10^{-3}$ | $(2,10 \pm 0,50) \times 10^{-4}$ | $(7,51 \pm 0,52) \times 10^{-4}$ |
| Expr. vs. sens | - | ↓ | - | ↑ | - | ↑ |
| FC vs. sens | $1,00 \pm 0,08$ | $0,42 \pm 0,08$ | $1,00 \pm 0,17$ | $6,96 \pm 1,30$ | $1,00 \pm 0,24$ | $3,58 \pm 0,25$ |
| p | < 0,05 | | < 0,05 | | < 0,05 | |
| n | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

Tab. 3-15/3-16: MW und SEM der normalisierten Expressionen von hCtr1 bzw. hCtr2 aus 2 PCR-Läufen für ausgesuchte Zelllinien. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten t-Tests; Irrtumswahrscheinlichkeiten: $p > 0,05$: nicht signifikant, $p \leq 0,05$: signifikant. Die Fold-Change-Werte (FC) \pm SEM wurden durch Quotientbildung der normalisierten Expressionen und deren SEM durch die jeweilige normalisierte Expression der basalen Sublinie gebildet. Fold-Change-Werte \geq Faktor 1,5 sind mit den Symbolen \uparrow bzw. \downarrow dargestellt.

| GOI | ATP7A | |
|----------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Zelllinie | OAW42 sens | OAW42 cisR |
| Norm. Expr. | $(6,04 \pm 0,34) \times 10^{-4}$ | $(6,71 \pm 0,26) \times 10^{-3}$ |
| Expr. vs. sens | - | ↑↑ |
| FC vs. sens | $1,00 \pm 0,06$ | $11,11 \pm 0,43$ |
| p | < 0,01 | |
| n | 2 | 2 |

| GOI | ATP7B | | | | | |
|----------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Zelllinie | T47D sens | T47D cisR | Cal27 Sens | Cal27 cisR | Caov3 sens | Caov3 cisR |
| Norm. Expr. | $(3,65 \pm 0,87) \times 10^{-4}$ | $(3,05 \pm 1,17) \times 10^{-5}$ | $(2,22 \pm 0,57) \times 10^{-5}$ | $(4,96 \pm 3,15) \times 10^{-6}$ | $(1,97 \pm 0,09) \times 10^{-5}$ | $(1,70 \pm 0,38) \times 10^{-4}$ |
| Expr. vs. sens | - | ↓↓ | - | ↓ | - | ↑ |
| FC vs. sens | $1,00 \pm 0,24$ | $0,08 \pm 0,03$ | $1,00 \pm 0,26$ | $0,22 \pm 0,14$ | $1,00 \pm 0,05$ | $8,64 \pm 1,93$ |
| p | = 0,06 | | = 0,06 | | = 0,16 | |
| n | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 |

| GOI | ATP7B | | | | | |
|----------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Zelllinie | A2780 sens | A2780 cisR | OAW42 Sens | OAW42 cisR | Ovcar3 sens | Ovcar3 cisR |
| Norm. Expr. | $(5,19 \pm 0,06) \times 10^{-4}$ | $(1,68 \pm 0,06) \times 10^{-4}$ | $(1,19 \pm 0,14) \times 10^{-4}$ | $(6,33 \pm 0,62) \times 10^{-5}$ | $(3,69 \pm 0,27) \times 10^{-6}$ | $(4,63 \pm 0,41) \times 10^{-5}$ |
| Expr. vs. sens | - | ↓ | - | ↓ | - | ↑↑ |
| FC vs. sens | $1,00 \pm 0,01$ | $0,32 \pm 0,01$ | $1,00 \pm 0,12$ | $0,53 \pm 0,05$ | $1,00 \pm 0,07$ | $12,6 \pm 1,11$ |
| p | < 0,001 | | = 0,07 | | = 0,06 | |
| n | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 2 |

Tab. 3-17/3-18: MW \pm SEM der normalisierten Expressionen von ATP7A bzw. ATP7B aus 2-4 PCR-Läufen für ausgesuchte Zelllinien. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaarten t-Tests; Irrtumswahrscheinlichkeiten: $p > 0,05$: nicht signifikant, $p \leq 0,05$: signifikant, $p < 0,01$: sehr signifikant, $p < 0,001$: hoch signifikant. Die Fold-Change-Werte (FC) \pm SEM wurden durch Quotientbildung der normalisierten Expressionen und deren SEM durch die jeweilige normalisierte Expression der basalen Sublinie gebildet. Fold-Change-Werte \geq Faktor 1,5 sind mit den Symbolen \uparrow bzw. \downarrow dargestellt, Faktoren > 10 mit $\uparrow\uparrow$ bzw. $\downarrow\downarrow$.

Trotz der teilweise signifikanten Unterschiede zwischen Ursprungszelllinie und cisplatin-resistenter Sublinie in verschiedenen Tumorzellpärchen, war für keinen der Transporter ein genereller Zusammenhang zwischen einer veränderten Expression und dem Resistenzgrad gegenüber cDDP erkennbar.

3.3 Expression der vier Kupfertransporter in Gewebe aus Ovarialkarzinomen

Die Expression der vier Kupfertransporter wurde auch in Gewebeproben aus Ovarialtumoren von 23 verschiedenen Patientinnen mittels RT-qPCR untersucht. Das Material wurde freundlicherweise von PD Dr. Tjung-Won Park und Prof. Dr. Walther Kuhn aus der Universitätsfrauenklinik Bonn zur Verfügung gestellt. Als HKG wurden wie von Li et al. empfohlen TBP (TATA-Box binding protein) und GUSB (Glucuronidase beta) verwendet (Li

et al. 2009). Die Expression von hCtr1 konnte mit den hCtr1-spezifischen Primern bestimmt werden, da genomische DNA bei der RNA-Aufreinigung mittels DNase entfernt worden war. Die erhaltenen Expressionsdaten wurden nach zwei verschiedenen Verfahren ausgewertet. Zunächst wurden die Proben folgendermaßen in Gruppen eingeteilt:

- Primärtumor - benigne (eine Patientin)
- Primärtumor - FIGO I (eine Patientin)
- Primärtumoren - FIGO III (11 Patientinnen)
- Primärtumoren - FIGO IV (4 Patientinnen)
- Rezidive (5 Patientinnen)
- Borderline (eine Patientin)

Bei der zuletzt genannten Patientin handelte es sich laut Untersuchungsbericht um ein Adenokarzinom der Ovarien auf dem Boden eines Borderline-Tumors. Das Probenmaterial stammte aus Tumorgewebe, das bei der Erstdiagnose bereits vorhanden war, jedoch erst vier Monate später nach drei Zyklen einer Zytostatikatherapie mit CBDCA und Paclitaxel entfernt werden konnte. Diese Zellen waren also nicht mehr chemo-naiv. Auch die Proben von Rezidiven stammten im Gegensatz zum Gewebe aus anderen Gruppen von Patientinnen, die bereits mit cDDP oder CBDCA in Kombination mit anderen Zytostatika behandelt worden waren.

Die normalisierten Expressionen jedes untersuchten Transporters wurden – sofern Proben mehrerer Patientinnen vorlagen – innerhalb einer Gruppe gemittelt (arithmetisches Mittel). Für ATP7B konnte in insgesamt drei Proben kein eindeutiges Signal in der qPCR detektiert werden. Die Expression wurde daher in diesen Proben als nicht vorhanden, also „null“ angenommen und so verrechnet. Mit den Mittelwerten wurde mittels One-way-ANOVA-Test für ungepaarte Proben und anschließendem Tukey's Test eine statistische Untersuchung hinsichtlich der Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen durchgeführt. Für keinen der vier Transporter konnten signifikante Unterschiede zwischen den Proben festgestellt werden. Da für die Einstufungen benigne, FIGO I und Borderline-Tumor jeweils nur eine Probe zur Verfügung stand, konnten diese nicht in die statistische Auswertung einbezogen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-20 zusammengefasst.

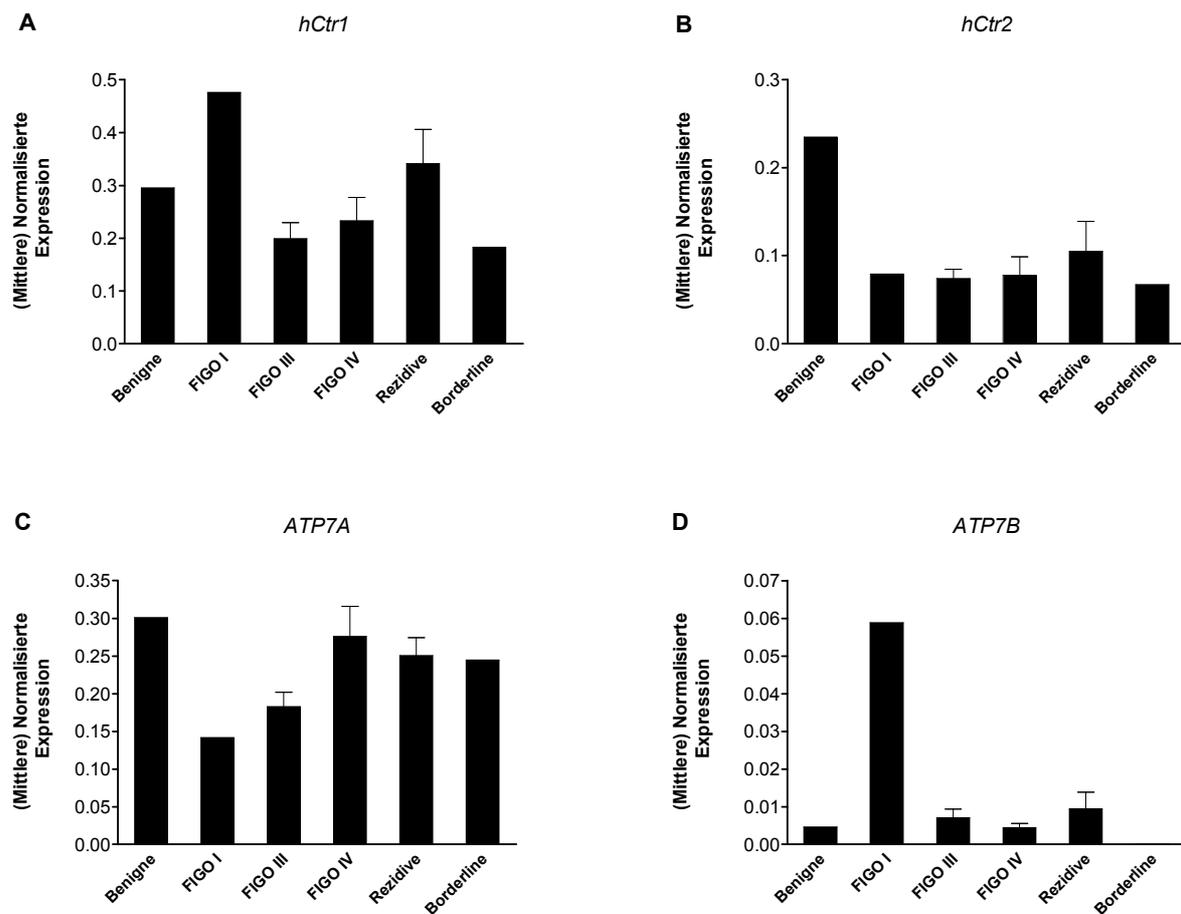


Abb. 3-20 A-D: Gezeigt sind die normalisierten Expressionen für die Proben benigne, FIGO I und Borderline bzw. MW und SEM der normalisierten Expressionen aus den Einzelproben der jeweiligen Gruppe für FIGO III, FIGO IV und Rezidive

| GOI | hCtr1 | | | | | |
|-------------|---------|--------|-------------|-------------|-------------|------------|
| Gruppe | Benigne | FIGO I | FIGO III | FIGO IV | Rezidive | Borderline |
| Norm. Expr. | 0,30 | 0,48 | 0,20 ± 0,03 | 0,23 ± 0,04 | 0,34 ± 0,07 | 0,18 |
| n | 1 | 1 | 11 | 4 | 5 | 1 |

| GOI | hCtr2 | | | | | |
|-------------|---------|--------|-------------|-------------|-------------|------------|
| Gruppe | Benigne | FIGO I | FIGO III | FIGO IV | Rezidive | Borderline |
| Norm. Expr. | 0,24 | 0,08 | 0,07 ± 0,01 | 0,08 ± 0,02 | 0,10 ± 0,03 | 0,07 |
| n | 1 | 1 | 11 | 4 | 5 | 1 |

| GOI | ATP7A | | | | | |
|-------------|---------|--------|-------------|-------------|-------------|------------|
| Gruppe | Benigne | FIGO I | FIGO III | FIGO IV | Rezidive | Borderline |
| Norm. Expr. | 0,30 | 0,14 | 0,18 ± 0,02 | 0,28 ± 0,04 | 0,25 ± 0,02 | 0,24 |
| n | 1 | 1 | 11 | 4 | 5 | 1 |

| GOI | ATP7B | | | | | |
|--------------------------------|---------|--------|-------------|-------------|-------------|------------|
| Gruppe | Benigne | FIGO I | FIGO III | FIGO IV | Rezidive | Borderline |
| Norm. Expr. x 10 ⁻³ | 4,62 | 58,9 | 7,09 ± 2,35 | 4,49 ± 1,12 | 9,46 ± 4,42 | n.e. |
| n | 1 | 1 | 11 | 4 | 5 | 1 |

Tab.3-19 bis 3-22: Normalisierte Expressionen für die Proben benigne, FIGO I und Borderline bzw. MW und SEM der normalisierten Expressionen aus den Einzelproben der jeweiligen Gruppe für FIGO III, FIGO IV und Rezidive; n.e. = nicht exprimiert. Für ATP7B sind die Werte der normalisierten Expressionen multipliziert mit 10⁻³ angegeben.

In einer zweiten Auswertung wurden jeder einzelnen Probe an Hand prognostischer Parameter Prognosepunkte zugeordnet (vgl. Tab. 3-23) und addiert. Die theoretisch möglichen Punktzahlen erstreckten sich von 2-10, der Median entsprach einem Wert von 6 Punkten. Alle Proben wurden nun in eine von zwei Kategorien eingeordnet:

- 2-6 Punkte: bessere Prognose oder
- 7-10 Punkte: schlechtere Prognose

Die Probe des benignen Tumors wurde der Kategorie „bessere Prognose“ zugeordnet.

Bei Rezidiven wurden FIGO-Stadium und Grading des ursprünglichen Primärtumors verwendet. Die Punkte zum Parameter „Primärtumor/Rezidiv“ wurden in Abhängigkeit des Auftretens des ersten Rezidivs bzw. des Ansprechens des Primärtumors auf die platinhaltige Therapie vergeben, auch wenn die Probe aus einem späteren Rezidiv stammte. Für zwei der Rezidivproben war das Grading des Primärtumors nicht ermittelbar. Es wurden daher 2,75 Gradingpunkte vergeben, was dem arithmetischen Mittelwert des Gradings der übrigen Proben entsprach, die alle ein Grading von 2 oder 3 aufwiesen.

| Parameter | Mögliche Punkte | Erläuterung |
|-------------------------|-----------------|---|
| FIGO-Stadium | 1 | Stadium gemäß FIGO-Klassifikation für Ovarialtumore |
| | 2 | |
| | 3 | |
| | 4 | |
| Grading | 1 | hoch differenziert |
| | 2 | mäßig differenziert |
| | 3 | niedrig differenziert |
| | 4 | entdifferenziert |
| Primärtumor/ Rezidiv | 0 | Gewebe stammte aus einem Primärtumor |
| | 1 | Gewebe stammte aus einem Rezidiv eines platinempfindlichen Karzinoms (therapiefreies Intervall bis zum 1. Rezidiv > 6 Monate bzw. Regression unter Platintherapie) |
| | 2 | Gewebe stammte aus einem Rezidiv eines platinresistenten Karzinoms (1. Rezidiv ≤ 6 Monate nach Abschluss der Primärtherapie bzw. Progress oder schlechte Regression unter Platintherapie) |

Tab. 3-23: Prognosepunkte

Des Weiteren wurde für die normalisierten Expressionslevel der einzelnen Transportergene jeweils der Median ermittelt und die Proben in eine zweite Kategorie eingeordnet:

- niedrige Expression (normalisiertes Expressionslevel ≤ Median) oder
- hohe Expression (normalisiertes Expressionslevel > Median)

Für jedes untersuchte Gen wurde die Anzahl der Proben für jede mögliche Kombination der beiden Kategorien bestimmt:

- niedrige Expression und bessere Prognose
- niedrige Expression und schlechtere Prognose
- hohe Expression und bessere Prognose
- hohe Expression und schlechtere Prognose

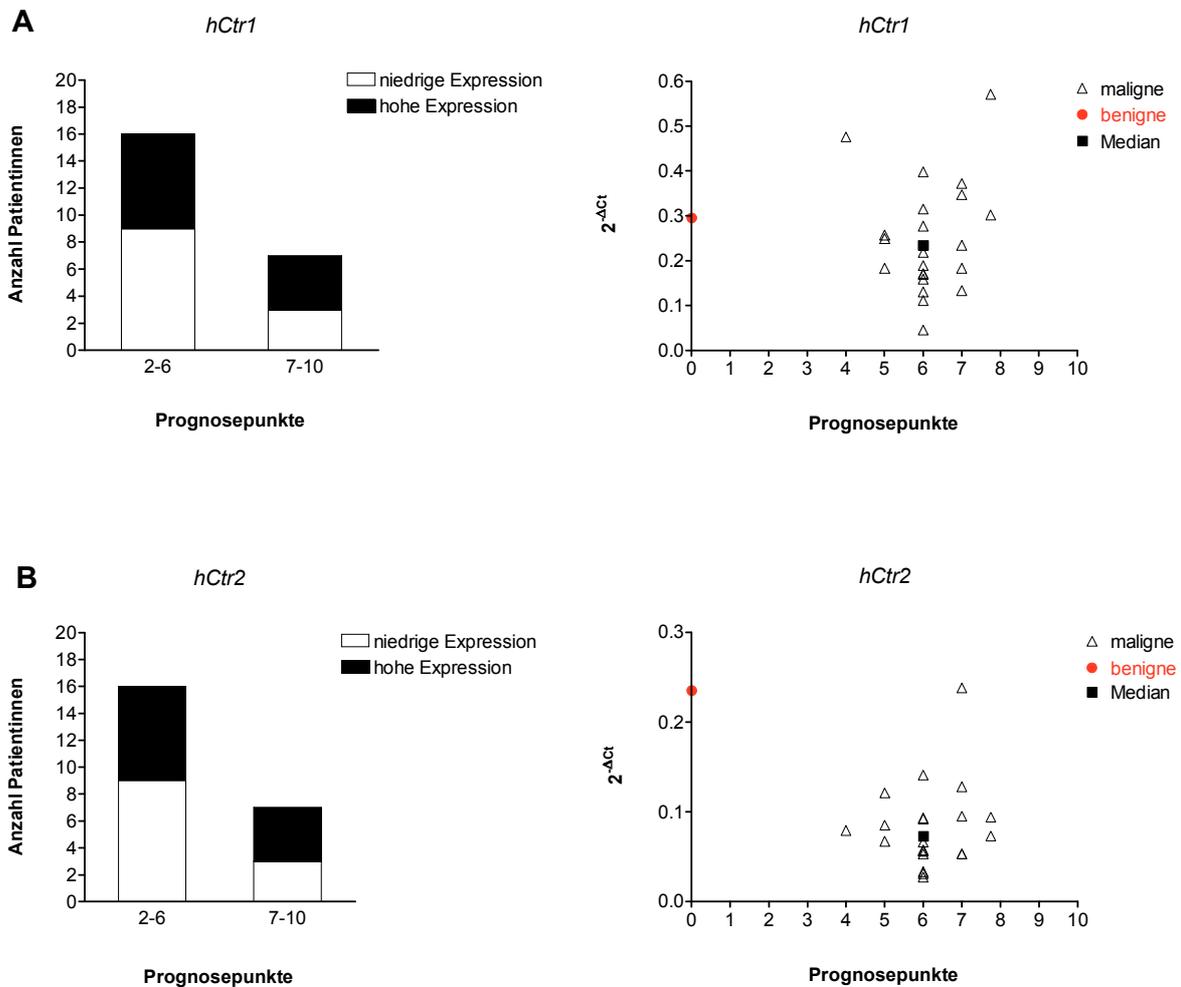
Mit dieser Einteilung wurde mittels Fisher's Exact-Test ermittelt, ob eine Korrelation zwischen Expressionsniveau und Prognose besteht.

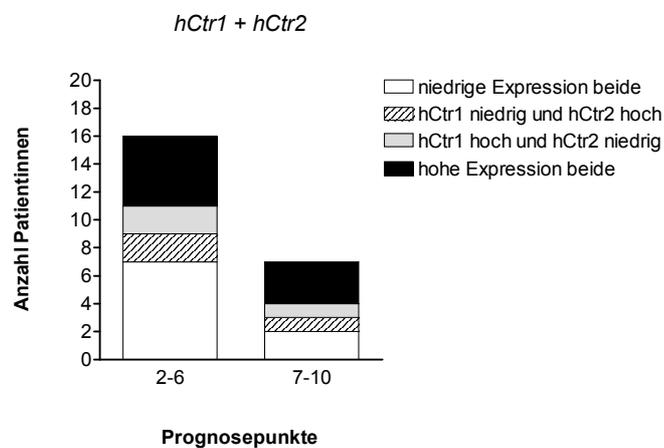
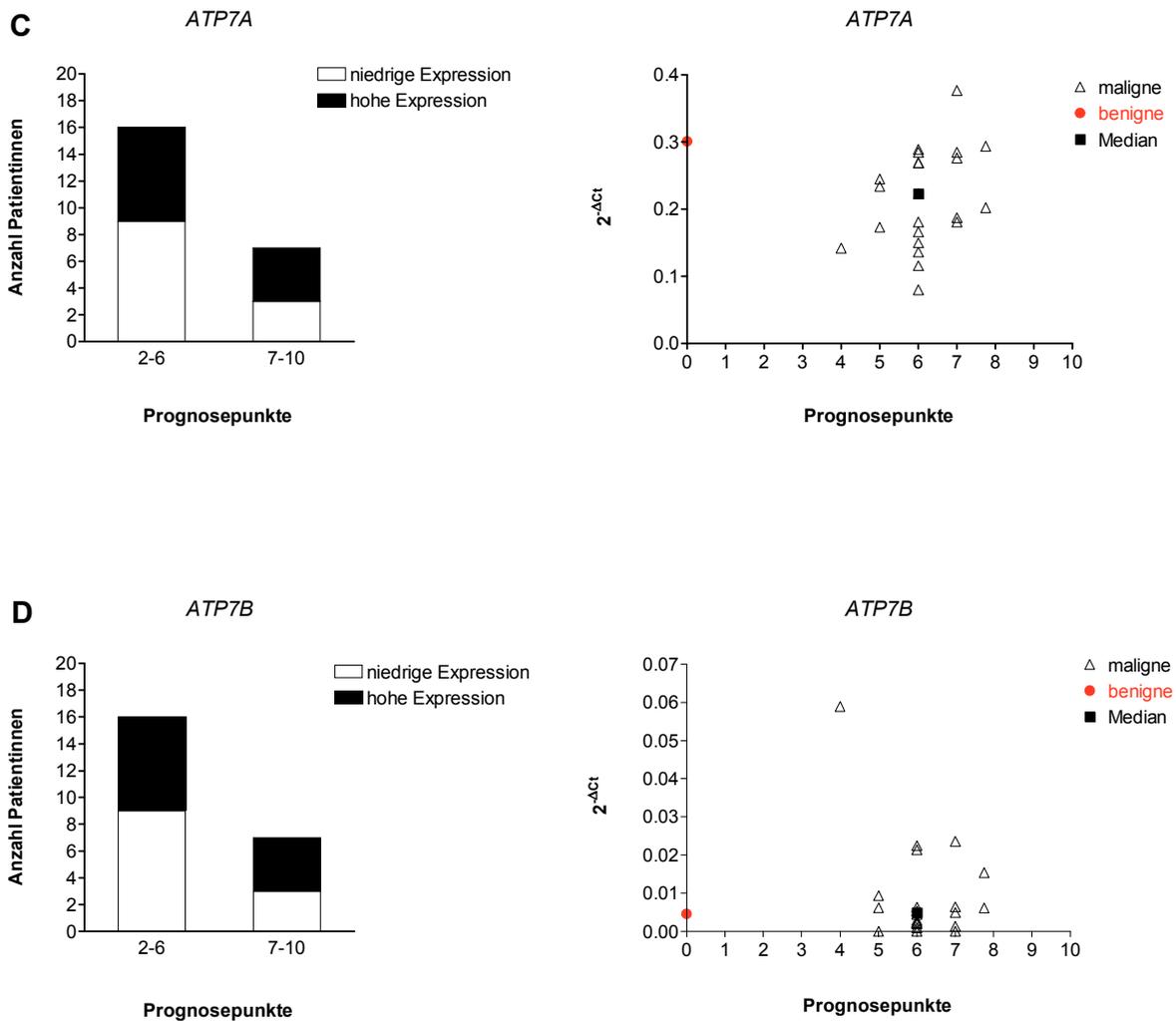
In einer Studie von Lee et al. zeigten Patientinnen mit Ovarialtumoren die schlechteste Prognose und die höchste Resistenzrate gegen Platinkomplexe, wenn gleichzeitig die hCtr1-Expression niedrig und die hCtr2-Expression hoch war (Lee et al. 2011). In Anlehnung an dieses Erkenntnis wurde eine weitere Korrelationsanalyse mittels χ^2 -Test durchgeführt und in folgende Kategorien eingeteilt:

- niedrige hCtr1-Expression und niedrige hCtr2-Expression
- niedrige hCtr1-Expression und hohe hCtr2-Expression
- hohe hCtr1-Expression und niedrige hCtr2-Expression
- hohe hCtr1-Expression und hohe hCtr2-Expression

Als zweite Kategorie diene wieder die Einteilung „bessere Prognose“ oder „schlechtere Prognose“.

Weder für die Expression der einzelnen Transporter noch für die Kombination aus hCtr1- und hCtr2-Expression konnte eine Korrelation zwischen Expressionsniveau und Prognose festgestellt werden (Abb. 3-21 und 3-22).





Ein direkter Vergleich der einzelnen Transporterexpressionen zwischen Gewebeproben und Tumorzellen ist wegen der Verwendung unterschiedlicher HKG nicht möglich. Unterschiede im Expressions*verhältnis* der verschiedenen Transporter können jedoch gegenübergestellt werden. Hierbei fällt auf, dass sowohl in Tumorzellen als auch in Gewebeproben hCtr2 und ATP7A jeweils Expressionen ähnlicher Größenordnung aufwiesen. Im Vergleich dazu war ATP7B in beiden Probenarten um etwa eine Zehnerpotenz weniger stark exprimiert. Jedoch war das Verhältnis zwischen hCtr1- und hCtr2-Expression unterschiedlich: hCtr1 wurde in Tumorzellen bis zu 10-mal stärker exprimiert als hCtr2. Auch in nicht überexprimierenden Flp-InTM T-RExTM-293-Klonen, also Zellen nicht-malignen Ursprungs, war die hCtr1-Expression etwa 13-mal höher. In Gewebeproben dagegen zeigte hCtr1 in den meisten Gruppen nur um etwa Faktor 3 stärkere Expressionswerte als hCtr2. So war hCtr2 in letzteren relativ betrachtet stärker exprimiert als in den untersuchten Zelllinien. Dennoch zeigte sich in den Gewebeproben wie auch in den Tumorzellen *keine* Korrelation zwischen hCtr2-Expression und Platinsensitivität bzw. anderen prognostischen Parametern. Die Untersuchung der Gewebeproben bestätigt damit die in den Tumorzellen gefundenen Ergebnisse.

4 DISKUSSION

4.1 Funktionelle Untersuchungen von hCtr1 und hCtr2 in Überexpressions-Zellen

In der Diplomarbeit von Christina Stratenschulte wurde in verschiedenen Tumorzellen eine durch cDDP verursachte Expressionserhöhung von hCtr2 auf mRNA-Ebene gefunden (Stratenschulte 2005). Diese beobachteten Veränderungen gaben Anlass zu der Vermutung, dass dieser Kupfertransporter wie seine Verwandten hCtr1, ATP7A und ATP7B im Stande ist, mit Platinkomplexen in Wechselwirkung zu treten, und dass er an Transport bzw. intrazellulärer Verteilung dieser Wirkstoffe beteiligt sein könnte. Zum damaligen Zeitpunkt war zu der physiologischen Rolle von hCtr2 im Kupferstoffwechsel und insbesondere hinsichtlich seines potentiellen Einflusses auf die Wirkung von Platinkomplexen nur wenig bekannt. Daher wurde hCtr2 als interessantes Zielprotein für zelluläre Resistenzmechanismen gegen Platinverbindungen in der hier vorliegenden Arbeit näher untersucht. Zentral war dabei der Ansatz, hCtr2 zu überexprimieren und die in der Folge auftretenden zellulären Effekte hinsichtlich des Verhaltens gegenüber Platinverbindungen zu untersuchen. Als Zellsystem wurden Flp-InTM T-RExTM-293-Zellen verwendet, als nicht überexprimierende Kontrollen fungierten mit dem Leervektor transfizierte Zellen. Da aber auch der Vergleich zwischen hCtr2 und hCtr1 interessant erschien, wurde hCtr1 ebenfalls überexprimiert und alle Experimente in den drei Zelltypen durchgeführt und verglichen.

4.1.1 Nachweis der Überexpression von hCtr1 und hCtr2

Die Überexpression von hCtr1 und hCtr2 wurde auf verschiedenen Ebenen bewiesen: sowohl die Untersuchung mittels RT-qPCR auf mRNA-Ebene (Abschnitt 3.1.1.1) als auch die Charakterisierung der Kupfersensitivität durch MTT-Assays auf funktioneller Ebene (Abschnitt 3.1.1.3) zeigten deutlich, dass der jeweilige Transporter im entsprechenden Überexpressionsklon nach Induktion mit Doxycyclin verstärkt exprimiert wurde. Für hCtr2 konnte dies darüber hinaus mittels SDS-PAGE/Westernblot und durch Immunfluoreszenzmikroskopie (Abschnitt 3.1.1.2) auf Translationsebene nachgewiesen werden. Des Weiteren wiesen auch Überexpressionsklone, die nicht mit Doxycyclin induziert wurden, in den qPCR-Experimenten bereits eine gewisse Überexpression auf (Abb. 3-1, Tab. 3-2/3-3). Bei hCtr1-Zellen war diese mäßige, etwa 2-fache Expressionssteigerung gegenüber EV-Kontrollzellen zwar nicht signifikant. Jedoch waren die nicht induzierten hCtr1-Zellen in MTT-Assays mit 72-stündiger Kupferbehandlung bereits geringfügig, diesmal aber signifikant sensitiver als EV-Zellen (Tab. 3-4). Dies weist auf eine leichte hCtr1-Überexpression in nicht induzierten Zellen hin. Durch Induktion mit Doxycyclin wurde die hCtr1-Überexpression auf mRNA-Ebene schließlich weiter auf Faktor 41,7 gesteigert ($p < 0,01$).

In hCtr2-Zellen war die Überexpression auf mRNA-Ebene in nicht induzierten Zellen im Vergleich zur EV-Kontrolle bereits signifikant um Faktor 95,2 erhöht, wurde aber durch die Inkubation mit Doxycyclin noch einmal signifikant auf über Faktor 2000 gesteigert (Abb. 3-1, Tab. 3-2/3-3). Auf Proteinebene zeigten sich für hCtr2 im Westernblot vergleichbare Ergebnisse (Abb. 3-2 C).

Damit standen Zellen mit drei verschiedenen Expressionsstadien zur Verfügung: EV-Zellen mit einer basalen Expression, nicht induzierte Überexpressionszellen mit einer geringeren und induzierte Überexpressionszellen mit einer starken Überexpression.

4.1.2 Untersuchung der Lokalisation von hCtr2

Bei den Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz an induzierten Zellen konnte neben der Überexpression in hCtr2-Zellen auch die in der Literatur beschriebene Lokalisierung von hCtr2 bestätigt werden (Abb. 3-3). In hCtr2-Zellen zeigte sich eine deutliche Färbung im gesamten Zytoplasma, was mit Beobachtungen von van den Berghe et al. übereinstimmt, nach denen hCtr2 in späten Endosomen und Lysosomen zu finden ist (v. d. Berghe et al. 2007). Dass es sich hierbei nicht um eine artifizielle, durch die Überexpression beeinflusste Lokalisation handelte, konnte durch gleichzeitige Untersuchung von hCtr1- und EV-Zellen gezeigt werden. Auch hier war hCtr2 im Zytoplasma zu finden. Bei dieser basalen hCtr2-Expression war auch zu erkennen, dass die Färbung am stärksten in der Nähe des Zellkerns auftrat. Dies könnte auf ein gehäuftes Vorkommen des membranständigen hCtr2-Proteins im Trans-Golgi-Netzwerk und/oder dem rauen endoplasmatischen Retikulum hinweisen. Weiterhin waren sowohl in hCtr2-Überexpressionszellen als auch in hCtr1-Zellen hCtr2-Proteine diffus verteilt im Zellkern zu finden. Hinweise auf eine hCtr2-Lokalisation in der Kernmembran zeigten sich dagegen nicht. Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung zu den Ergebnissen von Blair et al. in Studien an humanen Ovarialkarzinomzellen (Blair et al. 2010).

Bei weiteren Experimenten wurde darüber hinaus in induzierten hCtr2-Zellen der Einfluss einer Cisplatinbehandlung auf die hCtr2-Lokalisation untersucht. In unbehandelten Zellen war hCtr2 nicht in Nucleoli zu finden, jedoch häuften sich nach Cisplatinbehandlung hCtr2-Foci direkt in Nucleoli oder in deren unmittelbarer Nähe (Abb. 3-18). Eine Vermessung der Fluoreszenzintensitäten von DNA-markierendem DAPI und hCtr2-markierendem Alexa FluorTM488 über die Strecke eines Ausschnitts aus dem Zellkern bestätigte diese Lokalisation (Abb. 3-18 C). Eine Co-Lokalisation von hCtr2 und Nucleoli wurde zuvor in der Literatur noch nicht beschrieben. Interessant ist dabei insbesondere der Aspekt, dass Cisplatin diese hCtr2-Lokalisation scheinbar induziert oder begünstigt.

Ob diese veränderte Lokalisation einen Einfluss auf die Reaktion von cDDP mit der nucleären DNA hat, ist ungewiss, da in Experimenten zur Untersuchung der Platin-DNA-

Adduktbildung keine signifikanten Unterschiede zwischen hCtr2- und EV-Zellen festgestellt werden konnten (s. Abschnitt 4.1.8).

4.1.3 Einfluss von hCtr1 und hCtr2 auf die Toxizität von Platinkomplexen

Im MTT-Assay mit 72-stündiger Cisplatinbehandlung zeigte sich eine 1,70-fach *verminderte* Sensitivität von hCtr2-Zellen im Vergleich zu EV-Zellen, wohingegen hCtr1-Zellen – wie auf Grund von Literaturdaten erwartet (Larson et al. 2009; Ishida et al. 2002) – in einer ähnlichen Größenordnung um Faktor 1,92 *sensitiver* wurden. Diese Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen waren zwar sehr klein, aber signifikant, und bestätigten sich in mehrfachen Wiederholungen des Experiments (Abb. 3-9, Tab. 3-8). Auch gegenüber hCtr2-Zellen war der hCtr1-Klon signifikant 2,98-mal (nicht induzierte Zellen) bzw. 3,26-mal (induzierte Zellen) sensitiver. hCtr1 und hCtr2 scheinen also *gegensätzliche* Effekte auf die Cisplatin-toxizität zu haben. Das gleiche konnte darüber hinaus auch für Carboplatin nachgewiesen werden (Abb. 3-13, Tab. 3-10).

Wie in Abbildung 4-1 dargestellt, korrelieren diese Ergebnisse gut mit den von Blair und Kollegen veröffentlichten Beobachtungen einer *erhöhten* Platinsensitivität in murinen embryonalen Fibroblasten nach *Verminderung* der mCtr2-Expression (Blair et al. 2009).

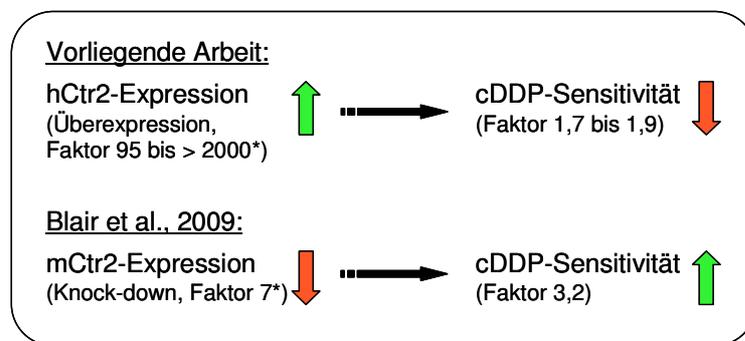


Abb. 4-1: Effekte einer veränderten Ctr2-Expression auf die Platinsensitivität

Das Ausmaß der Sensitivitätsänderung von ca. Faktor 3 lag bei Blair et al. in einer ähnlichen Größenordnung wie in der hier vorliegenden Arbeit. Die durch den Knock-down erreichte Verminderung der mCtr2-Expression betrug bei Blair und Kollegen etwa Faktor 7 auf mRNA-Ebene und ca. Faktor 2 auf Proteinebene. Die Ergebnisse werden von den Autoren daher als eine relativ große Änderung der Sensitivität gegen cDDP und CBDCA bei kleiner Änderung der Ctr2-Expression beurteilt („modest reductions in the level of CTR2 protein were accompanied by quite large increases in sensitivity to both DDP and CBDCA“). Daraus könnte man den Schluss ziehen, dass eine stärkere Veränderung der Ctr2-Expression möglicherweise eine größere Auswirkung auf die Platinsensitivität hat. Dies war bei den in

der hier vorliegenden Arbeit ermittelten Daten jedoch nicht der Fall: induzierte hCtr2-Zellen zeigten eine mehr als 2000-fach verstärkte Expression und dennoch nur die geringe Abnahme der Sensitivität von Faktor 1,70 für cDDP und 1,50 für CBDCA ($p < 0,001$ bzw. $< 0,05$). Interessanterweise zeigten die nicht mit Doxycyclin induzierten hCtr2-Zellen eine vergleichbare, ebenfalls signifikante Abnahme der Cisplatinsensitivität, obwohl sie eine signifikant um mehr als Faktor 20 niedrigere hCtr2-Expression aufwiesen als nach Doxycyclinbehandlung (Abb. 3-9, Tab. 3-8). Der die Platinsensitivität mindernde Effekt von hCtr2 scheint also auch bei der geringeren Überexpression (nicht induziert) vorhanden zu sein und konnte durch zusätzliche Steigerung der Expression mittels Induktion mit Doxycyclin nicht weiter verstärkt werden. Die von Blair und Kollegen aufgestellte Theorie einer möglichen Steigerung des Ctr2-Effekts auf die Cisplatinwirkung über das bisher beobachtete Ausmaß hinaus wird also durch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit nicht unterstützt.

Daher ist auch eine klinische Bedeutung von hCtr2 im Zusammenhang mit Cisplatinresistenzen nicht wahrscheinlich, zumal eine Veränderung der hCtr2-Expression in Tumoren wesentlich geringfügiger ausgeprägt sein dürfte als in dem hier verwendeten Zellsystem. Diese Erkenntnis wird auch durch die Expressionsstudien in Tumorzellen und Gewebeproben unterstützt, die in Abschnitt 4.2 ausführlich diskutiert werden.

Für hCtr1-Zellen war die Erhöhung der Cisplatinsensitivität in nicht induzierten Zellen im Vergleich zur EV-Kontrolle ebenfalls signifikant und mit Faktor 1,53 vergleichbar mit der in induzierten Zellen (Abb. 3-9, Tab. 3-8).

4.1.4 Einfluss von hCtr1 und hCtr2 auf die Toxizität anderer Zytostatika

Es stellt sich die Frage, ob die beobachteten hCtr-Effekte auf die Zytotoxizität mit der Struktur der Platinkomplexe in Zusammenhang stehen. Daher wurden auch Zytostatika mit vollkommen anderer chemischer Struktur untersucht.

So ist ein Transport von Doxorubicin durch hCtr1 oder hCtr2 auf Grund der Kenntnisse über hCtr-Proteine unwahrscheinlich. Dennoch zeigte sich gegenüber diesem Zytostatikum in hCtr2-Zellen ebenfalls eine leichte, signifikante Verminderung der Sensitivität im Vergleich zu EV-Zellen (Abb. 3-16, Tab. 3-12). In der Literatur wird über mögliche intrazelluläre Wechselwirkungen zwischen Kupferionen und Doxorubicin sowie veränderte Wirkintensitäten von Anthracyclinen durch Komplexierung mit Kupfer berichtet (Iyengar 1983; Cova et al. 1990). Da anzunehmen ist, dass die Überexpression eines Kupfertransporters Einfluss auf den intrazellulären Kupferstoffwechsel hat, könnte die veränderte Doxorubicinsensitivität in hCtr2-Zellen hierdurch erklärt werden. Dennoch ist es verwunderlich, dass in hCtr1-Zellen keine Veränderung der Sensitivität festgestellt werden

konnte und dass die gleichzeitige Behandlung mit CuSO_4 in keinem der drei Zelltypen eine Auswirkung auf den IC_{50} -Wert gegen Doxorubicin hatte (Abbildung 3-15).

Da also mit Doxorubicin die Frage nach einer Strukturabhängigkeit der veränderten Sensitivitäten gegen Platinkomplexe in den Überexpressionsklonen nicht eindeutig geklärt werden konnte, wurde als weiterer Vergleich das Taxan Docetaxel herangezogen. Auch Docetaxel weist chemisch keine strukturelle Ähnlichkeit mit Platinkomplexen auf und eine Wechselwirkung mit Kupferionen ist nicht bekannt. Gegen dieses Zytostatikum zeigten sich schließlich keine signifikanten Unterschiede in der Zytotoxizität zwischen den verschiedenen Zelltypen (Abb. 3-16 und Tab. 3-12).

Es ist daher zu vermuten, dass die durch Überexpression von hCtr1 bzw. hCtr2 verursachten Veränderungen der Sensitivität mit der Struktur der Platinkomplexe in Zusammenhang stehen, da eine generell veränderte Sensitivität gegenüber zytotoxischen Substanzen durch die Überexpression von hCtr1 oder hCtr2 nicht auftrat.

4.1.5 Vergleich der Auswirkungen der Überexpression von hCtr1 bzw. hCtr2 auf die Sensitivität gegen Kupfersulfat und Cisplatin

Wie in Tabelle 4-1 dargestellt, wirkte sich die Überexpression von hCtr1 auf die Sensitivität gegen CuSO_4 und cDDP unterschiedlich stark aus.

| Sensitivitätsveränderung hCtr1- vs. EV-Zellen | induziert | nicht induziert |
|---|-------------------------------|------------------|
| gegen CuSO_4 , 3 h | ↑ x 18,3 | (nicht bestimmt) |
| gegen CuSO_4 , 72 h | ↑ x 628 (1. Phase der KEK) | ↑ x 1,27 |
| Gegen cDDP, 72 h | ↑ x 1,92 | ↑ x 1,53 |

Tab. 4-1: Zusammenstellung der Veränderungen in der Sensitivität gegenüber CuSO_4 und cDDP in hCtr1-Zellen versus EV-Zellen

Induzierte hCtr1-Zellen zeigten im Vergleich zum EV-Klon eine wesentlich stärkere Sensitivitätserhöhung gegen CuSO_4 als gegen cDDP..

In nicht induzierten hCtr1-Zellen war die beobachtete Sensitivitätserhöhung dagegen für beide Substanzen vergleichbar. Die weniger starke Überexpression von hCtr1 führte also zu einer geringen, aber signifikanten Erhöhung der cDDP-Sensitivität, die durch weitere Steigerung der Überexpression jedoch nicht mehr verstärkt werden konnte. Im Gegensatz dazu schien die Sensitivität gegenüber Kupferionen mit dem Ausmaß der hCtr1-Überexpression zu korrelieren. Auch die bei nur dreistündiger Inkubation mit CuSO_4 in induzierten hCtr1-Zellen beobachtete starke Sensitivitätssteigerung im Vergleich zu EV-

Zellen weist auf einen wesentlich ausgeprägteren Effekt der hCtr1-Überexpression auf die kupferbedingte Toxizität als auf die Platintoxizität hin.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine höhere Affinität von hCtr1 zu Kupferionen als zu Platinkomplexen sein, so dass durch Steigerung der Anzahl an Transportproteinen in der Zytoplasmamembran intrazellulär ein stärkerer Anstieg der Kupferionenkonzentration als der Cisplatinkonzentration erreicht werden konnte. Allerdings wäre in diesem Fall auch für nicht induzierte Zellen eine stärkere Sensitivitätserhöhung gegen CuSO_4 als gegen cDDP zu erwarten gewesen. Eine unterschiedliche Affinität von hCtr1 gegenüber diesen beiden Substanzen lässt sich außerdem schwer beweisen, da Platinkomplexe auch über andere Transporter (z.B. OCT2, (Burger et al. 2011)) und auch durch passive Diffusion oder Makropinocytose in die Zelle gelangen können (Safaei 2006), während für Kupferionen der Ctr1-abhängige Transport als Hauptaufnahmemechanismus angesehen wird (Kim et al. 2008; Maryon et al. 2007a). So ist der geringere Sensitivitätsunterschied zwischen EV- und hCtr1-Zellen gegen Platinkomplexe dadurch erklärbar, dass ein hCtr1-unabhängiger Uptake dieser Verbindungen in einem solchen Ausmaß existiert, dass der additive Effekt durch Erhöhung der hCtr1-Expression nur geringfügige Auswirkungen hat.

Auch der Verlauf der Konzentrations-Effekt-Kurven war für die Behandlung mit Kupferionen und cDDP verschieden: CuSO_4 führte zu einem biphasischen Verlauf, vermutlich durch hCtr1-Internalisierung und -Degradation bei hohen Kupferkonzentrationen wie bei Petris et al. 2003 beschrieben. Von Holzer und Kollegen wird auch eine cDDP-abhängige Degradation von hCtr1 berichtet, die allerdings schon bei geringeren Konzentrationen einsetzt als bei Kupferionen (Holzer et al. 2004). So zeigte sich für cDDP kein bisphasischer Verlauf der Konzentrations-Effekt-Kurve. Jedoch können solche Degradationseffekte eine weitere Erklärung für die nur geringfügige Sensitivitätserhöhung gegen cDDP in hCtr1-überexprimierenden Zellen sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen daher vermuten, dass der Einfluss von hCtr1 auf die Anreicherung von Platinkomplexen in der Zelle nur eine untergeordnete Rolle spielt und damit auch klinisch nur von geringer Bedeutung ist (vgl. Abschnitt 4.2).

Ob Kupferionen und Platinkomplexe über denselben Mechanismus in die Zelle aufgenommen werden, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Abada und Howell 2010). Die in dieser Arbeit durchgeführte Zytotoxizitätsuntersuchung mit einer Co-Inkubation mit cDDP und CuSO_4 ergab keinen Hinweis auf eine gegenseitige Verdrängung der beiden Substanzen (Abb. 3-10 und 3-11), da sich die IC_{50} -Werte für cDDP mit und ohne CuSO_4 -Zusatz nicht unterschieden. Dies unterstützt die von Larson et al. postulierte Theorie, dass für den hCtr1-abhängigen Transport von Kupferionen und cDDP unterschiedliche molekulare Mechanismen vorliegen (Larson et al. 2010). Jedoch konnte auf Grund der hohen Sensitivität

der hCtr1-Zellen gegen Kupferionen nur mit einer sehr geringen CuSO_4 -Konzentration gearbeitet werden. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass unter anderen Versuchsbedingungen konkurrierende Effekte zwischen Kupferionen und cDDP auftreten könnten, wie sie von Ishida und Kollegen für Ctr1 in Hefe beschrieben wurden (Ishida et al. 2002).

Auch in hCtr2-Zellen waren die Reaktionen auf Kupfer und Cisplatin verschieden:

| Sensitivitätsveränderung hCtr2- vs. EV-Zellen | induziert | nicht induziert |
|--|-----------|------------------|
| gegen CuSO_4 , 3 h | ↔ | (nicht bestimmt) |
| gegen CuSO_4 , 72 h | ↑ x 1,81 | ↔ |
| Gegen cDDP, 72 h | ↓ x 1,70 | ↓ x 1,94 |

Tab. 4-2: Zusammenstellung der Veränderungen in der Sensitivität gegenüber CuSO_4 und cDDP in hCtr2-Zellen versus EV-Zellen

So zeigten induzierte Zellen im Vergleich zur EV-Kontrolle wie oben bereits beschrieben eine geringe, jedoch signifikante *Verminderung* der Sensitivität gegenüber cDDP sowie auch gegen CBDCA. Für CuSO_4 kam es dagegen zu einer geringfügigen *Erhöhung* der Sensitivität ($p < 0,001$), jedoch nur bei einer langen Kupferinkubation über 72 h. Dies unterstützt die derzeitige Annahme, dass hCtr2 im Vergleich zu hCtr1 eine geringere Affinität zu Kupfer hat und nur einen untergeordneten bzw. indirekten Beitrag zur Kupferaufnahme in die Zelle leistet (v. d. Berghe et al. 2007; Bertinato et al. 2008; Gupta und Lutsenko 2009; v. d. Berghe und Klomp 2010). Für die verminderte Cisplatinsensitivität war bereits die geringere Überexpression von hCtr2 ausreichend. Dieser Effekt konnte auch durch weitere Erhöhung der Überexpression nicht mehr gesteigert werden. Dagegen war für die geringfügige Erhöhung der Kupfersensitivität eine exzessive Expressionserhöhung von hCtr2 notwendig. Des Weiteren führte die Co-Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 im MTT-Assay zu keinerlei Veränderung der IC_{50} für cDDP. Unter diesen Versuchsbedingungen gibt es also keinen Hinweis für das Auftreten einer Konkurrenz oder Verdrängung zwischen Kupferionen und cDDP.

Diese Ergebnisse unterstützen die von Blair et al. aufgestellte Theorie, dass für hCtr2 unterschiedliche Bindestellen bzw. Transportmechanismen für Kupfer und Cisplatin bestehen (Blair et al. 2009).

4.1.6 Oligomerbildung von hCtr2

Die molekulare Struktur von hCtr1 und hCtr2 ist noch nicht eindeutig geklärt. Für hCtr1 wird das homologe Trimer als funktionsfähige Transporteinheit postuliert (Aller und Unger 2006). Auch hCtr2 bildete in einer Studie von van den Berghe et al. nach EGS-Inkubation Di- und

Trimere bei Molekulargewichten von etwa 24 und 35 kDa (v. d. Berghe et al. 2007). Dabei handelte es sich allerdings um ein mit einer vsvG-Sequenz (vesicular-stomatitis-virus glycoprotein) markiertes hCtr2-Protein. In der hier vorliegenden Arbeit wurde in induzierten hCtr2-Zellen für das natürliche hCtr2-Protein nach EGS-Behandlung ebenfalls das Dimer bei etwa 26 kDa gefunden, jedoch konnte das von van den Berghe und Kollegen postulierte Trimer nicht nachgewiesen werden (Abb. 3-7 B). Mit einer zweiten Methode, bei der eine Proteinprobe ohne EGS-Behandlung, jedoch unter nicht reduzierenden Bedingungen und ohne Erhitzen im Westernblot untersucht wurde, konnte ebenfalls eine deutliche Dimerbande bei 26 kDa gezeigt werden. Jedoch fand sich auch hier kein eindeutiger Hinweis auf das Vorliegen eines Trimers. So scheint das natürliche hCtr2-Protein entweder keine Trimere zu bilden, oder ihre Konzentration ist so gering, dass sie unter den verwendeten Versuchsbedingungen nicht nachweisbar waren. In letzterem Fall wäre es jedoch fraglich, ob das Trimer in solch kleinen Mengen in der Zelle überhaupt eine Rolle spielen kann.

4.1.7 Einfluss der hCtr1- bzw. hCtr2-Überexpression auf die Expression der Kupfer-ATPasen sowie CCS und HAH1

Weiterhin ist es denkbar, dass eine erhöhte Expression von hCtr1 oder hCtr2 zu einer Veränderung in der Expression anderer für die Kupferhomöostase wichtiger Proteine führt und somit auch indirekt zu einer veränderten Sensitivität gegen Kupfer und Platinkomplexe beitragen könnte. Betrachtet man die mRNA Expressionen von ATP7A und ATP7B im hCtr1-Überexpressionsklon im Vergleich zu EV-Zellen, so waren beide Transporter in hCtr1-Zellen leicht, aber nicht signifikant stärker exprimiert. Genauso verhielt es sich mit der ATP7B-Expression in hCtr2-Zellen (Abb. 3-8, Tab. 3-6/3-7). Dies könnte ein kompensatorischer Effekt als Reaktion auf die hCtr1- bzw. hCtr2-Überexpression sein. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass sich dies nennenswert auf die Sensitivität gegen Kupfer oder Platinkomplexe auswirkt. Da die Expression von ATP7B in allen drei Klonen im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen nur sehr gering war, erscheint dieser Transporter ohnehin nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Auch die Expression der Kupferchaperone CCS und HAH1 wurde durch die Überexpression von hCtr1 bzw. hCtr2 nicht beeinflusst.

4.1.8 Einfluss der hCtr1- bzw. hCtr2-Überexpression auf Cisplatin-Uptake und DNA-Platinierung

Für die weitere Untersuchung möglicher Mechanismen der durch hCtr1 bzw. hCtr2 verursachten Sensitivitätsveränderungen gegen Platinkomplexe wurden, wie am Anfang des Kapitels angesprochen, Experimente zu Cisplatin-Uptake und DNA-Platinierung in induzierten Zellen durchgeführt.

In Korrelation zu der verstärkten cDDP-Sensitivität war auch der cDDP-Uptake in hCtr1-Zellen im Vergleich zu EV-Zellen geringfügig, aber signifikant erhöht (Faktor 1,56, vgl. Abschnitt 3.1.5). Es ist jedoch bemerkenswert, dass dennoch *keine* signifikante Verstärkung der DNA-Platin-Adduktbildung festzustellen war (Abb. 4-2).

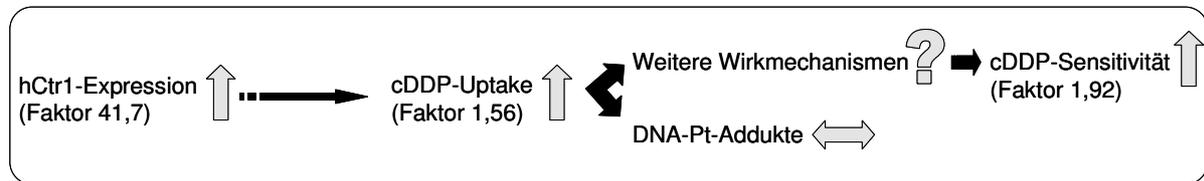


Abb. 4-2: Darstellung der Effekte der hCtr1-Überexpression in induzierten Zellen auf cDDP-Uptake, DNA-Platinierung und cDDP-Sensitivität (im Vergleich zu EV-Zellen)

Auch im Vergleich zu hCtr2-Zellen waren cDDP-Uptake und cDDP-Sensitivität im hCtr1-Klon signifikant erhöht (Faktor 1,68 bzw. 3,26). Dennoch zeigten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede in der DNA-Platinierung (Abb. 4-3).

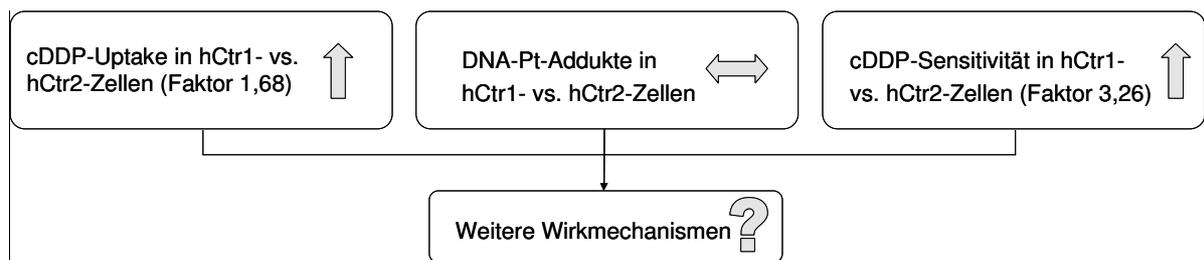


Abb. 4-3: Darstellung der Effekte der hCtr1-Überexpression in induzierten Zellen auf cDDP-Uptake, DNA-Platinierung und cDDP-Sensitivität im Vergleich zu hCtr2-Zellen

Diese Beobachtungen könnten darauf hinweisen, dass andere zytotoxische Wirkungsmechanismen eine größere Rolle spielen als bisher angenommen. Die Bildung von Addukten mit der genomischen DNA gilt als wichtigster Wirkmechanismus der Platinkomplexe (Rabik und Dolan 2007; Zorbas und Keppler 2005). Darüber hinaus wird aber auch eine Einleitung der Apoptose durch platininduzierten ER-Stress diskutiert (Rabik und Dolan 2007; Mandic et al. 2003). Da Platinkomplexe mit verschiedensten Nucleophilen reagieren können, ist auch eine Funktionsstörung von Enzymen und anderen, für die Zelle lebenswichtigen Proteinen als Beitrag zur zytotoxischen Wirkung denkbar.

Zwischen hCtr2- und EV-Zellen waren keine Unterschiede für den cDDP-Uptake oder die DNA-Platinierung festzustellen (Abb. 3-17). Diese Ergebnisse sind konträr zu den von Blair und Kollegen veröffentlichten Daten, die eine Steigerung von cDDP-Uptake und DNA-Platinierung durch mCtr2-knock-down um das etwa 2-3-fache ergaben (Blair et al. 2009).

Für die in den beiden Überexpressionsklonen beobachteten Effekte bezüglich cDDP-Uptake und DNA-Platinierung kann jedoch eine Abhängigkeit von cDDP-Konzentration und Inkubationszeit nicht ausgeschlossen werden. Daher sind ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit weitere Untersuchungen hierzu mit unterschiedlichen Inkubationszeiten und/oder cDDP-Konzentrationen ein interessanter weiterer Forschungsansatz. Dies sollte für hCtr2 auch eine parallel dazu durchgeführte weitere Untersuchung der Lokalisation im Zellkern und insbesondere in Nucleoli einschließen. Es ist zwar fraglich, ob hCtr2 im Zellkern überhaupt seine Funktion als Transporter erfüllen kann, da nicht anzunehmen ist, dass er hier membrangebunden vorliegt (Abada und Howell 2010). Dennoch sind seine diffuse Verteilung im Zellkern, die auch von Blair et al. gefunden wurde (Blair et al. 2010), und die in der hier vorliegenden Arbeit zum ersten Mal beschriebene Anreicherung in Nucleoli nach cDDP-Einwirkung bemerkenswert. Ob hCtr2 hier einen Einfluss auf die Ausbildung der Ribosomen hat oder möglicherweise zeit- und/oder konzentrationsabhängig doch zu einer Abschirmung der Platinkomplexe von der DNA und damit zu deren Schutz führt, müssen weitere detaillierte Untersuchungen zeigen.

4.1.9 Einfluss von hCtr1 und hCtr2 auf die Toxizität von liposomalem Cisplatin

Um den Einfluss der Kupfertransporter auf die Sensitivität gegen Cisplatin weiter zu untersuchen, wurden an induzierten Zellen MTT-Assays mit liposomalem Cisplatin durchgeführt. Die Fragestellung bei diesen Experimenten war, ob es möglich ist, durch die liposomale Verabreichung eine hCtr-*unabhängige* Aufnahme des Cisplatin in die Zelle zu erreichen, z.B. durch Endocytose wie sie von Hamelers und Kollegen für cisplatinhaltige Nanokapseln beschrieben wurde (Hamelers et al. 2009).

Da Liposomen selbst in höheren Konzentrationen auch eine toxische Wirkung besitzen, wurden zum Vergleich parallel MTT-Assays mit entsprechenden Verdünnungen von „Leerliposomen“ (ohne Cisplatin, nur mit physiologischer Kochsalzlösung beladen) durchgeführt. Da sowohl hCtr1- und hCtr2-Zellen als auch die EV-Kontrollzellen signifikant sensitiver auf cDDP-Liposomen als auf Leerliposomen reagierten, konnte hier von einer erfolgreichen Aufnahme des Wirkstoffs in die Zellen ausgegangen werden. Allerdings waren die Zellen weniger sensitiv gegen cDDP-Liposomen als gegen freies cDDP. Da dies bei allen drei Klonen in sehr ähnlichem Ausmaß auftrat, ist nicht davon auszugehen, dass dieser Effekt mit der Überexpression von hCtr1 oder hCtr2 in Zusammenhang steht.

hCtr1-Zellen waren signifikant und in einem zur Behandlung mit freiem cDDP vergleichbaren Ausmaß sensitiver gegen cDDP-Liposomen als der hCtr2-Klon. Eine Umgehung der mit freiem cDDP beobachteten Effekte von hCtr1 bzw. hCtr2 scheint also nicht erfolgt zu sein. Eine Erklärung für diese Ergebnisse könnte eine von Gabizon et al. aufgestellte Theorie sein. Diese besagt, dass Liposomen ohne Liganden nicht als Ganzes in Tumorzellen

aufgenommen werden und der entsprechende Wirkstoff erst aus ihnen freigesetzt werden muss, um in die Zellen zu gelangen (Gabizon et al. 2006). Die in der hier vorliegenden Arbeit verwendeten Liposomen könnten einen Teil des cDDP freigesetzt haben, welches danach wie in den Experimenten mit freiem cDDP mit hCtr1 bzw. hCtr2 in Wechselwirkung getreten ist. Ein interessanter weiterer Forschungsansatz wäre daher, an den Überexpressionsklonen weitere Versuche mit liganden-gekoppelten Liposomen für ein gezieltes Targeting an der Zelloberfläche durchzuführen und zu untersuchen, ob die hCtr-abhängigen Veränderungen der cDDP-Sensitivität so aufgehoben werden können.

4.2 Untersuchungen zur klinischen Relevanz der im rekombinanten System gefundenen Effekte von hCtr2

Es ist schwer einzuschätzen, wie hoch Resistenzfaktoren gegen Platinkomplexe in klinischen Tumorproben sein können. In klinischen Studien hat man festgestellt, dass eine Verdoppelung der Dosis nach anfänglich fehlendem Erfolg der Platintherapie zu einem Ansprechen der entsprechenden Tumoren führte. Daraus wurde abgeleitet, dass es in Patienten zu einer Verminderung der Sensitivität von Tumoren gegen Cisplatin um mindestens Faktor 2 kommen kann. (Ozols et al. 1984; Schilder und Ozols, 1992). Im Fall von Resistenzen in dieser Größenordnung könnte man aus den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen in rekombinanten Zellen ableiten, dass hCtr2 eine klinische Relevanz im Zusammenhang mit Platinresistenzen haben kann. Andererseits erscheint die klinische Bedeutung fraglich, da es unwahrscheinlich ist, dass in Tumoren eine Überexpression in vergleichbarem Ausmaß wie in dem hier verwendeten Zellsystem vorkommt. Außerdem wird in der Literatur ausgehend von Daten aus Zellkulturen von therapierefraktären Tumoren vermutet, dass auch deutlich stärkere als um Faktor 2 erhöhte Tumorresistenzen möglich sind (Hills et al. 1989; Kelland et al. 1995; Hagopian et al. 1999).

Um eine mögliche klinische Relevanz der im rekombinanten, nicht aus Tumormaterial stammenden Flp-InTM T-RExTM-293-Zellsystem gefundenen Ergebnisse näher zu beleuchten, wurde daher die Expression von hCtr2 zunächst in neun Tumorzelltypen mit jeweils Ursprungszelllinie und cisplatinresistenter Sublinie auf mRNA-Ebene untersucht. Dem schloss sich eine weitere Studie an 23 Gewebeproben aus Ovarialtumoren an. In beiden Untersuchungen wurde neben dem Expressionsniveau von hCtr2 auch das von hCtr1, ATP7A und ATP7B bestimmt. Die Ergebnisse aus diesen Experimenten wurden anschließend der Platinsensitivität bzw. anderen prognostischen Parametern gegenübergestellt.

4.2.1 Expressionsuntersuchungen in Tumorzellen unterschiedlicher Platinsensitivität

Bei der Untersuchung der Kupfertransporterexpression auf mRNA-Ebene in den verschiedenen Tumorzellpärchen wurden primär die jeweiligen Ursprungszellen und deren cisplatinresistente Sublinien untereinander verglichen. Durch gemeinsame Optimierung der HKG auf alle untersuchten Zellen konnten aber auch Unterschiede in der Expressionsstärke über verschiedene Zelltypen hinweg betrachtet werden.

Unter der Annahme einer vergleichbaren Effizienz der Primer für die verschiedenen Transporter ist an den normalisierten Expressionen festzustellen, dass hCtr1 über alle untersuchten Zelltypen hinweg am stärksten transkribiert wurde. hCtr2 und ATP7A zeigten eine ähnliche normalisierte Expression, ATP7B wurde am wenigsten stark abgelesen (Abb. 3-19). Dabei war die hCtr1-Expression in den verschiedenen Zelltypen ähnlich, während bei den anderen Transportern recht große Unterschiede auftraten. So wurde hCtr2 in Tumorzellen ovariellen Ursprungs mit Ausnahme von Caov3-Zellen und cisplatinresistenten OAW42-Zellen tendenziell weniger stark exprimiert als in Zungenkarzinomzellen (Cal27) und Mammakarzinomzellen (MDA-MB 231 und T47D). Die Anzahl an untersuchten Zelllinien reicht jedoch nicht aus, um hier einen generellen Zusammenhang zwischen hCtr2-Expression und Ursprungsgewebe abzuleiten. Für die Kupfer-ATPasen konnten keine Gemeinsamkeiten der Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu anderen Zelltypen gefunden werden.

hCtr2

Für OAW42- und Ovarcar3-Zellen wurden signifikant um Faktor 6,96 bzw. 3,58 (Tab. 3-14) *erhöhte* hCtr2-Expressionen in der jeweiligen *resistenten* Sublinie gefunden. Dies korreliert mit der in hCtr2-Überexpressionszellen gefundenen verminderten cDDP-Sensitivität. Jedoch wiesen T47D-Zellen eine signifikant um Faktor 2,38 erhöhte hCtr2-Expression in der *sensitiveren* Ursprungszelllinie auf. Dies steht im Gegensatz zu einer Schutzfunktion von hCtr2 gegen cDDP. Allerdings könnten andere, ebenfalls die Sensitivität mindernde Effekte den Einfluss von hCtr2 in resistenten T47D-Zellen auch überlagert haben. Alle anderen Unterschiede zwischen den Sublinien der einzelnen Zelltypen waren nur sehr gering und vermutlich ohne Bedeutung.

Selbst die erhöhten normalisierten Expressionsniveaus in resistenten OAW42- und Ovarcar3-Zellen waren immer noch sehr niedrig. Sie lagen – wenn dies auch durch die Verwendung anderer HKG nur eingeschränkt vergleichbar ist – in einem ähnlichen Größenbereich wie in EV-Zellen des Flp-InTM T-RExTM-293-Systems. Auch im Verhältnis zu hCtr1 war hCtr2 in den Tumorzellen ähnlich wie in EV-Zellen durchschnittlich um etwa eine Zehnerpotenz schwächer exprimiert. Da in hCtr2-Zellen eine 95 bis sogar mehr als 2000-fache hCtr2-

Überexpression nur zu einer geringfügigen Verminderung der Platinsensitivität führte, ist es unwahrscheinlich, dass die geringe hCtr2-Expression in resistenten OAW42- und Ovarcar3-Zellen für deren verminderte Cisplatinempfindlichkeit eine ursächliche Rolle spielt.

Auch bei Betrachtung der IC_{50} -Werte war keine Korrelation zwischen diesen und der hCtr2-Expression erkennbar: zwar wiesen die bereits im ursprünglichen Zustand gegen cDDP stark resistenten Brustkrebszelllinien MDA-MB231 ($IC_{50} = 33 \mu\text{M}$) und T47D ($IC_{50} = 10 \mu\text{M}$) vergleichsweise hohe hCtr2-Expressionen auf, wohingegen die im ursprünglichen Zustand sensitivsten Zelllinien OAW42 und PA1 ($IC_{50} = 0,5 \mu\text{M}$ bzw. $0,6 \mu\text{M}$) geringere hCtr2-Expressionen zeigten. Umgekehrt war aber in den sehr sensitiven Caov3-Zellen (IC_{50} im ursprünglichen Zustand = $0,8 \mu\text{M}$) hCtr2 ähnlich stark exprimiert wie in MDA-MB231- und T47D-Zellen.

Dies widerspricht einer Studie von Blair et al., in der für verschiedene humane Zelllinien aus Ovarialkarzinomen sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Translationsebene eine signifikante Korrelation zwischen der hCtr2-Expression und den IC_{50} -Werten gegen Cisplatin gefunden wurde. Dabei gingen höhere hCtr2-Expressionen mit einer geringeren Sensitivität einher (Blair et al. 2009). Allerdings unterschieden sich die dort verwendeten Zelllinien in ihrer hCtr2-Expression nur um maximal Faktor 1,3 (mRNA) bzw. 2,3 (Protein), in ihren IC_{50} -Werten jedoch um bis zu mehr als Faktor 8. Aus diesem Grund und in Anbetracht der in der hier vorliegenden Arbeit gefundenen Daten ist diese Korrelation daher eher kritisch zu betrachten und die Frage zu stellen, ob nicht andere Faktoren einen größeren Einfluss auf die IC_{50} -Werte gegenüber cDDP hatten als die Expression von hCtr2.

hCtr1

Auch für hCtr1 konnte über die verschiedenen Tumorzellen hinweg kein direkter Zusammenhang zwischen Expression und IC_{50} -Werten festgestellt werden. Ein Vergleich von jeweils ursprünglichen und resistenten Sublinien eines Zelltyps ergab ebenfalls nur geringfügige Unterschiede. Dabei zeigten z.T. die *resistenten* Sublinien eine geringere hCtr1-Expression, was mit der Funktion von hCtr1 als Uptake-Transporter für Platinkomplexe in Einklang steht. In einigen anderen Zelllinien war es jedoch umgekehrt. Es gab hier also auch für hCtr1 keine direkte Korrelation zwischen Expression und Resistenzgrad.

Auch in der Literatur wird die Rolle von hCtr1 bei der Sensitivität gegenüber Platinkomplexen kontrovers diskutiert. Z.T. wurden Zusammenhänge zwischen hCtr1 und Platinwirkung beschrieben (Ishida et al. 2002; Song et al. 2004; Zisowsky et al. 2007), in anderen Veröffentlichungen konnte dies dagegen nicht bestätigt werden (Sinani et al. 2007; Rabik et al. 2009; Beretta et al. 2004).

ATP7A und ATP7B

ATP7A und ATP7B sind vermutlich an Efflux und/oder einer intrazellulären Verschiebung von Platin komplexen beteiligt, so dass eine hohe Expression dieser Transporter mit Platinresistenzen in Verbindung gebracht wird (Gupta und Lutsenko 2009). In den untersuchten Tumorzellpärchen lag jedoch nur in OAW42-Zellen eine starke, signifikant um den Faktor 11,1 erhöhte ATP7A-Expression in *resistenten* Zellen vor (Tab. 3-17).

ATP7B wurde z.T. in resistenten Sublinien stärker exprimiert (Ovcar3 und Caov3). Jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant. In den anderen Zelllinien zeigten sich dagegen entweder keine Expressionsunterschiede oder ATP7B war entgegen der Erwartung in der jeweiligen Ursprungszelllinie stärker exprimiert als in der resistenten Sublinie. Außerdem war ATP7B in allen untersuchten Tumorzelllinien im Vergleich zu den anderen Transportern äußerst schwach exprimiert, was einen Zusammenhang zwischen ATP7B-Expression und Cisplatinempfindlichkeit ebenfalls unwahrscheinlich macht.

Auch der Vergleich über alle Zellarten hinweg ergab keine Hinweise auf eine Korrelation zwischen IC_{50} -Werten und der Expression von ATP7A oder ATP7B.

Es konnte in den Tumorzellen also weder für hCtr2 noch für einen der anderen untersuchten Kupfertransporter ein Zusammenhang zwischen der Expression und der Cisplatinempfindlichkeit festgestellt werden. Dies galt sowohl für die verschiedenen Ursprungszelllinien, die sich bereits in ihren IC_{50} -Werten deutlich unterschieden, als auch innerhalb eines Zelltyps beim Vergleich der ursprünglichen mit der *in vitro* resistent gewordenen Sublinie.

4.2.2 Expressionsuntersuchungen in Gewebe aus Ovarialtumoren

Von Blair et al. wurde eine *in-vivo*-Studie zum Beitrag von murinem Ctr2 zur Platinresistenz in Mäusen vorgestellt (Blair et al. 2011). Dabei zeigten mCtr2-knock-down-Tumore ein vermindertes Wachstum, eine geringere Fraktion proliferierender Zellen sowie ein erhöhtes Auftreten apoptotischer Zellen. Auch die Gefäßdichte war leicht reduziert. Weiterhin waren die cDDP-Akkumulation und das Ansprechen auf cDDP erhöht. Dies waren erste in der Literatur verfügbare Erkenntnisse, dass der *in vitro* gefundene Einfluss von Ctr2 auch klinisch bedeutend sein könnte.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde in der hier vorliegenden Arbeit die hCtr2-Expression auf mRNA-Ebene in 23 Gewebeproben aus Ovarialkarzinomen untersucht (s. Kapitel 3.3). Daneben wurden auch die Expressionen der drei anderen Kupfertransporter hCtr1, ATP7A und ATP7B bestimmt. Nach Mittelung der jeweiligen Daten in den verschiedenen Gruppen konnte für keinen der Transporter ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit vom FIGO-Stadium oder im Vergleich zu Rezidiven festgestellt werden. Für die

einzelnen Proben eines benignen Tumors, eines Tumors im Stadium FIGO I sowie eines Borderlinetumors zeigten sich ebenfalls keine auffälligen Unterschiede zu den anderen Gruppen. Bei der Korrelationsanalyse zwischen der Expression der einzelnen Transporter und den an Hand von histologischen, pathologischen und klinischen Daten abgeschätzten Prognosepunkten konnte ebenfalls keinerlei Zusammenhang festgestellt werden (Abb. 3-21). Als Vergleich zu diesen eigenen Daten wurde eine Analyse mit dem frei im Internet verfügbaren Kaplan Meier-Plotter durchgeführt (<http://www.kmplot.com>, vgl. auch Györfi et al. 2010). Dieser erstellt auf Grundlage der Datenbank GEO für mehr als 22'000 Gene Korrelationsanalysen zwischen Expression und progressionsfreiem bzw. Gesamtüberleben von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen. Dabei werden die Daten einer sehr großen Patientenzahl eingeschlossen. Die Ergebnisse dieser Analyse werden in den folgenden Abschnitten zusammen mit den in der hier vorliegenden Arbeit ermittelten Daten diskutiert.

4.2.2.1 Klinische Relevanz von hCtr1 und hCtr2

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Lee et al. wurden ebenfalls die Expressionen von hCtr1 und hCtr2 auf Transkriptionsebene in humanen Ovarialkarzinomen hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung untersucht (Lee et al. 2011). Dabei wurden 11 Proben aus normalem Eierstockgewebe sowie 40 Proben aus serösen Ovarialkarzinomen verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass eine hohe hCtr1-Expression signifikant mit einem längeren progressionsfreien Überleben einherging. Für hCtr2 konnte dagegen kein eindeutiger Zusammenhang festgestellt werden. Für eine Korrelation zwischen der Transporterexpression und dem Ansprechen auf eine Carboplatin enthaltende Chemotherapie fanden Lee et al., dass Tumore mit einer hohen hCtr1-Expression signifikant häufiger platinsensitiv waren als solche mit einer niedrigen hCtr1-Expression. Für hCtr2 zeigte sich hier keine signifikante Korrelation. Bei der gemeinsamen Betrachtung der Transporterexpressionen wiesen jedoch Patientinnen mit niedriger hCtr1- und gleichzeitig hoher hCtr2-Expression die kürzeste progressionsfreie Überlebenszeit auf und sprachen schlechter auf die Therapie an als die Gruppe aller anderen Studienteilnehmer.

hCtr2

In der hier vorliegenden Arbeit wurden andere klinische bzw. prognostische Parameter zur Korrelationsanalyse herangezogen als in der Studie von Lee et al. Dennoch bestätigen die hier gefundenen Ergebnisse, dass die hCtr2-Expression auf mRNA-Ebene in Ovarialtumoren keine klinische Relevanz zu haben scheint. Allerdings galt das in dieser Arbeit im Gegensatz zur Studie von Lee et al. auch für die kombinierte Auswertung der hCtr1- und hCtr2-Expression (Abb. 3-22).

Auch die Recherche mit Hilfe des Kaplan-Meier-Plotters ergab keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen hCtr2-Expression und progressionsfreiem oder Gesamtüberleben nach einer platinhaltigen Chemotherapie (Abb. 4-4).

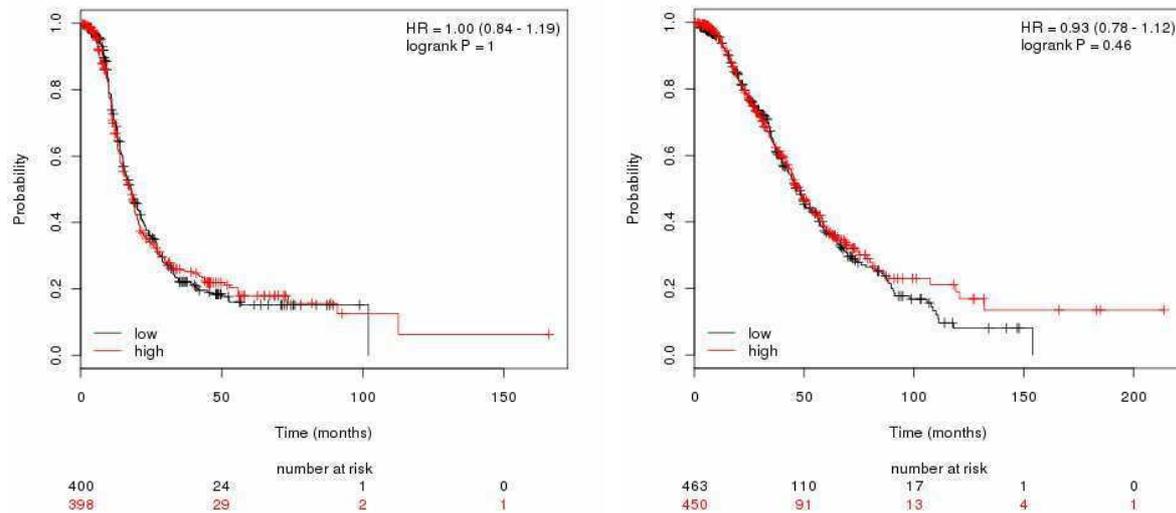


Abb. 4-4.: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie (links) und das Gesamtüberleben (rechts) von 798 bzw. 913 Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit niedriger oder hoher hCtr2-Expression (eingeteilt auf Basis des Median), ermittelt durch Microarrays; *Quelle: www.kmplot.com*; sonstige Einstellungen: „all probe sets per gene“, „chemotherapy contains platin“; angegeben sind Hazard Ratio (HR) und 95%-Konfidenzintervall sowie der logrank P-Wert.

hCtr1

Vergleicht man die Ergebnisse von Lee et al. und die in der hier vorliegenden Arbeit gefundenen für hCtr1, so ist die Schlussfolgerung für dessen klinische Relevanz widersprüchlich. Die Ergebnisse der Recherche des Kaplan-Meier-Plotters unterstützen die von Lee et al. gefundene Korrelation zwischen hCtr1-Expression und progressionsfreiem Überleben bei einer platinhaltigen Chemotherapie (Abb. 4-5 links). Für das Gesamtüberleben relativiert sich dieser Unterschied jedoch fast vollständig (Abb. 4-5 rechts). So ist anzunehmen, dass die klinische Bedeutung der hCtr1-Expression in Ovarialkarzinomen insgesamt gering ist. In der hier vorliegenden Arbeit war keine Korrelation zwischen hCtr1-Expression und Tumorstadium oder prognostischen Parametern erkennbar. Auch dies spricht gegen eine bedeutende Rolle von hCtr1 bei der Therapie von Ovarialkarzinomen.

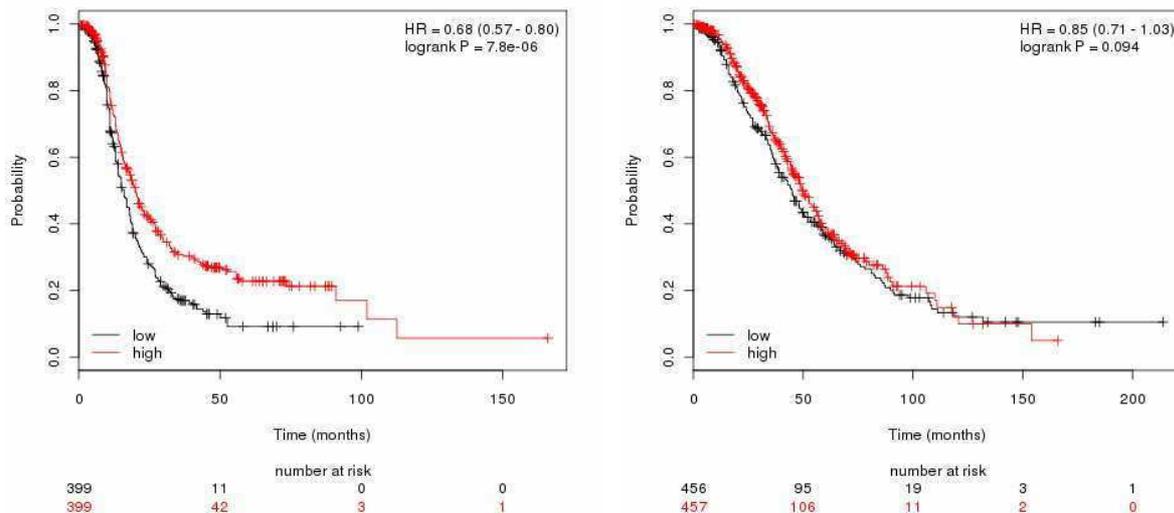


Abb. 4-5.: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie (links) und das Gesamtüberleben (rechts) von 798 bzw. 913 Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit niedriger oder hoher hCtr1-Expression (eingeteilt auf Basis des Median), ermittelt durch Microarrays; *Quelle: www.kmplot.com*; sonstige Einstellungen: „all probe sets per gene“, „chemotherapy contains platin“; angegeben sind Hazard Ratio (HR) und 95%-Konfidenzintervall sowie der logrank P-Wert.

4.2.2.2 Klinische Relevanz von ATP7A und ATP7B

ATP7A

In einer Studie von Samimi und Kollegen, in welcher Gewebeproben von Ovarialkarzinomen hinsichtlich ihrer ATP7A-Expression auf Proteinebene untersucht wurden, konnte keine Korrelation zwischen der Expression *vor* der Chemotherapie und dem klinischen Verlauf gefunden werden (Samimi et al. 2003). Ähnlich war auch in der hier vorliegenden Arbeit auf mRNA-Ebene kein Zusammenhang zwischen ATP7A-Expression und Tumorstadium oder prognostischen Parametern feststellbar. Auch die Analyse mit dem Kaplan-Meier-Plotter ergab keine Korrelation zwischen ATP7A-Expression und progressionsfreiem oder Gesamtüberleben bei einer platinbasierten Chemotherapie (Abb. 4-6).

Allerdings verringerte sich in der Studie von Samimi et al. die Überlebensdauer bei solchen Patientinnen signifikant, bei denen eine Zunahme der ATP7A-Expression während der Behandlung mit Platinkomplexen beobachtet werden konnte. Dies wiederum spricht für eine Bedeutung von ATP7A bei dieser Art der Chemotherapie. Auf Grund der nur geringen Anzahl an Proben von bereits mit Platinkomplexen behandelten Patientinnen war es in der hier vorliegenden Arbeit jedoch nicht möglich, einen solchen Zusammenhang ebenfalls zu untersuchen.

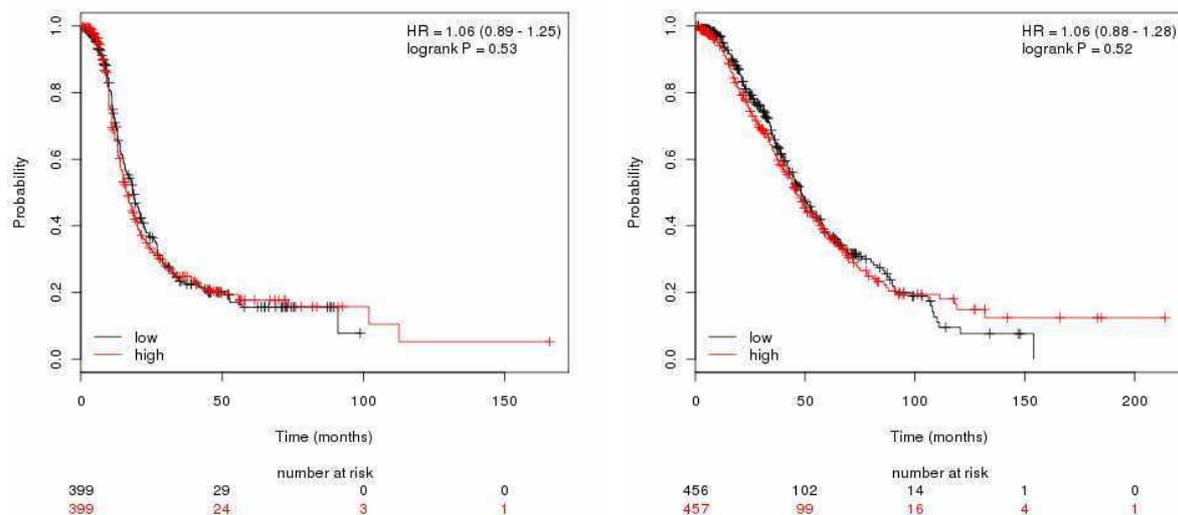


Abb. 4-6.: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie (links) und das Gesamtüberleben (rechts) von 798 bzw. 913 Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit niedriger oder hoher ATP7A-Expression (eingeteilt auf Basis des Medians), ermittelt durch Microarrays; *Quelle:* www.kmplot.com; sonstige Einstellungen: „all probe sets per gene“, „chemotherapy contains platin“; angegeben sind Hazard Ratio (HR) und 95%-Konfidenzintervall sowie der logrank P-Wert.

ATP7B

ATP7B wird nicht in allen Geweben exprimiert. In einer Studie von Nakayama et al. wiesen mäßig bis schlecht differenzierte Ovarialkarzinome häufiger eine Expression dieses Transporters auf als solche mit besserem Differenzierungsgrad. Mit dem FIGO-Stadium gab es dagegen keine signifikante Korrelation (Nakayama et al. 2004). Außerdem bestand in Ovarialkarzinomen ein Zusammenhang zwischen einer hohen ATP7B-Expression und einer schlechteren Prognose bei cisplatinhaltiger Chemotherapie (Nakayama et al. 2002; Nakayama et al. 2004). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, die keinen Zusammenhang zwischen ATP7B-Expression und Tumorstadien oder prognostischen Parametern erkennen lassen. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden hingegen von einer Korrelationsanalyse des Kaplan-Meier-Plotter bestätigt, in der zwischen ATP7B-Expression und Überlebenszeit nach Platintherapie kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden konnte (Abb. 4-7).

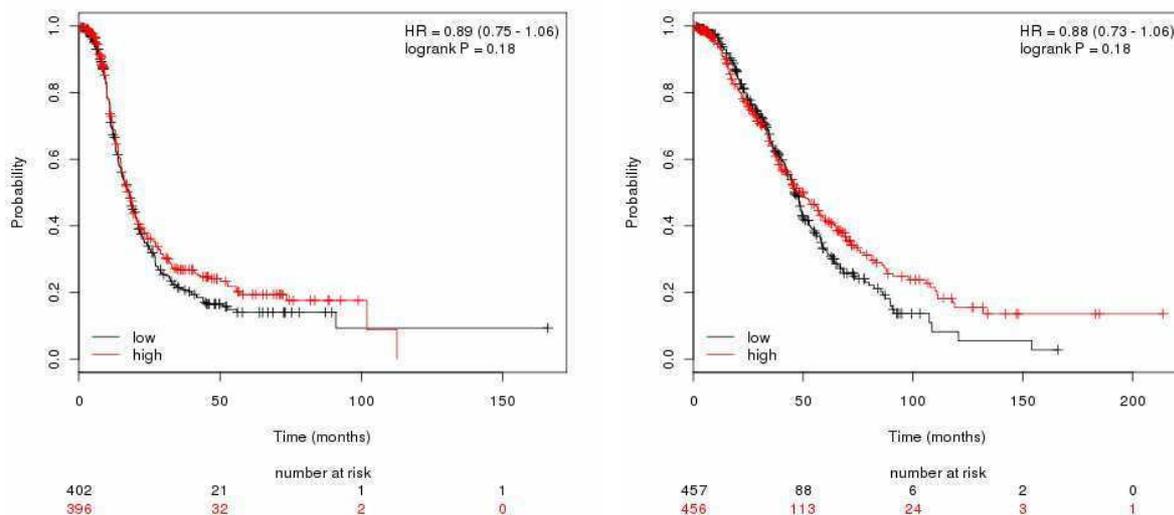


Abb. 4-7.: Kaplan-Meier-Kurven für das progressionsfreie (links) und das Gesamtüberleben (rechts) von 798 bzw. 913 Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit niedriger oder hoher ATP7B-Expression (eingeteilt auf Basis des Medians), ermittelt durch Microarrays; *Quelle: www.kmplot.com*; sonstige Einstellungen: „all probe sets per gene“, „chemotherapy contains platin“; angegeben sind Hazard Ratio (HR) und 95%-Konfidenzintervall sowie der logrank P-Wert.

Für die Untersuchung in Tumorgewebe stand für diese Arbeit nur eine relativ geringe Anzahl an Proben zur Verfügung. Des Weiteren lag nur eine Probe eines nicht malignen Tumors vor, und es war kein ovarielles Normalgewebe als Vergleich vorhanden. Die vorliegenden Patientendaten enthielten zumeist keine vollständigen Angaben zu klinischem Verlauf und Gesamtüberleben, so dass eine Korrelationsanalyse ausschließlich mit pathologischen und histologischen Parametern durchgeführt wurde. Daher wäre es ein interessanter Ansatz in Ergänzung zu der hier vorliegenden Arbeit weitere Proben aus Ovarialtumoren sowie anderer, mit Platinkomplexen behandelbarer Tumoren zu untersuchen und dabei auch eine Korrelationsanalyse mit progressionsfreiem und Gesamtüberleben durchzuführen.

Dennoch lassen die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen mit der Studie von Lee et al. und der Auswertung mittels des Kaplan-Meier-Plotters den Schluss zu, dass eine klinische Bedeutung von hCtr2 bei der Tumorthherapie mit Platinkomplexen unwahrscheinlich ist. Auch scheint die Expression der anderen drei Kupfertransporter zumindest in Ovarialkarzinomen keine große Bedeutung für die Platinsensitivität zu haben.

4.3 Schlussfolgerung

Im rekombinanten System vermindert eine hohe Expression des Transportproteins hCtr2 die Sensitivität gegen Platinkomplexe geringfügig aber signifikant. Eine Verminderung von Uptake oder DNA-Platinierung konnte als Ursache hierfür nicht festgestellt werden. Allerdings kam es nach Behandlung mit Cisplatin zu einer Lokalisation von hCtr2 in Nucleoli.

Ob dies mit der verminderten Platinsensitivität in Zusammenhang steht, bedarf weiterer Aufklärung.

In Tumorzellen und Gewebeproben aus Ovarialkarzinomen waren keine so hohen Expressionsniveaus von hCtr2 wie im rekombinanten System vorhanden. Dies macht einen Einfluss von hCtr2 auf die Platinsensitivität bei klinischen Proben unwahrscheinlich. Ein Vergleich der hCtr2-Expression mit IC_{50} -Werten gegen Cisplatin in Tumorzellen bzw. mit dem Tumorstadium und anderen prognostischen Parametern in den Gewebeproben ergab keinerlei Korrelation. Von einer klinischen Relevanz von hCtr2 für die platinbasierte Chemotherapie ist daher nicht auszugehen (Abb. 4-8).

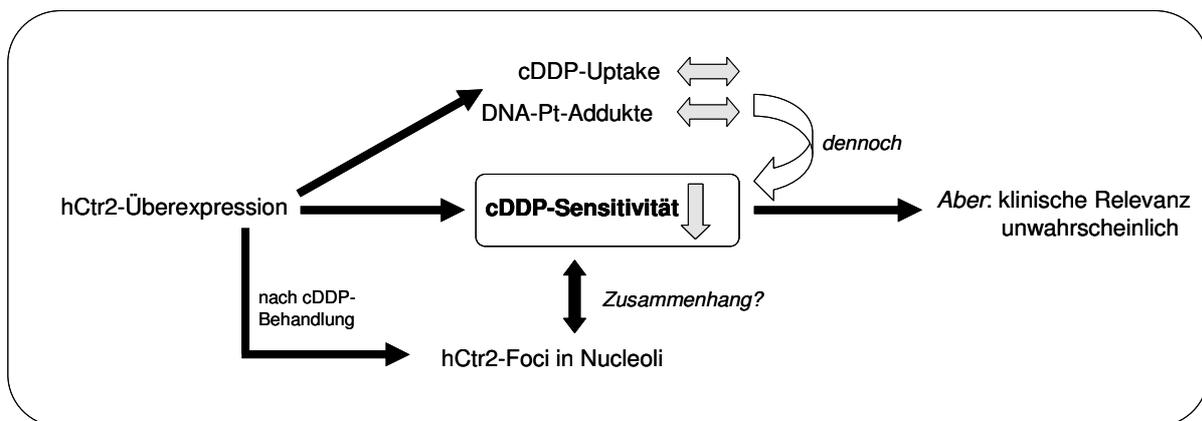


Abb. 4-8: Graphische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse für hCtr2

Für hCtr1 konnte mit dieser Arbeit im rekombinanten System der bereits in der Literatur beschriebene, die Platinsensitivität fördernde Effekt bestätigt werden. Jedoch ergeben die Ergebnisse in Tumorzellen und Gewebeproben auch für diesen Transporter keinen Hinweis auf eine klinische Relevanz für die Tumorthherapie mit Platinkomplexen. Letzteres gilt auch für die Kupfer-ATPasen ATP7A und ATP7B.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse der Untersuchungen an hCtr1- bzw. hCtr2-überexprimierenden Zellen geben weiterhin interessante Ansatzpunkte für die *in vitro*-Erforschung von Wirk- und Resistenzmechanismen und der zellulären Pharmakokinetik von Platinkomplexen.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- Abada P, Howell SB. Regulation of Cisplatin cytotoxicity by Cu influx transporters. *Met Based Drugs*. 2010; Article ID 317581. 9 pages
- Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D et al. Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. *Cancer Res*. 1996; 56(13):3087-3090
- Aebi S, Pestalozzi BC, Thürlimann B. Chemotherapie des Ovarialkarzinoms. *Schweiz Med Forum*. 2003; 40: 944-949
- Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München: Urban & Fischer; 2007
- Aller SG, Unger VM. Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-Å resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(10):3627-3632
- Ardizzoni A, Boni L, Tiseo M, Fossella FV, Schiller JH, Paesmans M et al. Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2007; 99(11):847-857
- Arnesano F, Scintilla S, Natile G. Interaction between platinum complexes and a methionine motif found in copper transport proteins. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007; 46(47):9062-9064
- Asselin E, Mills GB, Tsang BK. XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res*. 2001; 61(5):1862-1868
- AWMF online-Leitlinie Onkologie/Gynäkologie: Maligne Ovarialtumoren; 05/2007
- Barnes N, Bartee MY, Braiterman L, Gupta A, Ustiyan V, Zuzel V et al. Cell-specific trafficking suggests a new role for renal ATP7B in the intracellular copper storage. *Traffic*. 2009;10(6):767-779
- Bassett E, Vaisman A, Tropea KA, McCall CM, Masutani C, Hanaoka F et al. Frameshifts and deletions during in vitro translesion synthesis past Pt-DNA adducts by DNA polymerases beta and eta. *DNA Repair (Amst)*. 2002; 1(12):1003-1016
- Bellon SF, Coleman JH, Lippard SJ. DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry*. 1991; 30(32):8026-8035
- Beretta GL, Gatti L, Tinelli S, Corna E, Colangelo D, Zunino F et al. Cellular pharmacology of cisplatin in relation to the expression of human copper transporter CTR1 in different pairs of cisplatin-sensitive and -resistant cells. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68(2):283-291
- Bertinato J, Swist E, Plouffe LJ, Brooks SP, L'abbé MR. Ctr2 is partially localized to the plasma membrane and stimulates copper uptake in COS-7 cells. *Biochem J*. 2008; 409(3):731-740
- Blair BG, Larson CA, Adams PL, Abada PB, Pesce CE, Safaei R et al. Copper transporter 2 regulates endocytosis and controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in vivo. *Mol Pharmacol*. 2011; 79(1):157-166

- Blair BG, Larson CA, Adams PL, Abada PB, Safaei R, Howell SB. Regulation of copper transporter 2 expression by copper and cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol.* 2010; 77(6):912-921
- Blair BG, Larson CA, Adams PL, Abada PB, Safaei R, Howell SB. Regulation of copper transporter 2 expression by copper and cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol.* 2010; 77(6):912-921
- Blair BG, Larson CA, Safaei R, Howell SB. Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(13):4312-4321
- Blanc C, Deveraux QL, Krajewski S, Jänicke RU, Porter AG, Reed JC et al. Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 60(16):4386-4390
- Boal AK, Rosenzweig AC. Crystal structures of cisplatin bound to a human copper chaperone. *J Am Chem Soc.* 2009; 131(40):14196-14197
- Brown R, Hirst GL, Gallagher WM, McIlwrath AJ, Margison GP, van der Zee AG et al. hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene.* 1997;15(1):45-52
- Buchholz F, Angrand PO, Stewart AF. Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol.* 1998; 16(7):657-662
- Burger H, Loos WJ, Eechoute K, Verweij J, Mathijssen RHJ, Wiemer EAC. Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resist Updat.* 2011 14(1):22-34
- Chang IY, Kim MH, Kim HB, Lee DY, Kim SH, Kim HY et al. Small interfering RNA-induced suppression of ERCC1 enhances sensitivity of human cancer cells to cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 327(1):225-233
- Chiao C, Carothers AM, Grunberger D, Solomon G, Preston GA, Barrett JC. Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells. *Cancer Res.* 1995; 55(16):3576-3583
- Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota HJ et al. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol.* 2005; 167(6):1477-1484
- Cobbold C, Coventry J, Ponnambalam S, Monaco AP. The Menkes disease ATPase (ATP7A) is internalized via a Rac1-regulated, clathrin- and caveolae-independent pathway. *Hum Mol Genet.* 2003; 12(13):1523-1533
- Cova D, Sassano M, Monti E, Piccinini F. DNA damage induced by doxorubicin, 4'-epidoxorubicin and their copper(II) complexes. *Arch Toxicol.* 1990; 64(7):597-598
- Dabholkar M, Bostick-Bruton F, Weber C, Bohr VA, Egwuagu C, Reed E. ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 1992; 84(19):1512-1517
- Das SK, Ray K. Wilson's disease: an update. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006; 2(9):482-493
- Daubeuf S, Leroy P, Paolicchi A, Pompella A, Wellman M, Galteau MM et al. Enhanced

resistance of HeLa cells to cisplatin by overexpression of gamma-glutamyltransferase. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64(2):207-216

De Feo CJ, Aller SG, Siluvai GS, Blackburn NJ, Unger VM. Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(11):4237-4242

de Jonge MJ, Slingerland M, Loos WJ, Wiemer EA, Burger H, Mathijssen RH et al. Early cessation of the clinical development of LiPlaCis, a liposomal cisplatin formulation. *Eur J Cancer.* 2010; 46(16):3016-3021

Drummond JT, Anthony A, Brown R, Modrich P. Cisplatin and adriamycin resistance are associated with MutLalpha and mismatch repair deficiency in an ovarian tumor cell line. *J Biol Chem.* 1996; 271(33):19645-19648

Eckstein N, Servan K, Hildebrandt B, Pölit A, von Jonquières G, Wolf-Kümmeth S et al. Hyperactivation of the insulin-like growth factor receptor I signaling pathway is an essential event for cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2009 Apr; 69(7):2996-3003

Farrow SN, Brown R. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Genet Dev.* 1996; 6(1):45-49

Ferry KV, Hamilton TC, Johnson SW. Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. *Biochem Pharmacol.* 2000; 60(9):1305-1313

Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res.* 1998; 4(1):1-6

Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehmé A et al. The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res.* 1996; 56(21):4881-4886

Francis MJ, Jones EE, Levy ER, Martin RL, Ponnambalam S, Monaco AP. Identification of a di-leucine motif within the C terminus domain of the Menkes disease protein that mediates endocytosis from the plasma membrane. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 11):1721-1732

Fu S, Kavanagh JJ, Hu W, Bast RC Jr. Clinical application of oxaliplatin in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2006; 16(5):1717-1732

Gabizon AA, Shmeeda H, Zalipsky S. Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting. *J Liposome Res.* 2006; 16(3):175-183

Gadducci A, Cosio S, Muraca S, Genazzani AR. Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2002; 23(5):390-396

Gebauer G, Mirakhor B, Nguyen Q, Shore SK, Simpkins H, Dhanasekaran N. Cisplatin-resistance involves the defective processing of MEKK1 in human ovarian adenocarcinoma 2008/C13 cells. *Int J Oncol.* 2000; 16(2):321-325

geNORM manual, Stand 14. August 2006

Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, Anderson ME. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(7):3070-3074

- Gosepath E. Cisplatin-Resistenz von Tumorzellen: Identifizierung neuer Kandidatengene und Evaluierung der Rolle von DKK1. Dissertation. Bonn; 2007
- Goto S, Iida T, Cho S, Oka M, Kohno S, Kondo T. Overexpression of glutathione S-transferase pi enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells. *Free Radic Res.* 1999; 31(6):549-558
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977; 36(1):59-74
- Guo Y, Smith K, Lee J, Thiele DJ, Petris MJ. Identification of methionine-rich clusters that regulate copper-stimulated endocytosis of the human Ctr1 copper transporter. *J Biol Chem.* 2004; 279(17):17428-17433
- Gupta A, Lutsenko S. Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. *Future Med Chem.* 2009; 1(6):1125-1142
- Gybina AA, Prohaska JR. Variable response of selected cuproproteins in rat choroid plexus and cerebellum following perinatal copper deficiency. *Genes Nutr.* 2006;1(1):51-59
- Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q et al. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 123:725–731
- Hagopian GS, Mills GB, Khokhar AR, Bast RC Jr, Siddik ZH. Expression of p53 in cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines: modulation with the novel platinum analogue (1R, 2R-diaminocyclohexane)(trans-diacetato)(dichloro)-platinum(IV). *Clin Cancer Res.* 1999; 5(3):655-663
- Hamaguchi K, Godwin AK, Yakushiji M, O'Dwyer PJ, Ozols RF, Hamilton TC. Cross-resistance to diverse drugs is associated with primary cisplatin resistance in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 1993; 53(21):5225-5232
- Hamelers IH, Staffhorst RW, Voortman J, de Kruijff B, Reedijk J, van Bergen en Henegouwen PM et al. High cytotoxicity of cisplatin nanocapsules in ovarian carcinoma cells depends on uptake by caveolae-mediated endocytosis. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(4):1259-1268
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100(1):57-70
- Harrison MD, Jones CE, Solioz M, Dameron CT. Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci.* 2000 ; 25(1):29-32
- He Q, Liang CH, Lippard SJ. Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(11):5768-5772
- Hengstler JG, Lange J, Kett A, Dornhöfer N, Meinert R, Arand M et al. Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase IIalpha to chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 1999; 59(13):3206-3214
- Henkels KM, Turchi JJ. Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 1999; 59(13):3077-3083
- Hills CA, Kelland LR, Abel G, Siracky J, Wilson AP, Harrap KR. Biological properties of ten human ovarian carcinoma cell lines: calibration in vitro against four platinum complexes. *Br J*

Cancer. 1989; 59(4):527-534

Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*. 1993; 75(2):241-251

Holtzhauer M. Biochemische Labormethoden. Berlin: Springer Verlag; 2009

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

Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ. Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol*. 2010; 77(6):887-894

Huang JC, Zamble DB, Reardon JT, Lippard SJ, Sancar A. HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91(22):10394-10398

Hung MC, Lau YK. Basic science of HER-2/neu: a review. *Semin Oncol*. 1999; 26 (4 Suppl. 12):51-59

Huster D, Purnat TD, Burkhead JL, Ralle M, Fiehn O, Stuckert F et al. High copper selectively alters lipid metabolism and cell cycle machinery in the mouse model of Wilson disease. *J Biol Chem*. 2007; 282(11):8343-8355

Ikeguchi M, Liu J, Kaibara N. Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment. *Apoptosis*. 2002;7(1):23-29

Invitrogen Flp-InTM T-RExTM-Core Kit - Handbuch

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

Iyengar B. Copper levels and the adriamycin inhibition of proliferating cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1983; 10(3):227

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *Ca Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90

Jiang J, Nadas IA, Kim MA, Franz KJ. A Mets motif peptide found in copper transport proteins selectively binds Cu(I) with methionine-only coordination. *Inorg Chem*. 2005; 44(26):9787-9794

Kalayda GV, Wagner CH, Buss I, Reedijk J, Jaehde U. Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer*. 2008; 8:175

Kassack MU, Stratenschulte C. Expression profile of copper transporters in sensitive and cisplatin/oxaliplatin-resistant tumor cell lines. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2005; 43(12):597-598

Katano K, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M et al. Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res*. 2002 Nov 15;62(22):6559-6565

Kauffman GB, Pentimalli R, Doldi S, Hall MD. Michele Peyrone (1813–1883), Discoverer of Cisplatin. *Platinum Metals Rev.* 2010; 54(4): 250–25

Kauffman GB. Alfred Werner's Research on the Platinum Metals a centennial retrospect. *Platinum Metals Rev.* 1997;41(1): 34-40

Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(8):573-584

Kelland LR, Barnard CF, Evans IG, Murrer BA, Theobald BR, Wyer SB et al. Synthesis and in vitro and in vivo antitumor activity of a series of trans platinum antitumor complexes. *J Med Chem.* 1995; 38(16):3016-3024

Kelland LR. New platinum antitumor complexes. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1993; 15(3):191-219

Kelley SL, Basu A, Teicher BA, Hacker MP, Hamer DH, Lazo JS. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science.* 1988; 241(4874):1813-1815

Kidani Y, Inagaki K, Iigo M, Hoshi A, Kuretani K. Antitumor activity of 1,2-diaminocyclohexane--platinum complexes against sarcoma-180 ascites form. *J Med Chem.* 1978; 21(12):1315-1318

Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol.* 2008; 4(3):176-185

Knox RJ, Friedlos F, Lydall DA, Roberts JJ. Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutane-dicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res.* 1986; 46(4 Pt 2):1972-1979

Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen ZS, Terada K, Furukawa T et al. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res.* 2000; 60(5):1312-1316

Krieger ML, Eckstein N, Schneider V, Koch M, Royer HD, Jaehde U, Bendas G. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro. *Int J Pharm.* 2010; 389(1-2):10-17

Kruh GD. Lustrous insights into cisplatin accumulation: copper transporters. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(16 Pt 1):5807-5809

Kuo YM, Zhou B, Cosco D, Gitschier J. The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(12):6836-6841

Larson CA, Adams PL, Blair BG, Safaei R, Howell SB. The role of the methionines and histidines in the transmembrane domain of mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of cisplatin. *Mol Pharmacol.* 2010; 78(3):333-339

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

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

- Lee J, Petris MJ, Thiele DJ. Characterization of mouse embryonic cells deficient in the ctr1 high affinity copper transporter. Identification of a Ctr1-independent copper transport system. *J Biol Chem.* 2002; 277(43):40253-40259
- Lee JL, Wang MJ, Chen JY. Acetylation and activation of STAT3 mediated by nuclear translocation of CD44. *J Cell Biol.* 2009; 185(6):949-957
- Lee YY, Choi CH, Do IG, Song SY, Lee W, Park HS et al. Prognostic value of the copper transporters, CTR1 and CTR2, in patients with ovarian carcinoma receiving platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol.* 2011; 122(2):361-365
- Leischner H. *Onkologie.* München: Urban & Fischer; 2007
- Leonhardt K, Gebhardt R, Mössner J, Lutsenko S, Huster D. Functional interactions of Cu-ATPase ATP7B with cisplatin and the role of ATP7B in the resistance of cells to the drug. *J Biol Chem.* 2009; 284(12):7793-7802
- Li YL, Ye F, Hu Y, Lu WG, Xie X. Identification of suitable reference genes for gene expression studies of human serous ovarian cancer by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 2009; 394(1):110-116
- Liao HJ, Carpenter G. Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression. *Mol Biol Cell.* 2007; 18(3):1064-1072
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods.* 2001; 25(4):402-408
- Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem.* 2003; 278(11):9100-9106
- Mangala LS, Zuzel V, Schmandt R, Leshane ES, Halder JB, Armaiz-Pena GN et al. Therapeutic Targeting of ATP7B in Ovarian Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(11):3770-3780
- Maryon EB, Molloy SA, Kaplan JH. O-linked glycosylation at threonine 27 protects the copper transporter hCTR1 from proteolytic cleavage in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2007; 282(28):20376-20387 (b)
- Maryon EB, Molloy SA, Zimnicka AM, Kaplan JH. Copper entry into human cells: progress and unanswered questions. *Biometals.* 2007; 20(3-4):355-364 (a)
- Michalczyk A, Bastow E, Greenough M, Camakaris J, Freestone D, Taylor P et al. ATP7B expression in human breast epithelial cells is mediated by lactational hormones. *J Histochem Cytochem.* 2008; 56(4):389-399
- Mishima M, Samimi G, Kondo A, Lin X, Howell SB. The cellular pharmacology of oxaliplatin resistance. *Eur J Cancer.* 2002; 38(10):1405-1412
- Misset JL, Bleiberg H, Sutherland W, Bekradda M, Cvitkovic E. Oxaliplatin clinical activity: a review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000; 35(2):75-93
- Mistry P, Kelland LR, Abel G, Sidhar S, Harrap KR. The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines. *Br J Cancer.* 1991; 64(2):215-220
- Møller LB, Petersen C, Lund C, Horn N. Characterization of the hCTR1 gene: genomic

organization, functional expression, and identification of a highly homologous processed gene. *Gene*. 2000; 257(1):13-22

Monty JF, Llanos RM, Mercer JF, Kramer DR. Copper exposure induces trafficking of the menkes protein in intestinal epithelium of ATP7A transgenic mice. *J Nutr*. 2005; 135(12):2762-2766

Muller P, van Bakel H, van de Sluis B, Holstege F, Wijmenga C, Klomp LW. Gene expression profiling of liver cells after copper overload in vivo and in vitro reveals new copper-regulated genes. *J Biol Inorg Chem*. 2007;12(4):495-507

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-350

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M. *Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2008

Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, Miyazaki K, Neamati N, Takebayashi Y. 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*. 2002 Oct; 101(5):488-495

Nakayama K, Kanzaki A, Terada K, Mutoh M, Ogawa K, Sugiyama T et al. Prognostic value of the Cu-transporting ATPase in ovarian carcinoma patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(8):2804-2811

Nyasae L, Bustos R, Braiterman L, Eipper B, Hubbard A. Dynamics of endogenous ATP7A (Menkes protein) in intestinal epithelial cells: copper-dependent redistribution between two intracellular sites. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007; 292(4):G1181-1194

Ohishi Y, Oda Y, Uchiumi T, Kobayashi H, Hirakawa T, Miyamoto S et al. ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human primary ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2002; 8(12):3767-3775

Ono Y, Nonomura N, Harada Y, Fukui T, Tokizane T, Sato E et al. Loss of p73 induction in a cisplatin-resistant bladder cancer cell line. *Mol Urol*. 2001; 5(1):25-30

Ozols RF, Corden BJ, Jacob J, Wesley MN, Ostchega Y, Young RC. High-dose cisplatin in hypertonic saline. *Ann Intern Med*. 1984; 100(1):19-24

Pase L, Voskoboinik I, Greenough M, Camakaris J. Copper stimulates trafficking of a distinct pool of the Menkes copper ATPase (ATP7A) to the plasma membrane and diverts it into a rapid recycling pool. *Biochem J*. 2004; 378(Pt 3):1031-1037

Petris MJ, Camakaris J, Greenough M, LaFontaine S, Mercer JF. A C-terminal di-leucine is required for localization of the Menkes protein in the trans-Golgi network. *Hum Mol Genet*. 1998; 7(13):2063-2071

Petris MJ, Mercer JF. The Menkes protein (ATP7A; MNK) cycles via the plasma membrane both in basal and elevated extracellular copper using a C-terminal di-leucine endocytic signal. *Hum Mol Genet*. 1999; 8(11):2107-2115

Petris MJ, Smith K, Lee J, Thiele DJ. Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. *J Biol Chem*. 2003; 278(11):9639-9646

- Portnoy ME, Schmidt PJ, Rogers RS, Culotta VC. Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*. 2001; 265(5):873-882
- Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Berlin: de Gruyter; 2002
- Puig S, Lee J, Lau M, Thiele DJ. Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J Biol Chem*. 2002; 277(29):26021-26030
- Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev*. 2007; 33(1): 9–23
- Rabik CA, Maryon EB, Kasza K, Shafer JT, Bartnik CM, Dolan ME. Role of copper transporters in resistance to platinating agents. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009; 64(1):133-142
- Raghavan, D. Testicular cancer: maintaining the high cure rate. *Oncology (Williston Park)*. 2003; 17(2): 218-28; discussion 228-229, 234-235, passim.
- Rassow J, Netzker R, Hauser K, Deutzmann R. Duale Reihe – Biochemie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2006
- Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther*. 2002; (3):227-235
- Reedijk J. New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(7): 3611-3616
- Rees EM, Lee J, Thiele DJ. Mobilization of intracellular copper stores by the *ctr2* vacuolar copper transporter. *J Biol Chem*. 2004; 279(52):54221-54229
- Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K et al. 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*. 1996; 52(12):1855-1865
- Roelofsen H, Wolters H, Van Luyn MJ, Miura N, Kuipers F, Vonk RJ. Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology*. 2000; 119(3):782-793
- Rosenberg, B, VanCamp, L, Krigas, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 1965; 205:698–699
- Rosenberg, B, VanCamp, L, Trosko, JE, Mansour, VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*. 1969; 222(5191): 385–386
- Safaei R, Otani S, Larson BJ, Rasmussen ML, Howell SB. Transport of cisplatin by the copper efflux transporter ATP7B. *Mol Pharmacol*. 2008; 73(2):461-468
- Safaei R. Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs. *Cancer Lett*. 2006; 234(1):34-39
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230(4732):1350-1354

- Sakamoto M, Kondo A, Kawasaki K, Goto T, Sakamoto H, Miyake K et al. Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray. *Hum Cell*. 2001; 14(4):305-315
- Samimi G, Safaei R, Katano K, Holzer AK, Rochdi M, Tomioka M et al. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(14):4661-4669
- Samimi G, Varki NM, Wilczynski S, Safaei R, Alberts DS, Howell SB. Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(16 Pt1):5853-5859
- Schänzler N.; Bieger W. *Der grosse GU Kompass Laborwerte*. München: Gräfe und Unzer Verlag; 2007
- Schilder RJ, Ozols RF. New therapies for ovarian cancer. *Cancer Invest*. 1992; 10(4):307-315
- Schrimpf G. *Gentechnische Methoden*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2002
- Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans*. 2001; 29(Pt 6):684-688
- Sell S. *Quantifizierung der antioxidativen Eigenschaften verschiedener Carotinoide in unterschiedlichen Antioxidans-Assays*. Düsseldorf; 2009
- Shah N, Dizon DS. New-generation platinum agents for solid tumors. *Future Oncol*. 2009; 5(1):33-42
- Shiga H, Heath EI, Rasmussen AA, Trock B, Johnston PG, Forastiere AA et al. Prognostic value of p53, glutathione S-transferase pi, and thymidylate synthase for neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 1999; 5(12):4097-4104
- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003; 22(47):7265-7279
- Silbernagl S, Lang F. *Taschenatlas der Pathophysiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1998
- Sinani D, Adle DJ, Kim H, Lee J. Distinct mechanisms for Ctr1-mediated copper and cisplatin transport. *J Biol Chem*. 2007; 282(37):26775-26785
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989; 244(4905):707-712
- Song IS, Savaraj N, Siddik ZH, Liu P, Wei Y, Wu CJ et al. Role of human copper transporter Ctr1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. *Mol Cancer Ther*. 2004; 3(12):1543-1549
- Stathopoulos GP. Liposomal cisplatin: a new cisplatin formulation. *Anticancer Drugs*. 2010; 21(8):732-736

- Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M, Roth HJ. Medizinische Chemie. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2010
- Stratenschulte C. Untersuchungen zum Beitrag von Kupfertransportern bei der Resistenz von Tumorzellen gegen Platinkomplexe, Diplomarbeit. Bonn; 2005
- Thomas H, Senkel S, Erdmann S, Arndt T, Turan G, Klein-Hitpass L et al. Pattern of genes influenced by conditional expression of the transcription factors HNF6, HNF4alpha and HNF1beta in a pancreatic beta-cell line. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(19):e150
- Vaisman A, Varchenko M, Umar A, Kunkel TA, Risinger JI, Barrett JC et al. The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts. *Cancer Res.* 1998; 58(16):3579-3585
- van den Berghe PV, Folmer DE, Malingré HE, van Beurden E, Klomp AE, van de Sluis B et al. Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake. *Biochem J.* 2007; 407(1):49-59
- van den Berghe PV, Klomp LW. Posttranslational regulation of copper transporters. *J Biol Inorg Chem.* 2010; 15(1):37-46
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3(7):research 0034
- Walker JM, Huster D, Ralle M, Morgan CT, Blackburn NJ, Lutsenko S. The N-terminal metal-binding site 2 of the Wilson's Disease Protein plays a key role in the transfer of copper from Atox1. *J Biol Chem.* 2004; 279(15):15376-15384
- Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4(4):307-320
- Wätzig H, Mehnert W, Bühler W. Mathematik und Statistik kompakt, Grundlagen und Anwendungen in Pharmazie und Medizin. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2009
- Werdien D, Peiler G, Ryffel GU. FLP and Cre recombinase function in *Xenopus* embryos. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(11):E53-3.
- Weykam S. Differentielle Genexpression in Cisplatin-resistenten und -sensitiven Ovarialkarzinom-Zelllinien und Untersuchung der Funktion von EMP1. Dissertation. Bonn; 2007
- Wolf CR, Hayward IP, Lawrie SS, Buckton K, McIntyre MA, Adams DJ et al. Cellular heterogeneity and drug resistance in two ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a single patient. *Int J Cancer.* 1987; 39(6):695-702
- Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K. 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.* 2006; 319(2):879-886
- Zdraveski ZZ, Mello JA, Farinelli CK, Essigmann JM, Marinus MG. MutS preferentially recognizes cisplatin- over oxaliplatin-modified DNA. *J Biol Chem.* 2002; 277(2):1255-1260
- Zhang S, Lovejoy KS, Shima JE, Lagpacan LL, Shu Y, Lapuk A et al. Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity. *Cancer Res.* 2006; 66(17):8847-8857

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

Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, Devarakonda K, Kassack MU, Osmak M, Jaehde U. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. Biochem Pharmacol. 2007; 73(2):298-307

Zorbas H, Keppler BK. Cisplatin damage: are DNA repair proteins saviors or traitors to the cell? Chembiochem. 2005; 6(7):1157-1166

Internetseiten

Center of Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark DTU, Lyngby/Dänemark: <http://www.cbs.dtu.dk>

Homepage der Deutschen Gesellschaft für Ernährung:
<http://www.dge.de/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=3&page=6>

Homepage der Deutschen Krebshilfe: www.krebshilfe.de/krebszahlen.html

Homepage der Firma Cell Signaling Technology:
<http://www.cellsignal.com/pathways/apoptosis-signaling.jsp>

Homepage der Firma Invitrogen: <http://products.invitrogen.com>

Homepage der Firma Invivogen: <http://www.invivogen.com>

Homepages der Firma Roche:
www.roche.de/diagnostics/biochemica/bluegenes/grundl_exp.htm
www.roche-applied-science.com/pack-insert/0236276b.pdf

Kaplan-Meier-Plotter: <http://www.kmplot.com>

NCBI-Homepage: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000601.3

Programm Primer 3, Whitehead Institute for Biomedical Research:
biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi

Schmidt KH, Gebel A.: www.icp-ms.de/wasist.html

Stroh A, Projahn D. Agilent Seminar 2011 Teil2, Vergleich Analysenmethoden:
www.chem.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/CEM_Retsch_Agilent_Seminar2011_Teil2_Vergleich_Analysenmethoden.pdf

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| A | Adenin |
| ABC | ATP-binding cassette |
| Abb. | Abbildung |
| ACTB | Beta-Actin |
| Akt | v-akt murine thymoma viral oncogene homolog |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP7A | ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide |
| ATP7B | ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide |
| AWMF | Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. |
| Bad | Bcl2-antagonist of cell death |
| Bak | Bcl2-antagonist/killer |
| Bax | Bcl-2 associated X protein |
| BCA | Bicinchoninic Acid (Bicinchoninsäure) = 2,2'-Bichinoly-4,4'-dicarbonsäure |
| Bcl-2 | B-cell CLL/lymphoma 2 |
| BCRA1 bzw. 2 | Breast Cancer Gene1 bzw. 2 |
| BCS | Batho-cuproin disulfonat |
| Bim | Bcl-2 interacting mediator of cell death |
| β-ME | β-Mercaptoethanol |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| C | Cytosin |
| CBDCA | Carboplatin |
| CCS | copper chaperone for superoxide dismutase |
| cDDP | Cisplatin (cis-Diamindichloroplatin(II)) |
| cDNA | Copy-DNA |
| cds | coding sequence |
| DACH | trans-L-1,2-Diaminocyclohexan |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindol |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxy-Ribonucleinsäure |
| dNTP | Desoxy-Ribonucleotid-Triphosphat(e) |
| ds | doppelsträngig |
| DTT | DL-Dithiothreitol |

| | |
|----------------------|---|
| ECACC | European Collection of Cell Cultures |
| E.-Coli | Escherichia Coli |
| EDTA | Ethylen-diamin-tetraacetat |
| EGF-R | epidermal growth factor receptor |
| EGS | Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat) |
| EPR | enhanced permeability and retention |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| ERBB2 | v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 |
| ERCC1 | excision repair cross-complementing-1 |
| ERK | signal-regulated kinases |
| FC | Fold Change |
| FDA | U.S. Food and Drug Administration |
| FIGO | Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique |
| FKS | Fötale Kälberserum |
| FRT | Flp Recombination Target |
| 5-FU | 5-Fluoruracil |
| G | Guanin |
| GEO | Geometrisches Mittel |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| GOI | Gene of interest |
| GSH | Glutathion |
| GUSB | Glucuronidase beta |
| HAH1 | Human copper transport protein HAH1 (Synonym: ATOX1) |
| hCtr1 | Humaner Kupfertransporter 1 |
| hCtr2 | Humaner Kupfertransporter 2 |
| HEK | Human Embryonic Kidney |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| Her2/neu | s. ERBB2 |
| HKG | Housekeeping-Gen |
| HRP | Horse Radish Peroxidase (Meerrettichperoxidase) |
| huPO, Syn.: RPLP0 | Ribosomales Protein, large, P0 |
| KEK | Konzentrations-Effekt-Kurve |
| LB | Lysogeny Broth |
| LED | Light Emitting Diode |
| L-OHP | Oxaliplatin |
| LV | Leervektor |
| MAPK bzw. MAP-Kinase | mitogen-activated protein kinase |
| mCTR2 | muriner Kupfertransporter 2 |
| MCS | Multiple Cloning Site |
| MG | Molekulargewicht |
| MMR | Mismatch-repair |

| | |
|-------------------|--|
| mRNA | Messenger-RNA |
| MRP | Multidrug resistance-associated protein |
| MT | Metallothioneine |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid |
| MW | Mittelwert (arithmetisches Mittel) |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NER | Nucleotide-excision-repair |
| NMDA | N-Methyl-D-Aspartat |
| NP-40 | Nonidet-P 40 |
| OCT | Organic Cation Transporter |
| ORF | Open Reading Frame |
| p | Probability (Irrtumswahrscheinlichkeit bzw. Signifikanzniveau) |
| PAGE | Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese |
| PBS | Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PEG | Polyethylenglycol |
| P-gp | p-Glycoprotein |
| PhosA2 | Phospholipase A2 |
| pl3-K | Phosphoinositide 3-kinase |
| pol β | DNA-Polymerase β |
| pol η | DNA-Polymerase η |
| PP | Polypropylen |
| Pt | Platin |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| qPCR | Quantitative Polymerase Chain Reaction |
| Ras | Rat sarcoma |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| rRNA | Ribosomale Ribonucleinsäure |
| RPL13A | Ribosomales Protein L13A |
| rpm | Rounds per minute |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| RT | Reverse Transkription |
| RT | Raumtemperatur |
| SD | Standard Deviation (Standardabweichung) |
| SDS | Sodium-Dodecylsulfat |
| shRNA | Short hairpin RNA |
| siRNA | Small interfering RNA |
| SLC | Solute Carrier |
| SLC31A1 (= hCtr1) | Solute Carrier family 31 member 1 |
| SLC31A2 (= hCtr2) | Solute Carrier family 31 member 2 |
| SOC | Super Optimal Catabolite repression |
| T | Thymin |

| | |
|--------|--|
| Tab. | Tabelle |
| TBP | TATA-Box binding protein |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan |
| TGN | Trans-Golgi-Netzwerk |
| TMH | Transmembranäre Helix/Helices |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UBE2D2 | Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2D2 |
| ÜE | Überexpression |
| VF | Verdünnungsfaktor |
| vsvG | vesicular-stomatitis-virus glycoprotein |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid |
| XIAP | X-linked inhibitor of apoptosis protein |
| XPF | xeroderma pigmentosum, complementation group F |
| yCtr2 | Kupfertransporter 2 der Hefe |

6.2 Sequenzierungsergebnisse für die Plasmide zur Überexpression von hCtr1 und hCtr2

6.2.1 pcDNA5/FRT/TO[®]-hCtr1

atagcagagctctccctatcagtgatagagatctccctatcagtgatagagatcgctgacgagctcgtttagtgaaccgtcagatcg
cctggagacgccatccacgctgtttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccggactctagcgtttaaacttaa
gctgtcaccatggatcattcccacataggggatgagctatatggactccaacagtaccatgcaaccttctcaccatcacccaac
cacttcagcctcacactccatggtggaggagacagcagcatgatgatgcctatgaccttctactttggctttaagaatgtgga
actactgtttccggttggtgatcaatacagctggagaaatggctggagctttgtggcagtgttttactagcaatgttctatgaagga
ctcaagatagcccagagagcctgctgctgaagtcacaagtcagcattcgctacaattccatgctgtcccaggaccaaattgga
accatccttatggagacacacaaaactgttgggcaacagatgctgagcttctcactcctgcaaacagtgtgacatcatcca
ggtggtcataagctacttctcatgctcatcttcatgacctacaacgggtacctctgattgtagtagcagcaggggcccgtacagg
atacttctctcagctggaagaaggcagtggttagtgatcacagagcattgccattgagcctcgagtctagaggcccgtttaa
accgctgatcagcctcgactgtgccttctagtgtccagccatctgttgttggcccctccccctgccttcttgaccctggaagggtgcc
actcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtgggggtgggg
gcagacagca

6.2.2 pcDNA5/FRT/TO[®]-hCtr2

atagcagagctctccctatcagtgatagagatctccctatcagtgatagagatcgctgacgagctcgtttagtgaaccgtcagatcg
cctggagacgccatccacgctgtttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccggactctagcgtttaaacttaa

gctgtcagcatggcgatgcatttcatcttctcagatacagcgggtcttctgtttgatttctggagcgtccacagtcctgctggcatggcc
 ctttcgggtgttggtgctcctgcttctggctgtactgtatgaaggcatcaaggttggcaaagccaagctgctcaaccagggtactggga
 acctccaacctccatcagccagcagaccatcgagagacagacggggactctgcaggctcagattcctcctgttggcaga
 acccaccacagggtggtatttgtgtcactttggccagctctaatccatgtcatccagggtgtcatcggctacttcatcatgctggccgta
 atgtcctacaacacctggatttcttgggtgtggtcttgggctctgtgtgggctactacctagcttaccacttctcagcacagcttagt
 ctgcctcgagcttagagggcccgtttaaaccgcgtgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgttggcccctccc
 ccgtgccttcttgaccctggaagggtgccactcccactgtccttcttaataaaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgt
 cattctattctgggggtgggggtgggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgc
 ggtgggctctatggcttctgaggcggaaagaaccagctggggctctaggggggatccccacgcgcctgtagcggcgcatgaag
 cgcggggggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgc

6.3 Vektorkarte von pcDNATM5/FRT/TO

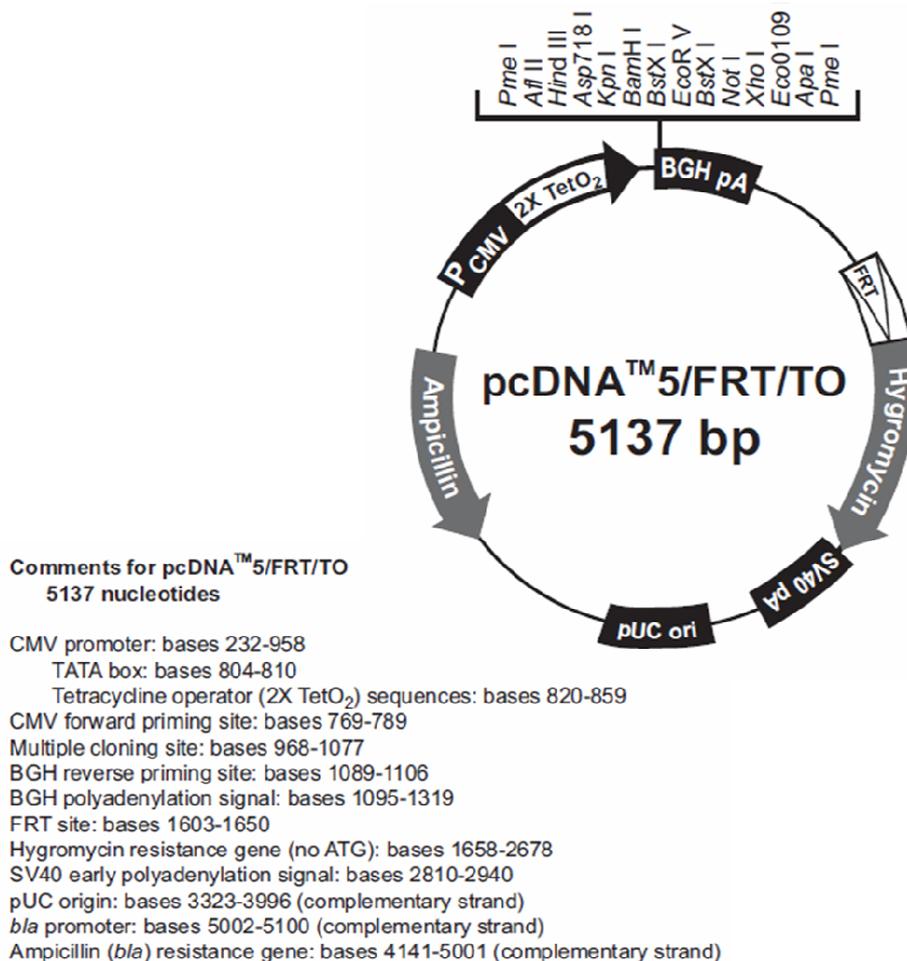


Abb. 6-1: Vektorkarte von pcDNATM5/FRT/TO; *Quelle:* Handuch „pcDNATM5/FRT/TO Inducible expression vector designed for use with the Flp-InTM T-RExTM System“ (Invitrogen, www.lifetechnologies.com/Copyright © 2011 Life Technologies Corporation. Used under permission.)

6.4 Gegenüberstellung der Zellvitalität für die wirkstofffreien Kontrolllösungen in MTT-Assays mit Kupfersulfat und Cisplatin

| Zelltyp | + 10% Aqua bidest. | | | | + 10% NaCl 0,9% (m/V) | | | |
|---------|--------------------|-------|-------|-----|-----------------------|-------|-------|-----|
| | Rep.1 | Rep.2 | Rep.3 | MW | Rep.1 | Rep.2 | Rep.3 | MW |
| EV | 279 | 293 | 327 | 300 | 251 | 267 | 246 | 255 |
| hCtr1 | 194 | 230 | 251 | 225 | 147 | 191 | 204 | 181 |
| hCtr2 | 223 | 243 | 283 | 250 | 187 | 215 | 259 | 220 |

Tab. 6-1: Typische Absorptionswerte der nicht mit Wirkstoff behandelten Zellen aus parallel durchgeführten MTT-Assays mit CuSO_4 und cDDP (Daten aus einem Experiment). Der Zusatz von 10% Aqua bidestillata wirkte sich im Vergleich zum Zusatz von 10% physiologischer Kochsalzlösung nicht negativ auf das Zellwachstum aus.

6.5 Mittlere IC_{50} -Werte aus den MTT-Assays mit Liposomen

| Zelltyp | cDDP frei | | cDDP-Liposomen | | NaCl-Liposomen | |
|---------|------------------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------|------------------------------------|-------------------|
| | IC_{50} [μM] | pIC_{50} | IC_{50} [μM] | pIC_{50} | IC_{50} [μM] | pIC_{50} |
| EV | 0,59 | $6,23 \pm 0,09$ | 1,71 | $5,77 \pm 0,12$ | 7,92 | $5,10 \pm 0,09$ |
| hCtr1 | 0,21 | $6,67 \pm 0,10$ | 0,48 | $6,32 \pm 0,12$ | 2,99 | $5,52 \pm 0,03$ |
| hCtr2 | 1,22 | $5,91 \pm 0,08$ | 2,46 | $5,61 \pm 0,08$ | 7,03 | $5,15 \pm 0,09$ |

Tab. 6-2: IC_{50} -Werte und pIC_{50} -Werte \pm SEM gemittelt aus 3 MTT-Assays mit freiem bzw. liposomalem cDDP

6.6 Ergebnisse für Cisplatin-Uptake und DNA-Platinierung

| cDDP-Uptake | EV | hCtr1 | hCtr2 |
|---------------------|----------------|-----------------|----------------|
| Pt/Zellen [pg/Mio.] | 2219 ± 440 | $3457 \pm 74,4$ | 2052 ± 110 |
| hCtr/EV | — | 1,56 | 0,92 |
| p | — | = 0,05 | n.s. |
| n | 3 | 3 | 3 |

Tab. 6-3: Angegeben sind MW \pm SEM des cDDP-Uptakes aus 3 Experimenten, der jeweilige Unterschied zwischen Überexpressionsklon und EV-Kontrolle als Quotient, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit der statistischen Auswertung mittels ungepaarten t-Tests ($p \leq 0,05$: signifikant, $p > 0,05$: nicht signifikant (n.s.)).

| cDDP-DNA-Addukte | 2 h | | | 2 h + Auswaschphase | | |
|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| | EV [+] | hCtr1 [+] | hCtr2 [+] | EV [+] | hCtr1 [+] | hCtr2 [+] |
| Pt/DNA [pg/ μ g] | 2,99 \pm 0,31 | 2,73 \pm 0,56 | 2,43 \pm 0,55 | 1,94 \pm 0,26 | 2,40 \pm 0,02 | 2,13 \pm 0,23 |
| hCtr/EV | — | 0,92 | 0,81 | — | 1,24 | 1,10 |
| p | — | n.s. | n.s. | — | n.s. | n.s. |
| n | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |

Tab. 6-4: Angegeben sind MW \pm SEM der cDDP-DNA-Adduktbildung aus 2 bzw. 3 Experimenten, der jeweilige Unterschied zwischen Überexpressionsklon und EV-Kontrolle als Quotient, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit der statistischen Auswertung mittels ungepaarten t-Tests ($p > 0,05$: nicht signifikant (n.s.)).

6.7 Normalisierte Expressionen der vier Kupfertransporter in Tumorzellen

| Norm. Expr | hCTR1 | | hCTR1-spez. | | hCTR2 | | ATP7A | | ATP7B | |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | GEO | SD |
| MDA-MB 231 basal | 2,01 x 10 ⁻² | 8,02 x 10 ⁻⁴ | 9,15 x 10 ⁻³ | 4,76 x 10 ⁻⁴ | 3,78 x 10 ⁻³ | 1,44 x 10 ⁻⁴ | 1,07 x 10 ⁻³ | 3,36 x 10 ⁻⁵ | 4,22 x 10 ⁻⁵ | 2,99 x 10 ⁻⁶ |
| MDA-MB 231 cisR | 2,18 x 10 ⁻² | 8,48 x 10 ⁻⁴ | 9,19 x 10 ⁻³ | 6,83 x 10 ⁻⁴ | 2,67 x 10 ⁻³ | 1,33 x 10 ⁻⁴ | 1,26 x 10 ⁻³ | 7,84 x 10 ⁻⁵ | 4,74 x 10 ⁻⁵ | 9,36 x 10 ⁻⁶ |
| T47D basal | 3,06 x 10 ⁻² | 8,35 x 10 ⁻⁴ | 8,37 x 10 ⁻³ | 1,98 x 10 ⁻³ | 5,64 x 10 ⁻³ | 5,12 x 10 ⁻⁴ | 1,51 x 10 ⁻³ | 6,87 x 10 ⁻⁵ | 2,78 x 10 ⁻⁴ | 1,22 x 10 ⁻⁵ |
| T47D cisR | 1,62 x 10 ⁻² | 7,44 x 10 ⁻⁴ | 5,28 x 10 ⁻³ | 3,20 x 10 ⁻⁴ | 2,13 x 10 ⁻³ | 1,07 x 10 ⁻⁴ | 1,11 x 10 ⁻³ | 4,82 x 10 ⁻⁵ | 1,88 x 10 ⁻⁵ | 5,83 x 10 ⁻⁶ |
| Cal27 basal | 2,37 x 10 ⁻² | 1,04 x 10 ⁻³ | 8,76 x 10 ⁻³ | 4,52 x 10 ⁻⁴ | 5,68 x 10 ⁻³ | 3,90 x 10 ⁻⁴ | 8,56 x 10 ⁻⁴ | 4,79 x 10 ⁻⁵ | 1,65 x 10 ⁻⁵ | 1,99 x 10 ⁻⁶ |
| Cal27 cisR | 2,11 x 10 ⁻² | 1,48 x 10 ⁻³ | 7,94 x 10 ⁻³ | 5,31 x 10 ⁻⁴ | 5,90 x 10 ⁻³ | 1,64 x 10 ⁻⁴ | 7,43 x 10 ⁻⁴ | 3,89 x 10 ⁻⁵ | 1,25 x 10 ⁻⁶ | 2,45 x 10 ⁻⁶ |
| Caov3 basal | 2,03 x 10 ⁻² | 1,04 x 10 ⁻³ | 1,10 x 10 ⁻² | 6,08 x 10 ⁻⁴ | 3,96 x 10 ⁻³ | 9,21 x 10 ⁻⁵ | 3,93 x 10 ⁻³ | 9,14 x 10 ⁻⁵ | 2,06 x 10 ⁻⁵ | 4,24 x 10 ⁻⁶ |
| Caov3 cisR | 3,81 x 10 ⁻² | 6,19 x 10 ⁻⁴ | 1,59 x 10 ⁻² | 6,61 x 10 ⁻⁴ | 4,84 x 10 ⁻³ | 1,72 x 10 ⁻⁴ | 4,61 x 10 ⁻³ | 2,03 x 10 ⁻⁴ | 1,32 x 10 ⁻⁴ | 1,61 x 10 ⁻⁵ |
| PA1 basal | 3,06 x 10 ⁻² | 1,49 x 10 ⁻³ | 1,16 x 10 ⁻² | 7,33 x 10 ⁻⁴ | 4,94 x 10 ⁻⁴ | 2,04 x 10 ⁻⁵ | 3,49 x 10 ⁻⁴ | 2,55 x 10 ⁻⁵ | 9,63 x 10 ⁻⁵ | 5,15 x 10 ⁻⁶ |
| PA1 cisR | 3,33 x 10 ⁻² | 8,21 x 10 ⁻⁴ | 1,22 x 10 ⁻² | 5,82 x 10 ⁻⁴ | 5,40 x 10 ⁻⁴ | 3,65 x 10 ⁻⁵ | 5,22 x 10 ⁻⁴ | 6,02 x 10 ⁻⁵ | 1,38 x 10 ⁻⁴ | 2,16 x 10 ⁻⁵ |
| A2780 basal | 3,50 x 10 ⁻² | 1,27 x 10 ⁻³ | 1,70 x 10 ⁻² | 1,61 x 10 ⁻³ | 1,09 x 10 ⁻³ | 1,10 x 10 ⁻⁴ | 1,84 x 10 ⁻³ | 8,51 x 10 ⁻⁵ | 5,13 x 10 ⁻⁴ | 1,90 x 10 ⁻⁵ |
| A2780 cisR | 1,58 x 10 ⁻² | 1,94 x 10 ⁻³ | 5,12 x 10 ⁻³ | 7,10 x 10 ⁻⁴ | 9,97 x 10 ⁻⁴ | 7,73 x 10 ⁻⁶ | 2,13 x 10 ⁻³ | 1,04 x 10 ⁻⁵ | 1,62 x 10 ⁻⁴ | 2,32 x 10 ⁻⁶ |
| OAW42 basal | 1,95 x 10 ⁻² | 1,29 x 10 ⁻³ | 8,10 x 10 ⁻³ | 3,08 x 10 ⁻⁴ | 2,51 x 10 ⁻⁴ | 2,48 x 10 ⁻⁵ | 5,70 x 10 ⁻⁴ | 2,98 x 10 ⁻⁵ | 1,05 x 10 ⁻⁴ | 4,94 x 10 ⁻⁶ |
| OAW42 cisR | 2,09 x 10 ⁻² | 1,19 x 10 ⁻³ | 7,43 x 10 ⁻³ | 3,00 x 10 ⁻⁴ | 1,72 x 10 ⁻³ | 1,33 x 10 ⁻⁴ | 6,45 x 10 ⁻³ | 1,59 x 10 ⁻⁴ | 5,70 x 10 ⁻⁵ | 2,49 x 10 ⁻⁶ |
| Ovcar3 basal | 8,30 x 10 ⁻³ | 5,32 x 10 ⁻⁴ | 2,95 x 10 ⁻³ | 4,96 x 10 ⁻⁴ | 1,60 x 10 ⁻⁴ | 2,30 x 10 ⁻⁵ | 1,23 x 10 ⁻³ | 2,80 x 10 ⁻⁵ | 3,62 x 10 ⁻⁶ | 1,32 x 10 ⁻⁶ |
| Ovcar3 cisR | 1,52 x 10 ⁻² | 9,59 x 10 ⁻⁴ | 5,46 x 10 ⁻³ | 2,78 x 10 ⁻⁴ | 6,99 x 10 ⁻⁴ | 3,23 x 10 ⁻⁵ | 1,72 x 10 ⁻³ | 7,44 x 10 ⁻⁵ | 4,22 x 10 ⁻⁵ | 3,31 x 10 ⁻⁶ |
| Hey basal | 2,28 x 10 ⁻² | 4,77 x 10 ⁻⁴ | 9,01 x 10 ⁻³ | 8,84 x 10 ⁻⁴ | 1,56 x 10 ⁻³ | 1,18 x 10 ⁻⁴ | 9,55 x 10 ⁻³ | 3,47 x 10 ⁻⁴ | 1,41 x 10 ⁻⁵ | 1,57 x 10 ⁻⁶ |
| Hey cisR | 2,67 x 10 ⁻² | 8,44 x 10 ⁻⁴ | 1,22 x 10 ⁻² | 8,99 x 10 ⁻⁴ | 9,24 x 10 ⁻⁴ | 2,75 x 10 ⁻⁵ | 7,95 x 10 ⁻³ | 9,14 x 10 ⁻⁵ | 8,89 x 10 ⁻⁶ | 3,02 x 10 ⁻⁶ |

Tab. 6-5: Normalisierte Expressionen der vier Kupfertransporter in Tumorzellpärchen. Angegeben ist das Geomittel \pm SD aus einem PCR-Lauf mit zwei Replikaten.

6.8 Normalisierte Expressionen der vier Kupfertransporter in den einzelnen Gewebeproben

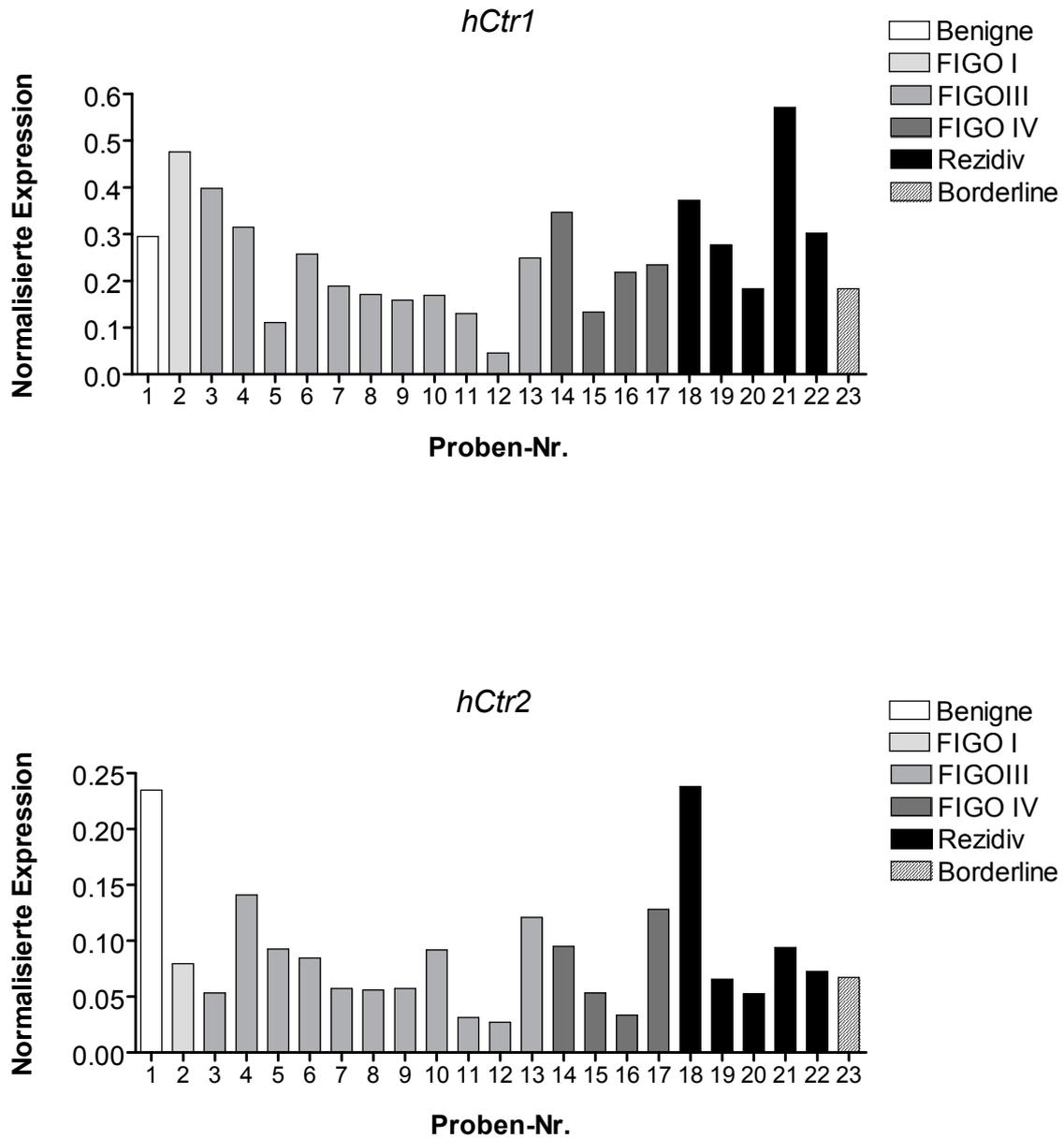


Abb. 6-2: Normalisierte Expressionsniveaus von hCtr1 und hCtr2 in den einzelnen Gewebeproben

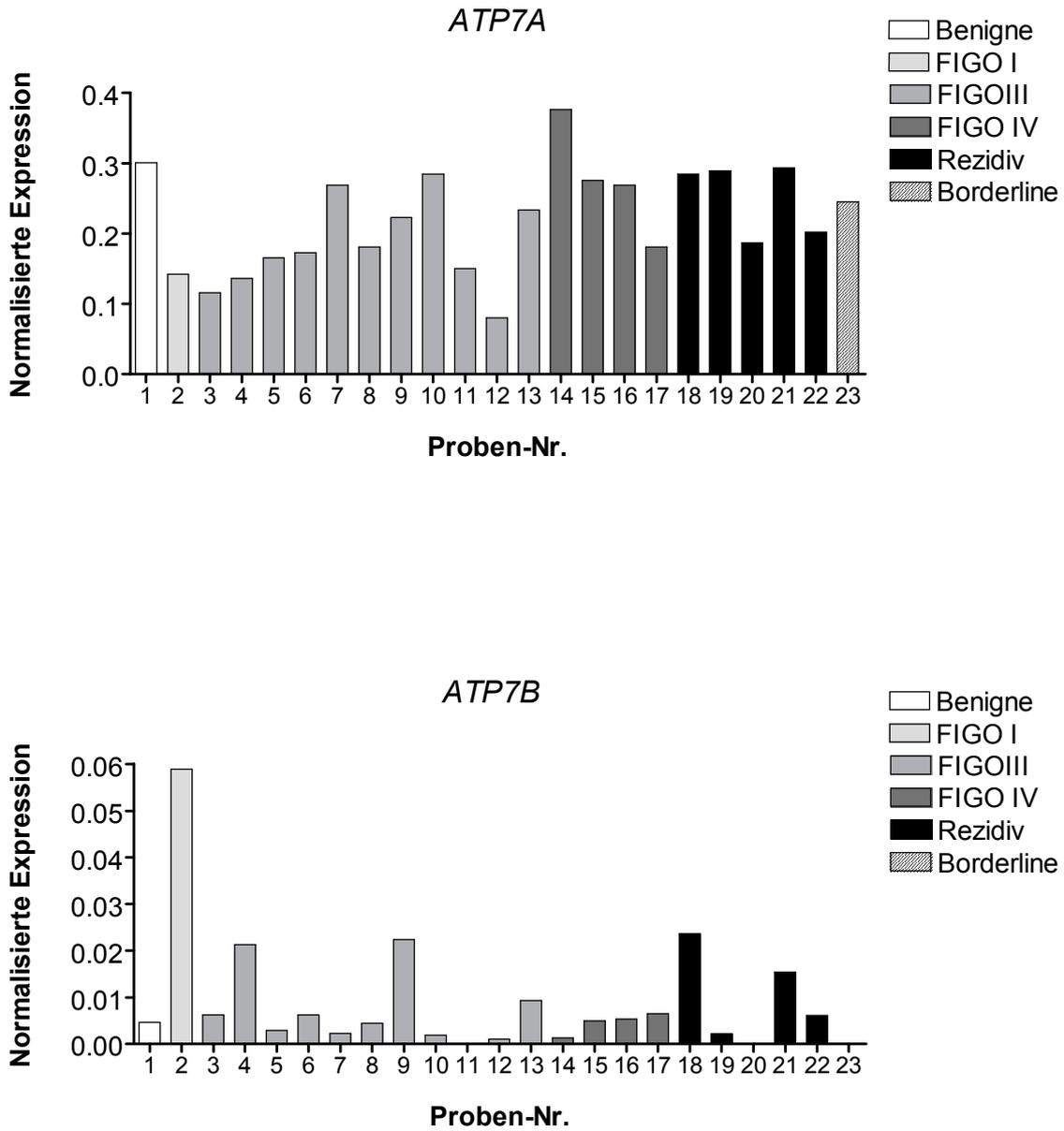


Abb. 6-3: Normalisierte Expressionsniveaus von ATP7A und ATP7B in den einzelnen Gewebeproben

6.9 Test der Primereffizienz

| | TBP | HAH1 | CCS | hCtr1-spezifisch |
|----------------------|--------------|---------------|--------------|------------------|
| Effizienz [%] | 112 | 104 | 112 | 74,8 |
| 95% CI | 77,8 bis 188 | 87,7 bis 94,1 | 94,1 bis 139 | 52,9 bis 126 |
| r² | 0,98 | 0,98 | 0,97 | 0,91 |

Tab. 6-6: Ergebnisse der Bestimmung der Primereffizienzen, sowie zugehörige 95-Konfidenzintervalle und r²-Werte

6.10 Publikationen

6.10.1 Originalarbeiten

Koegel S, Hamacher A, Servan K, Weidtkamp-Peters S, Seidel C, Hilger RA, Park TW, Kuhn W, Jaehde U, Kassack MU. Overexpression of human copper transporter 2 (hCtr2) in Flp-InTM T-RExTM-293-cells reduces cytotoxic effect of anti-tumour platinum complexes. Manuscript in preparation.

Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, Devarakonda K, Kassack MU, Osmak M, Jaehde U. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73(2):298-307

Brückmann NE, Kögel S, Hamacher A, Kassack MU, Kunz PC. Fluorescent Polylactides with Rhenium(bisimine) Cores for Tumour Diagnostics. *Eur J Inorg Chem.* 2010; 2010(32):5043–5173

Kunz PC, Wetzel C, Kögel S, Kassack MU, Spingler B. $[(C_3H_4N_2)_2Au]Cl$ —a bis protic gold(I)-NHC. *Dalton Trans.* 2011; 40(1):35-37

6.10.2 Posterpräsentationen

Kögel S, Kassack MU. Human copper-transporter 2 plays a role in resistance to platinum-containing anti-cancer drugs. CESAR-Jahrestagung 2009. 29-31 Oktober 2009, Heidelberg

Kögel S, Kassack MU. Role of the human Copper-Transporter 2 in resistance to Platinum-Containing Anti-Cancer Drugs. 6th Polish-German Symposium on Pharmaceutical sciences – perspectives for a new decade. 20-21 Mai 2011, Düsseldorf

Kögel S, Hilger RA, Kassack MU. Human copper-transporter 2 plays a role in resistance to platinum-containing anti-cancer drugs. 5th Mildred Scheel Cancer Conference. 13-15 Juli 2011, Königswinter

6.11 Danksagung

Viele Menschen haben dazu beigetragen, dass diese Arbeit vollendet werden konnte. Daher möchte ich mich herzlich bedanken bei

- Prof. Dr. Matthias U. Kassack für die Überlassung und Betreuung des Themas und das stets in mich gesetzte Vertrauen
- Prof. Dr. Ulrich Jaehde für das Koreferat und die gute Zusammenarbeit
- Dr. Alexandra Hamacher für die Bereitstellung der Tumorzellpärchen, die gute Zusammenarbeit und ihre unermüdliche Motivation
- Dr. Kati Servan und PD Dr. Hans-Dieter Royer für die Unterstützung bei der Klonierung
- Prof. Dr. Tjong- Won Park-Simon und Prof. Dr. Walther Kuhn für die Überlassung der Gewebeproben
- Prof. Dr. Claus Seidel und Dr. Stefanie Weidtkamp-Peters für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen
- Prof. Dr. Gerd Bendas und Michaela Borrmann für die Herstellung der Liposomen
- Dr. Ralf Hilger und Herrn Dennis Alex für die ICP-MS-Bestimmung
- Prof. Dr. Peter Proksch und Frau Waltraud Schlag für die Hilfe bei der DNA-Trocknung
- Den Mitarbeitern des Arbeitskreises von Prof. Kassack sowie des gesamten Instituts für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Düsseldorf für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima
- Den Mitarbeitern des Pharmazeutischen Instituts der Universität Bonn, insbesondere den Arbeitskreisen von Prof. Jaehde, Prof. Wiese und Prof. Bendas für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit
- Christian Urban und Nicole Brockmann für das Korrekturlesen
- Allen Assistenten des Biochemiepraktikums für die gute und fröhliche Zusammenarbeit bei der Studentenbetreuung über viele Semester
- Meiner Familie für die Unterstützung während der Studien- und Promotionszeit in jeder Hinsicht
- Holger für das unermüdliche Korrekturlesen, Formatieren und Motivieren sowie für die sehr gute und stets konstruktive Kritik.