

Haplotypen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens als  
Suszeptibilitätsfaktoren für das kolorektale Karzinom sowie  
In-vitro-Expressionsanalyse Vitamin-D-regulierter Gene

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jana Flügge

aus Greifswald

November, 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

2. Gutachter: Prof. Dr. Ivar Roots

Disputation am 26.02.2009

## **Danksagung**

Ich möchte meiner direkten Betreuerin Frau Dr. Solveigh Krusekopf für die umfangreiche wissenschaftliche Beratung zu Inhalten, Methoden und Auswertungen sowie zu Diskussion und Interpretation der Ergebnisse und allen Veröffentlichungen danken. Sie hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, unterstützte mich moralisch und war einfach immer für mich da. Ich verdanke ihr sehr viel.

Herrn Direktor Prof. Dr. Ivar Roots (Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) danke ich für die freundliche Überlassung des Themas. Herrn Prof. Dr. Melzig (Pharmazeutische Biologie, FU Berlin) danke ich für die Annahme des Themas am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität sowie für seine vielfältige Hilfe und Unterstützung.

Frau Dr. Laschinski danke ich für die sorgfältige Durchsicht von Manuskripten, Berichten und der Promotionsschrift.

Herrn Dr. Uwe Malzahn ist für die Unterstützung bei statistischen Analysen und die Durchsicht der Manuskripte ein großer Dank auszusprechen.

Ich danke meinen Kollegen Dr. Juliane Bolbrinker, Dr. Steffen Bauer und Dr. Mark Goldammer aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie für die langjährige sehr gute wissenschaftliche Zusammenarbeit.

Frau Dr. Elena Osswald danke ich für die Bereitstellung des kaukasischen Fall-Kontroll-Kollektives aus Russland.

Außerdem möchte ich die sehr gute Zusammenarbeit mit meinen Kollegen der CENiMED GmbH – Center for Individualized Medicine – Clinical Pharmacogenomics in Berlin-Buch erwähnen. Im Rahmen des IBB-Projektes „Parallele Analyse vieler SNPs aus einer Patientenprobe mittels SNPlex-Technik: Etablierung virtueller Genchips für pharmakogenetische Bestimmungen“ wurden unter Leitung von Frau Dr. Solveigh Krusekopf

die SNplex-Assays etabliert, durchgeführt und ausgewertet. Dabei danke ich vor allem Frau Dipl. Biol. Sabrina Klare für die SNplex-Durchführung, Frau Dr. Solveigh Krusekopf für die SNplex-Etablierung und -Auswertung und Frau Anne Sülflow und Frau Dipl. Biol. Kristin Krostitz für die Sequenzierung von 3 SNPs.

Diese Promotion wurde finanziell unterstützt durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (InnoRegio Projekt, Förderkennzeichen 03I4507, Pharmakogenomische Optimierung der Arzneitherapie und Arzneimittelentwicklung – Teilprojekt Kolonkarzinom) und die Investitionsbank Berlin (ProFIT Projekt, Förderkennzeichen 1013 3117, Individuelle Risikofaktoren für Kolonkarzinom unter Berücksichtigung polymorpher Gene – Genetische Assoziationsuntersuchungen unter Einbezug einer großen Anzahl von Mutationen).

Einen besonderen Dank möchte ich meinen Eltern Dr. Dipl.-Ing. Frank Flügge und Dipl.-Ing. Evelyn Flügge, meiner Schwester Dipl.-Chem. Susanne Flügge, meiner Oma Herta Flügge und meinen Großeltern Günter Buckow und Christel Buckow aussprechen – für die wertvolle Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Ausbildung, von der Schulzeit, über das Studium bis zur Promotion und für den Rückhalt und die Ermutigung in allen Höhen und Tiefen dieser Arbeit.

**Inhaltsverzeichnis**

Danksagung ..... I

Inhaltsverzeichnis ..... III

Abkürzungsverzeichnis ..... VII

1 Einleitung ..... 1

    1.1 Kolorektales Karzinom ..... 1

        1.1.1 Inzidenz und Mortalität ..... 1

        1.1.2 Pathogenese – die Adenom-Karzinom-Sequenz ..... 1

        1.1.3 Individuelle und Umwelt-Risikofaktoren – Disposition und Exposition ..... 2

        1.1.4 Genetische Faktoren und Prädisposition ..... 4

    1.2 Vitamin D ..... 5

        1.2.1 Eigenschaften ..... 5

        1.2.2 Vitamin-D-Metabolismus ..... 6

        1.2.3 Zusammenhang zwischen Vitamin D und kolorektalem Karzinom ..... 7

    1.3 Vitamin-D-Rezeptor ..... 8

        1.3.1 Aufbau, Struktur und Vorkommen ..... 8

        1.3.2 Wirkungsweise ..... 10

        1.3.3 Polymorphismen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens, Assoziationen und molekulare Charakterisierung ..... 11

        1.3.4 Vitamin-D-Rezeptor-poly(A)-Mikrosatellit ..... 12

        1.3.5 Polymorphismen von Genen des Vitamin-D-Metabolismus ..... 13

    1.4 Fragestellung ..... 14

2 Material und Methoden ..... 15

    2.1 Materialien ..... 15

        2.1.1 Studienpopulationen ..... 15

        2.1.2 Zelllinien ..... 18

        2.1.3 Geräte ..... 18

        2.1.4 Chemikalien ..... 20

        2.1.5 Lösungen ..... 23

        2.1.6 Verbrauchsmaterialien ..... 23

2.2	Genpolymorphismen .....	24
2.2.1	Extraktion genomischer DNA .....	24
2.2.2	DNA-Quantifizierung.....	25
2.2.3	Genotypisierung mittels PCR und Restriktionsverdau (PCR-RFLP) .....	25
2.2.4	Fragmentlängenanalyse mittels Genescan® und Sequenzierung.....	29
2.2.5	Multiplex-Analyse (SNPlex) zur Bestimmung von Polymorphismen von Genen des Vitamin-D-Metabolismus.....	32
2.2.6	Qualitätskontrolle .....	38
2.3	Zellkulturen und induzierte Differenzierung.....	39
2.3.1	Zellkultur.....	39
2.3.2	Kultivierung der Zellen .....	39
2.3.3	Induktion der Zelldifferenzierung .....	40
2.3.4	Zellernte und Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellkulturlysate.....	40
2.4	Genexpressionsanalyse mit RT-PCR .....	41
2.4.1	Ablauf der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR.....	41
2.4.2	RNA-Isolierung und Bestimmung der RNA-Konzentration.....	41
2.4.3	Reverse Transkription (cDNA-Synthese) .....	42
2.4.4	Real-time-PCR .....	42
2.4.5	Relative Quantifizierung .....	45
2.4.6	Gelelektrophorese.....	45
2.4.7	Qualitätskontrolle .....	46
2.5	Genexpressionanalyse mit GeneChip-Mikroarrays .....	47
2.5.1	Bestimmung der RNA-Konzentration (Quantität) .....	47
2.5.2	Bestimmung der RNA-Integrität (Qualität) .....	48
2.5.3	GeneChip® Human Genome U133 2.0 .....	50
2.5.4	Ablauf der Genexpressionsanalyse mit GeneChip-Mikroarray .....	50
2.5.5	Qualitätskontrolle und vergleichende Expressionsanalyse .....	52
2.6	Datenanalyse .....	53
2.6.1	Software .....	53
2.6.2	Statistische Analyse.....	54
2.6.3	Haplotypen-Analyse.....	55
2.6.4	Datenanalyse der Mikroarrays .....	55

3	Ergebnisse .....	57
3.1	VDR-Genpolymorphismen .....	57
3.1.1	Klinische Daten .....	57
3.1.2	Ergebnisse der Genotypisierung.....	58
3.1.3	VDR-Genotypen-Paare .....	59
3.1.4	VDR-Kopplungsungleichgewicht .....	60
3.1.5	VDR-Haplotypen .....	61
3.1.6	Vitamin-D-Rezeptor-poly(A)-Mikrosatellit.....	63
3.2	Polymorphismen von Genen des Vitamin-D-Metabolismus .....	67
3.2.1	Klinische Daten .....	67
3.2.2	Ergebnisse der Multiplex-Analyse .....	68
3.2.3	Korrelationen von Genotypen .....	72
3.2.4	Kopplungsanalyse .....	72
3.2.5	Komplexe Genotypen und Haplotypen .....	74
3.3	Genexpressionsanalyse mit RT-PCR .....	77
3.3.1	Induktionsversuche (Differenzierungsmodell).....	77
3.3.2	Relative Quantifizierung der mRNA.....	78
3.3.3	VDR-Genexpression in Caco-2-Zellen .....	79
3.3.4	CDH1-Genexpression in Caco-2-Zellen .....	80
3.3.5	VDR-Genexpression in SW480-Zellen.....	81
3.3.6	CDH1-Genexpression in SW480-Zellen.....	82
3.4	Genexpressionsanalyse mit GeneChip-Mikroarrays .....	83
3.4.1	Clusteranalyse .....	83
3.4.2	Datenanalyse der regulierten Gene (Sicherungsstufen) .....	84
3.4.3	Zuordnung der regulierten Gene .....	85
3.4.4	Scatter-Plot .....	85
3.4.5	Hierarchische Clusteranalyse .....	86
3.4.6	Analyse ausgewählter Vitamin-D-regulierter Gene.....	88
4	Diskussion .....	92
4.1	VDR-Genpolymorphismen .....	92
4.1.1	Einfluss von Vitamin-D-Rezeptor-Gen-Polymorphismen auf die Suszeptibilität für das kolorektale Karzinom (Fall-Kontroll-Studie).....	92

4.1.2	Einfluss von Kopplungsungleichgewicht, komplexen Genotypen und Haplotypen.....	95
4.2	Polymorphismen von Genen des Vitamin-D-Metabolismus .....	100
4.3	Genexpressionsanalyse.....	102
4.3.1	Interpretation der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR nach Induktion in Zellkulturen (Differenzierungsmodell).....	102
4.3.2	Technische Probleme und Übertragbarkeit .....	104
4.3.3	Wahl der Referenz- und Kandidatengene .....	105
4.3.4	Qualitätskontrolle und Datenanalyse der Mikroarray-Ergebnisse .....	106
4.3.5	VDR- und CDH1-Expression nach Mikroarrayanalyse.....	106
4.3.6	Interpretation der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mit GeneChip-Mikroarray .....	107
4.3.7	Modell der Genregulation durch Vitamin D .....	112
4.4	Ausblick und Perspektiven.....	113
5	Zusammenfassung .....	114
6	Literaturverzeichnis.....	118
7	Publikationsverzeichnis.....	132
	Lebenslauf .....	134
	Eidesstattliche Erklärung.....	135

---

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
Acc. No.	Zugangsnummer (accession number)
ACTB	beta-Actin
ATRA	all-trans-Retinsäure
β-ME	beta-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare (base pairs)
BMI	Body-Mass-Index
BSA	bovines Serumalbumin
CDH1	E-Cadherin
CDS	kodierende Sequenz (coding sequence)
CI	Konfidenzintervall
cRNA	komplementäre RNA (complementary RNA)
CV	Variationskoeffizient
CYP	Cytochrom-P-450
CYP24A1	Cytochrom-P-450 24A1 (Cytochrom P450, Familie 24, Subfamilie A, Polypeptid 1), Vitamin-D <sub>3</sub> -24-hydroxylase
CYP27A1	Cytochrom-P-450 27A1 (Cytochrom P450, Familie 27, Subfamilie A, Polypeptid 1), Vitamin-D <sub>3</sub> -25-hydroxylase
CYP27B1	Cytochrom-P-450 27A1 (Cytochrom P450, Familie 27, Subfamilie B, Polypeptid 1), 25-Hydroxyvitamin-D <sub>3</sub> -1-alpha-hydroxylase
d	Tag
ddNTP	2',3'-Dideoxynukleotide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
fcRNA	fragmentierte komplementäre RNA
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)



---

g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
gDNA	genomische DNA
Gl.	Gleichung
h	Stunde
hap	Haplotyp
hm	homozygot
ht	heterozygot
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
KG	Komplexe Genotypen
LD	Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium)
M	molar
MAF	Allelfrequenz des Minor-Allels (minor allele frequency)
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (Messenger-RNA)
mut	mutiert
MW	Mittelwert
n	Größe der Stichprobe
N.A.	nicht angegeben
NaB	Natriumbutyrat
NaCl	Natriumchlorid
n.d.	nicht detektierbar
NR	nukleäre Rezeptoren
n.s.	nicht signifikant
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
OR	Quotenverhältnis (odds ratio)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
QC	Qualitätskontrolle

---

r	Korrelationskoeffizient
RAR	Retinsäure-Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RLT	Puffer, enthält hochdenaturierendes Guanidin-Isothiocyanat (GITC)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
ROH	Retinol
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
S	Svedberg (Einheit, Sedimentationskoeffizient)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
sec	Sekunden
ssDNA	einzelsträngige DNA (single strand)
SNP	Einzelnukleotidaustausch (single nucleotide polymorphism)
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit, Einheit
UV	ultraviolettes Licht
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
wt	Wildtyp
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	Vitamin D, 1,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> , Calcitriol
3′-, 5′-UTR	3′-, 5′-nicht-translatierter Bereich (untranslated region)
7-DHC	7-Dehydrocholesterol

# **1 Einleitung**

## **1.1 Kolorektales Karzinom**

### **1.1.1 Inzidenz und Mortalität**

Weltweit ist das kolorektale Karzinom die dritthäufigste Tumorart und die vierthäufigste Todesursache maligner Erkrankungen für Männer und Frauen zusammen. Von 12.332.300 Krebsneuerkrankungen pro Jahr weltweit entfallen 1.769.987 Krebsfälle und 630.000 Krebstote (8% aller Krebstoten) auf das kolorektale Karzinom (Globocan 2002, IARC International Agency for Research on Cancer).

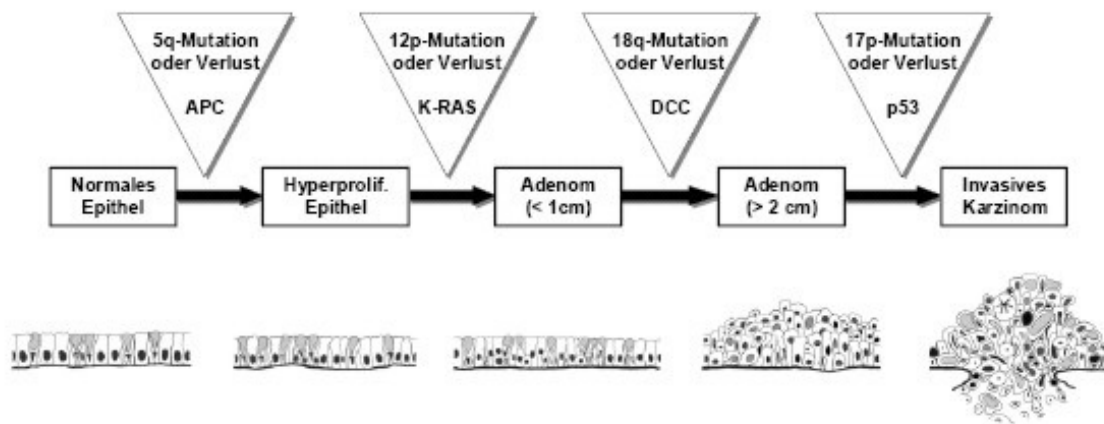
In Deutschland ist das kolorektale Karzinom die zweithäufigste Todesursache bei den malignen Erkrankungen. Laut Robert-Koch-Institut (RKI, Berlin, Gesundheitsberichterstattung, Krebs in Deutschland, 2003-2004, Häufigkeiten und Trends, 2008) lag die geschätzte Zahl der Krebsneuerkrankungen für Darmkrebs im Jahre 2004 bei 37.250 Männern (16,2% aller Krebsneuerkrankungen) und bei 36.000 Frauen (17,5% aller Krebsneuerkrankungen). Laut Statistischem Bundesamt (Wiesbaden, amtliche Todesursachenstatistik 2004, 2008) lag die Zahl der Krebssterbefälle für Darmkrebs in Deutschland 2004 bei 13.748 Männern (12,4% aller Krebssterbefälle) und bei 14.034 Frauen (14,3% aller Krebssterbefälle).

Trotz aller Anstrengungen und Fortschritte in Diagnostik und Therapie nimmt die Häufigkeit in den westlichen Ländern weiter stetig zu, während die Sterbezahlen durch Präventionsmaßnahmen, medikamentöse Therapie und Chirurgie abnehmen. Circa 50% aller Patienten versterben auch heute noch weltweit an der Erkrankung oder deren unmittelbaren Folgen (American Cancer Society).

### **1.1.2 Pathogenese – die Adenom-Karzinom-Sequenz**

Die Entstehung von Darmkrebs ist das Ergebnis fortschreitender Veränderungen von Darmepithelzellen in folgender Sequenz: normale Kolonmucosa, Hyperproliferation, benigner Polyp, Adenom, Karzinom (Abb. 1). Dieses Modell der „Adenom-Karzinom-Sequenz“ beschreibt bestimmte, wiederholt auftretende genetische Veränderungen, die eine morphologische Umwandlung der Darmschleimhaut verursachen (Fearon und Vogelstein, 1990).

Eine unkontrollierte Hyperproliferation geht dabei mit verminderter digestiv-absorptiver Leistung, Permeabilitätsstörungen und eingeschränkter Differenzierung einher. Etwa 90% der kolorektalen Karzinome entwickeln sich aus benignen adenomatösen Polypen.



**Abb. 1** Molekulargenetische Veränderungen beim Kolonkarzinom (Adenom-Karzinom-Sequenz). Modell der kolorektalen Karzinogenese nach Fearon und Vogelstein (1990).

Rund 90% aller kolorektalen Tumore gehören zu den Adenokarzinomen; daneben kommen Siegelringzell- und Plattenepithelkarzinome vor; kleinzellige und undifferenzierte Karzinome sind hingegen selten. Adenokarzinome sind durch unkontrollierte Zellteilung verursachte Gewebewucherungen und entwickeln sich aus drüsenhaltigem Epithelialgewebe oder gutartigen Neubildungen der Schleimhäute. Was zunächst als polypöse Masse erkennbar ist, infiltriert später die Darmwand, gelangt in das Lymphsystem und befällt dort anfangs lokale, später auch entfernte Lymphknoten. Letztendlich entstehen Metastasen.

Unter dem Begriff "kolorektales Karzinom" bzw. "Kolon-Rektumkarzinom" werden die bösartigen Neubildungen des Dickdarms (Kolon) und des Mastdarms (Rektum) zusammengefasst. Eine genaue örtliche Abgrenzung des Tumors und eine eindeutige Zuordnung zu Kolon oder Rektum kann schwierig sein. Als Rektumkarzinome gelten Tumore, deren unterer Rand weniger als 16 cm von der Linea anocutanea entfernt ist. Mehr als die Hälfte der kolorektalen Karzinome entstehen im Sigma-Rektum-Bereich.

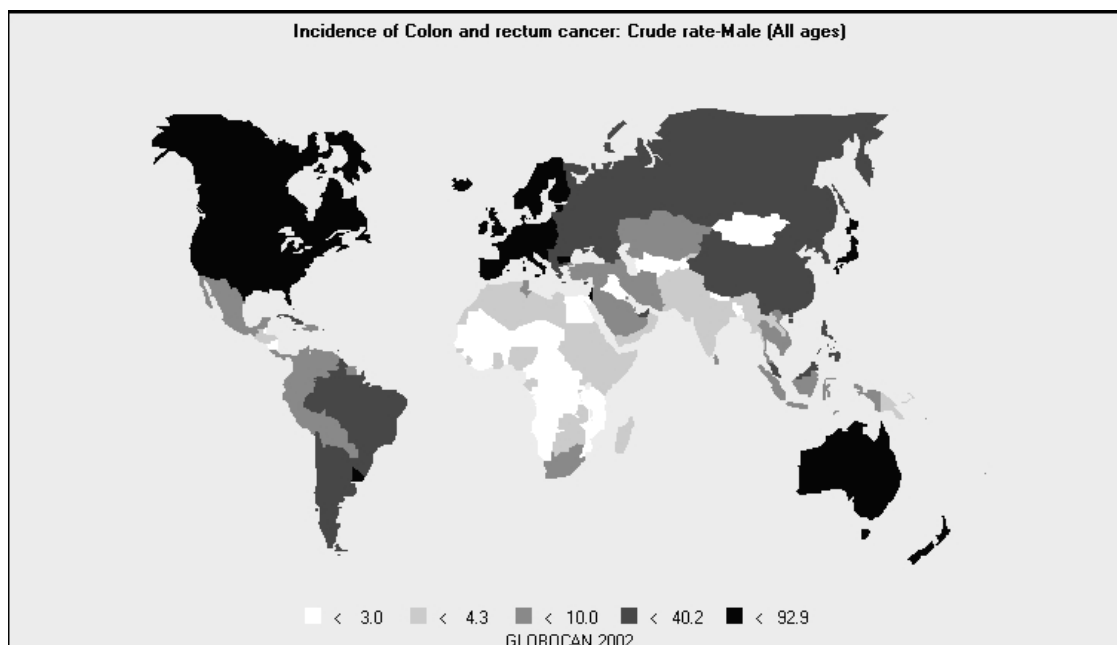
### 1.1.3 Individuelle und Umwelt-Risikofaktoren – Disposition und Exposition

In der Regel beruht die Entstehung einer Krebserkrankung nicht auf einer einzigen Ursache, sondern auf einer Kombination verschiedenster Faktoren. Der bisherige Wissensstand erlaubt nur bei einem Teil der häufigeren Tumorarten eine Prävention oder Früherkennung. Unter den vermeidbaren Risikofaktoren hat das Rauchen, das zwischen einem Viertel und einem Drittel aller Krebstodesfälle verursacht, überragende Bedeutung. Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung bestimmter Krebserkrankungen sind chronische Infektionen, Exposition mit

Karzinogenen am Arbeitsplatz, hoher Alkoholkonsum und Einflüsse aus der Umwelt (Robert-Koch-Institut; Mackay et al., 2006). Dazu zählen die ultravioletten Anteile des Sonnenlichts, Feinstaub, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) aus Auto- und Industrieabgasen, Radon und Passivrauchen. Diese Belastungen wirken im Laufe eines Lebens in vielfältiger Weise zusammen, sodass die Bestätigung einer Ursachenvermutung im Einzelfall nur selten möglich ist.

Beim kolorektalen Karzinom unterscheiden sich Vorkommen und Sterberate stark zwischen ethnischen Gruppen und stehen in direktem Zusammenhang mit Alter, Ernährung, Menge an UV-Exposition am Breitengrad des Wohnortes und dem 25-Hydroxyvitamin-D-Blutspiegel (Garland und Garland, 1980; Garland et al., 1999; American Cancer Society, 2001). Sowohl genetische Ursachen als auch die Fisch- und Soja-reiche und Fleisch-arme Ernährung werden im Zusammenhang mit dem niedrigeren Risiko für das kolorektale Karzinom bei Asiaten diskutiert (Yang et al., 2003; Cross et al., 2004). Risikofaktoren für Darmkrebs stellen aber auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Infektionen dar.

Wie in Abb. 2 zu sehen, ist ein starkes Nord-Süd-Gefälle für das Vorkommen von kolorektalen Karzinomen auffällig. Es besteht ein direkter Zusammenhang mit der UV-Exposition und den Vitamin-D-Spiegeln (Holick et al., 2004).



**Abb. 2** Weltweite Verteilung von Neuerkrankungen an kolorektalem Karzinom bei Männern (Globocan 2002, International Agency for Research on Cancer). Angaben pro 100.000 Einwohner pro Jahr; 0 bis 65 Jahre

In Abhängigkeit vom Wohnort bzw. dem entsprechenden geografischen Breitengrad wird in der Haut als Schutz vor übermäßiger UV-Exposition Melanin gebildet. Eine hohe Melanin-Produktion führt zu niedrigen 7-Dehydrocholesterol-Spiegeln bei UV-Exposition, denn die Bildung dieser Vitamin-D-Vorstufe in der Haut erfolgt erst durch die Einstrahlung von Sonnenlicht. Eine starke Melanin-Schicht oder Pigmentierung führt zu einem niedrigen Vitamin-D-Spiegel. So haben Nordamerikaner mit afrikanischer Herkunft niedrige Vitamin-D-Spiegel und das höchste Risiko, an Darmkrebs zu erkranken (Mostafa et al., 2004).

Das Durchschnittsalter der Darmkrebs-Diagnose liegt bei Männern bei 69 Jahren und bei Frauen bei 75 Jahren. Bei familiärer Veranlagung manifestiert sich das kolorektale Karzinom bereits in der ersten Lebenshälfte.

#### **1.1.4 Genetische Faktoren und Prädisposition**

Etwa 10 % der Darmkrebserkrankungen werden durch bekannte vererbare Mutationen verursacht. Zu diesen früh auftretenden genetischen Formen gehören u.a.:

- FAP (familial adenomatous polyposis, familiäre adenomatöse Polyposis): durch eine Mutation im APC-(adenomatous polyposis coli)-Tumorsuppressorgen verursacht, Vielzahl von Polypen (Morin et al., 1997);
- HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer, hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom): hauptsächlich durch den Verlust der DNA-Reparaturfähigkeit begründet, keine Polypen (Rustgi, 2007);
- Peutz-Jeghers-Syndrom: eine Mutation im STK11-(Serin-Threonin-Proteinkinase)-Gen ist die Hauptursache, Vielzahl präkanzeröser und benigner Polypen (Launonen, 2005);
- Bloom-Syndrom: charakteristisch sind Mutationen im BLM-(Bloom)-Gen, Verlust der chromosomalen Integrität, was zu Lichtempfindlichkeit, Minderwuchs, Infektanfälligkeit, Karzinomen oder Leukämie führt (Amor-Guéret, 2006).

Der weitaus größere Anteil – 65% bis 85% – aller kolorektalen Karzinome tritt allerdings spontan auf, das heißt, es liegt keine bekannte vererbte Ursache zugrunde. Es ist eine normale Erscheinung, dass sich Zellen im Laufe des Lebens verändern bzw. mutieren. Häufen sich solche Mutationen, kann sich die Proliferation erhöhen und der Phänotyp ändern.

Nahezu alle kolorektalen Tumore weisen Deregulationen oder Genmutationen auf. Es gilt als erwiesen, dass eine Vielzahl von Mutationen nötig ist, um eine normale Zelle in eine Krebszelle zu verwandeln. Es wird angenommen, dass den Mutationen dieser Gene

unterschiedliche Bedeutung zukommt und die Summe der Mutationen letztendlich den Phänotyp der Erkrankung bestimmt.

Das menschliche Genom enthält ca. 3,2 Milliarden Basenpaare und ca. 30.000 Gene, die für 120.000 Proteine codieren. Zwei Individuen unterscheiden sich in ca. 0,1% ihres DNA-Alphabets voneinander, d.h. in 3,2 Millionen varianten Stellen, wobei neben Deletionen und Insertionen ca. 1,4 Millionen SNPs existieren (The International SNP Map Working Group, 2001). Aktuelle Schätzungen gehen sogar von 11 Millionen SNPs aus, die bei mehr als 1% der Bevölkerung variieren (Kruglyak und Nickerson, 2001; Kruglyak, 2008).

Genetische Varianten in kodierenden Regionen können bei Änderung der Aminosäuresequenz zu einer veränderten Proteinfunktion führen. Genetische Varianten, die in 5'-flankierenden Regionen und in Introns auftreten, können dagegen die Gentranskription beeinflussen (Agarwal et al., 2000; Kuehl et al., 2001). Um die genetische Prädisposition gegenüber einer Krankheit aufzuklären, werden häufig sogenannte retrospektive Assoziationsstudien durchgeführt, die den statistischen Zusammenhang zwischen einer genetischen Variante und dem Erkrankungsrisiko untersuchen.

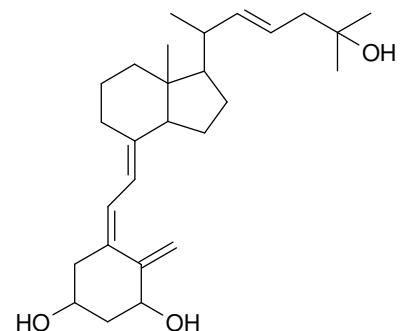
Zahlreiche Gene sind an der Entstehung des kolorektalen Karzinoms beteiligt, wobei jedes einzelne zu dieser hochkomplexen Erkrankung beiträgt (Davis, 2008). Aus diesem Grund erscheint es durchaus sinnvoll, genetische Varianten des Fremdstoffmetabolismus und deren Rezeptoren zu untersuchen.

## 1.2 Vitamin D

### 1.2.1 Eigenschaften

Vitamin D ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ,  $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$ , Calcitriol) wirkt vielfältig auf den Calcium- und Phosphathaushalt. Es fördert die Resorption von Calcium-Ionen im Darm und sorgt für die Rückresorption in der Niere. Es mobilisiert Calcium aus den Knochen und setzt dadurch Knochenumbauprozesse in Gang. Es reguliert die Calcium- und Phosphataufnahme in die Knochen und das Immunsystem.

Ein wichtiges Zielorgan für Vitamin D ist der Knochen, wo es am Aufbau der Knochenmatrix und dessen Kalzifizierung durch Osteoblasten beteiligt ist.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Mangel führt zu



einem verminderten Mineral-Metabolismus und beeinflusst so die Zahnentwicklung und den Knochenaufbau. Diese Mangelerkrankung wird als „Rachitis“ bezeichnet.  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Mangel durch verminderte Produktion ist eine der häufigsten Ursachen für Osteoporose. Vitamin D ist maßgeblich an der Aufrechterhaltung und Regulation von normalem Zellwachstum, Reifung von Lymphozyten, Hemmung der Proliferation, Karzinogenese und Metastasierung beteiligt. Vitamin D bzw. sein aktivster Metabolit  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  trägt nicht nur zur Calcium-Homöostase, sondern auch zur Regulation von Zellproliferation und Differenzierung bei (Xi und Feldman, 1993; Kane et al., 1996, Valdeielso und Fernandez, 2006).

Calcitriol, der aktive Metabolit von Vitamin D und Agonist des Vitamin-D-Rezeptors (VDR), besitzt antiproliferative, proapoptotische und Differenzierung-induzierende Attribute in intestinalen Tumor-Zelllinien (Lamprecht und Lipkin, 2003). Außerdem induziert Vitamin D Zell-Zyklus-Arrest und Apoptose und ist in die Regulation von Zellwachstum involviert, was synthetische Vitamin-D-Analoga für eine Therapie gegen Psoriasis und Krebs interessant macht (Gulliford et al., 1998). Ein protektiver Effekt gegenüber der Entwicklung von kolorektalen Adenomen wurde beschrieben (Peters et al., 2001). In Tiermodellen zum kolorektalen Karzinom zeigten Vitamin D und synthetische Vitamin-D-Derivate eine chemopräventive Aktivität (Akhter et al., 1997; van Weelden et al., 1998). Vitamin D fördert die Differenzierung von humanen Darmkrebszellen, die VDR exprimieren.

### **1.2.2 Vitamin-D-Metabolismus**

Aus der Vorstufe von natürlichem Vitamin D, 7-Dehydrocholesterol, wird in der Haut durch UVB-Absorption Prä-Vitamin-D<sub>3</sub> gebildet (Abb. 3), welches dann durch thermische Induktion in Vitamin D<sub>3</sub> (Colecalciferol) umgewandelt wird. Weitere Sonnenlicht-Exposition von Prä-Vitamin-D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>3</sub> führt zu biologisch inerten Photoprodukten. Vitamin D<sub>3</sub> durchläuft nach Eintritt in die Blutzirkulation verschiedene Transformationsstufen, u.a. 25-Hydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub> (Calcidiol), die zu dem aktiven Metaboliten 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> (Calcitriol) führen (DeLuca und Schnoes, 1983), ein Ligand des Vitamin-D-Rezeptors (VDR). Calcitriol interagiert im Cytosol mit dem Vitamin-D-bindenden Protein (VDBP), wandert als lösliches Protein in den Zellkern und aktiviert den VDR. Der VDR-Vitamin-D-Komplex bindet als nukleärer Rezeptor direkt an die DNA. Eine Vielzahl von Faktoren, inklusive Serumphosphat ( $\text{P}_i$ ) und Parathormon (PTH), regulieren die renale Produktion von 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>.

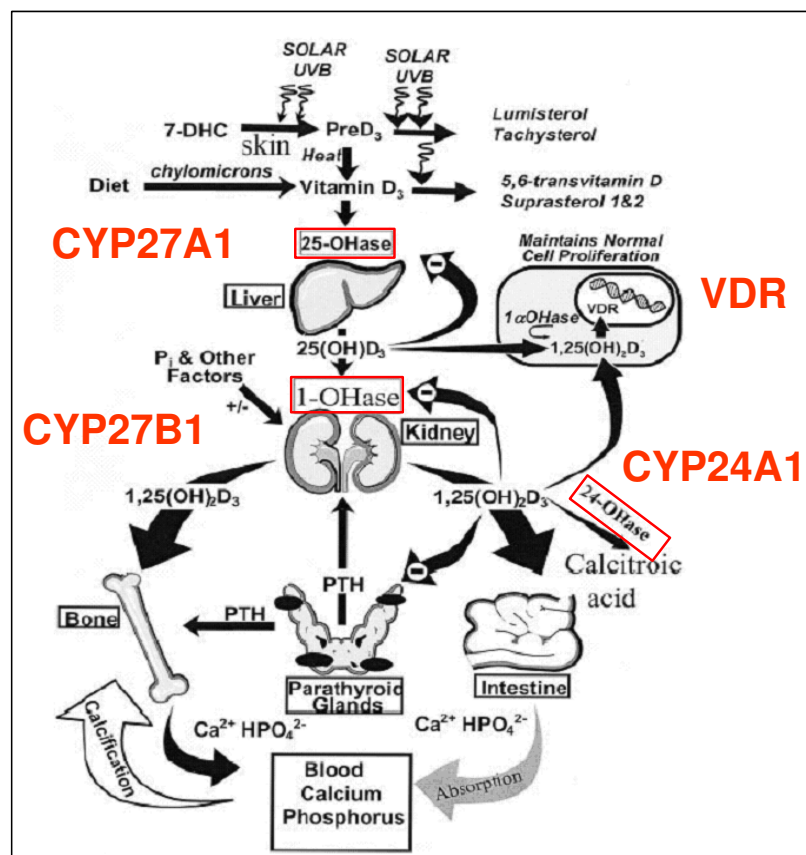


1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> ist wiederum an der Regulation der Calcium-Homöostase durch Interaktion mit seinen Hauptzielstrukturen Knochen und Darm beteiligt. 25-Hydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub> wird außerdem in anderen Geweben metabolisiert zum Zweck der Regulation von Zellwachstum und Proliferation.

1,25-Dihydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub> induziert aber auch seine eigene Zerstörung durch die Steigerung der Expression der 25-Hydroxy-Vitamin-D-24-Hydroxylase. An der Umwandlung von 7-DHC in den aktiven Metaboliten 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (Vitamin D) sind die Hydroxylasen CYP24A1, CYP27A1 (CYP2R1) und CYP27B1 (CYP1α) beteiligt (Abb. 3).

CYP27A1, eine 25-Hydroxylase, wandelt in der Leber Vitamin D<sub>3</sub> (aus Nahrung oder Haut) oxidativ in 25-Hydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub> um. CYP27B1, eine 1-alpha-Hydroxylase, bildet dann in der Niere oxidativ den reaktiven Metaboliten 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub>.

CYP24A1, eine 24-Hydroxylase, ist in der Galle maßgeblich an der oxidativen Biotransformation von 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub> in Calcitriol-säure beteiligt (DeLuca und Schnoes, 1983).



**Abb. 3** Vitamin-D-Bildung und Metabolismus (modifiziert nach Holick et al., 2004)

### 1.2.3 Zusammenhang zwischen Vitamin D und kolorektalem Karzinom

Über den Zusammenhang zwischen Vitamin D, seinem Rezeptor VDR und dem Vorkommen von kolorektalen Karzinomen gibt es umfangreiche Untersuchungen.

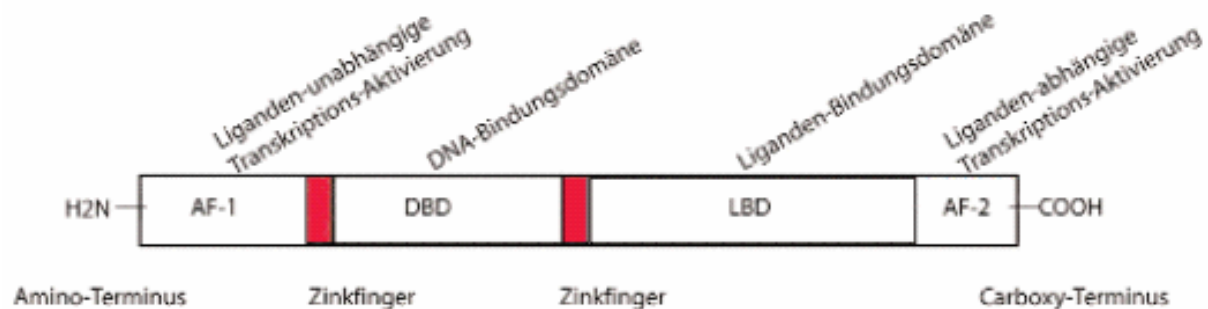
Ein Mangel an Vitamin D, Vitamin-D-Vorstufen und UV-Strahlung ist mit einem erhöhten Darmkrebsrisiko assoziiert (Garland et al., 1999). Epidemiologische Daten lassen auf eine

inverse Assoziation zwischen Vitamin-D-Zufuhr oder Sonnenlicht-Exposition und kolorektalem Karzinom schließen (Garland et al., 1989; Newmark and Lipkin, 1992). Die Behandlung mit 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> vermindert die Proliferation und verstärkt die Differenzierung von Tumorzellen (Zhao und Feldman, 1993). Eine überdurchschnittliche Einnahme von Vitamin D und überdurchschnittliche Vitamin-D-Metaboliten-Konzentrationen im Serum sind mit einem geringeren Vorkommen von kolorektalem Karzinom assoziiert (Garland et al., 1991).

### 1.3 Vitamin-D-Rezeptor

#### 1.3.1 Aufbau, Struktur und Vorkommen

Der Vitamin-D-Rezeptor gehört zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren (NR), besitzt 5 funktionelle Domänen und eine homologe Struktur zu den anderen NR. Seine 427 Aminosäuren umfassen einen kurzen N-terminalen Aktivierungsbereich (AF-1), eine DNA-Bindungsdomäne (DBD) inklusive zweier Zinkfinger, eine flexible „Hinge“-Region inklusive nukleärer Lokalisationssignale und einer Hitzeschockprotein-Bindungsstelle (HSP90), eine Ligand-Bindungsdomäne für Steroide und für die Interaktion mit Co-Repressoren und Co-Aktivatoren (LBD) und einen C-terminalen Aktivierungsbereich (AF-2) (Abb. 4).

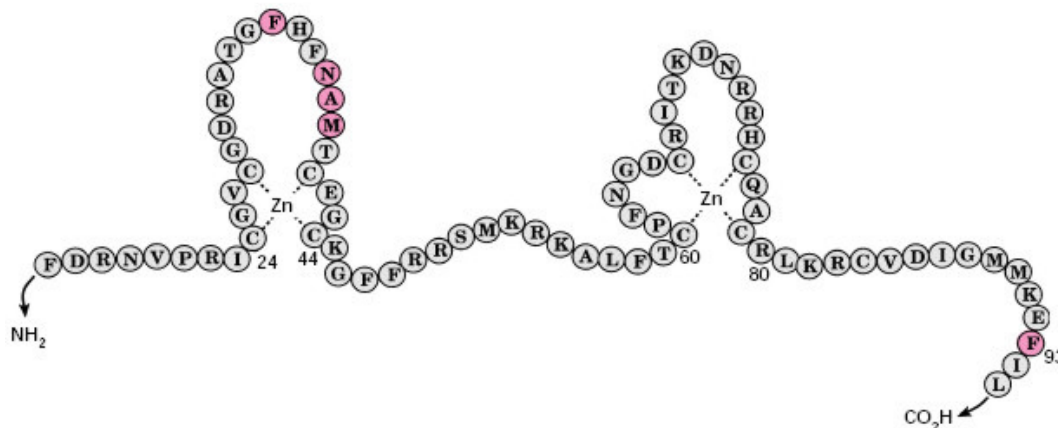


**Abb. 4** Modulare Struktur des nukleären Rezeptors VDR mit seinen 5 funktionellen Domänen (Behne, 2003)

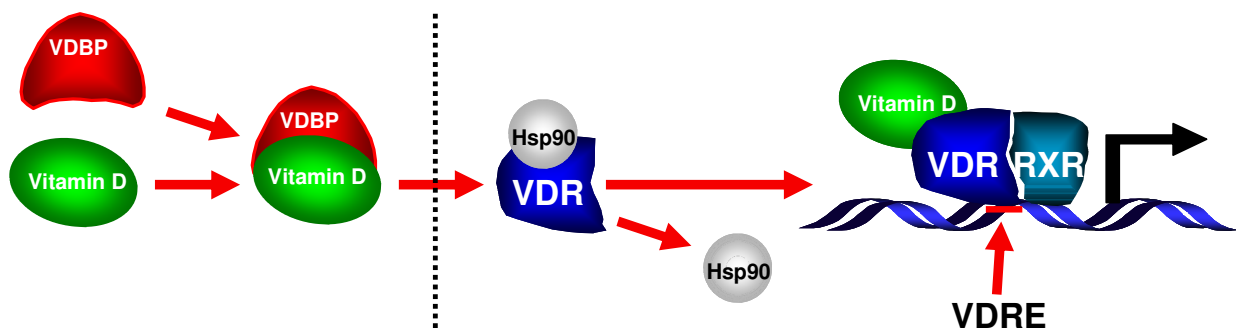
Der Kern der DBD ist aus zwei Zinkfingern zusammengesetzt, wovon jeder vier hochkonservierte Cysteinmoleküle enthält, die die Bindung von Zinkatomen koordinieren (Abb. 5). Der VDR besitzt im Vergleich zu den anderen NR keine TATA-Box und ein zusätzliches Exon (V).

In Abwesenheit eines Liganden liegt der VDR als inaktiver oligomerer Komplex vor, indem er vor allem eine Verbindung mit dem Hitzeschockprotein HSP90 eingeht, welches dann nach

Ligandenbindung abgespalten wird. Nach Ligandenaktivierung durch  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , das über das Vitamin-D-bindende Protein (VDBP) in den Zellkern transportiert wird, bildet der VDR Heterodimere mit anderen nukleären Rezeptoren (Abb. 6). Der VDR bindet an spezifische Nukleotidsequenzen (vitamin D response elements, VDREs) in den Promotor- oder Enhancerregionen bestimmter, direkt Vitamin-D-responsiver Gene (Abb. 6) und beeinflusst so deren Expression (McDonald et al., 2001).



**Abb. 5** Die Zinkfinger der DBD des VDR (Christakos et al., 1996). Die Helix I ist für die spezifische Bindung an Vitamin-D-responsive Elemente (VDRE) auf der DNA und Helix II für die Rezeptor-Dimerisation verantwortlich.



**Abb. 6** Mechanismen der Vitamin-D-Wirkung – die Interaktion des Vitamin-D-Rezeptors (VDR), Vitamin-D-bindendem Protein (VDBP), Hitzeschockprotein (Hsp90) und Retinsäure-X-Rezeptor (RXR) mit Vitamin-D-responsiblen Elementen (VDRE) in Zielzellen.

Der VDR wurde bereits in zahlreichen Organen und Geweben des menschlichen Körpers und in Zellkultur gefunden, in der Niere (Wagner et al., 2001), Prostata (Albrechtsson et al., 2003), beta-Zellen des Pankreas (Johnson et al., 1994), Ovarien (Villena-Heinsen, 2002), Uterus (Johnson et al., 1996), Hepatozyten (Drocourt et al., 2002), Intestinum (Lee et al., 2003), Zervix (Reichrath et al., 1998), Haut (Milde et al., 1991; Reichrath et al., 1999), Lunge (Higashimoto et al., 1996), Brust (Friedrich et al., 1998), Gehirn (Eyles et al., 2005), Herz (Fraga et al., 2002) und in der Nebenschilddrüse (Correa et al., 2002).

Außerdem wurde der VDR in normaler Darmschleimhaut (Vandewalle et al., 1994) und in humanen Darmkrebszellen (Giuliano et al., 1991) identifiziert. Die Expression des VDR ist in Darmkrebszellen häufig herabreguliert (Kane et al., 1995). Eine verstärkte VDR-Expression ist mit einer günstigen Prognose für Darmkrebspatienten assoziiert (Evans et al., 1998).

Die molekularen Effekte des VDR auf die Progression von Darmkrebs sind noch nicht vollständig geklärt.

### 1.3.2 Wirkungsweise

Der VDR reguliert aktiv vielfältige Zielgene (Mangelsdorf et al., 1995) und ist somit ein Transkriptionsfaktor. Die höchste Ligandenbindungsaffinität besteht gegenüber Calcitriol. Im Vergleich dazu haben Metaboliten, die nur in der 1 $\alpha$ - oder der 25-Position hydroxyliert sind, eine Bindungsaffinität von nur 0,1-1,0%. Bislang wurden einige funktionelle VDREs identifiziert, deren Gene durch 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> induziert werden, z.B. Osteocalcin, Osteopontin, 25-Hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-24-Hydroxylase (CYP24A1), Parathormon (PTH), Calbindin D-9k (CaBP, Calcium-bindendes Protein) und alkalische Phosphatase (Übersichtsartikel von Christakos et al., 1996).

Zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren (NR) zählen auch der Progesteron-Rezeptor (PXR), der Thyroid-Rezeptor (THR), der Peroxisomen-Proliferator-Aktivator-Rezeptor (PPAR), der Retinsäure-Rezeptor (RAR) und der Retinoid-X-Rezeptor (RXR). Der VDR bindet als Heterodimer hauptsächlich mit dem RXR als aktiver Rezeptor-Komplex an VDREs (Abb. 6). Aber auch mit PPARG, THRB und RAR bildet der VDR Heterodimere.

Der RAR vermittelt Signale der all-trans-Retinsäure (ATRA) und 9-cis-Retinsäure (cRA), während für den RXR nur cRA ein Ligand ist (Gudas, 1992). Retinoide wie ATRA und cRA entfalten ihre hormonelle Wirkung direkt auf nukleärer Ebene und greifen in die Genexpression ein. Die Rezeptoren RAR und RXR, die jeweils aus den drei Unterformen RAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und RXR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  bestehen, müssen für eine Rezeptoraktivierung und anschließende Signaltransduktion heterodimerisieren (Übersichtsartikel von Petkovich et al., 1987). Das RAR/RXR-Heterodimer bindet im Nukleus ebenfalls an responsive Elemente in Genpromotoren (RARE, Retinoic Acid Responsive Element; RXRE, Retinoic-X Responsive Element) (Yu et al., 1991; Mangelsdorf et al., 1990, 1992).

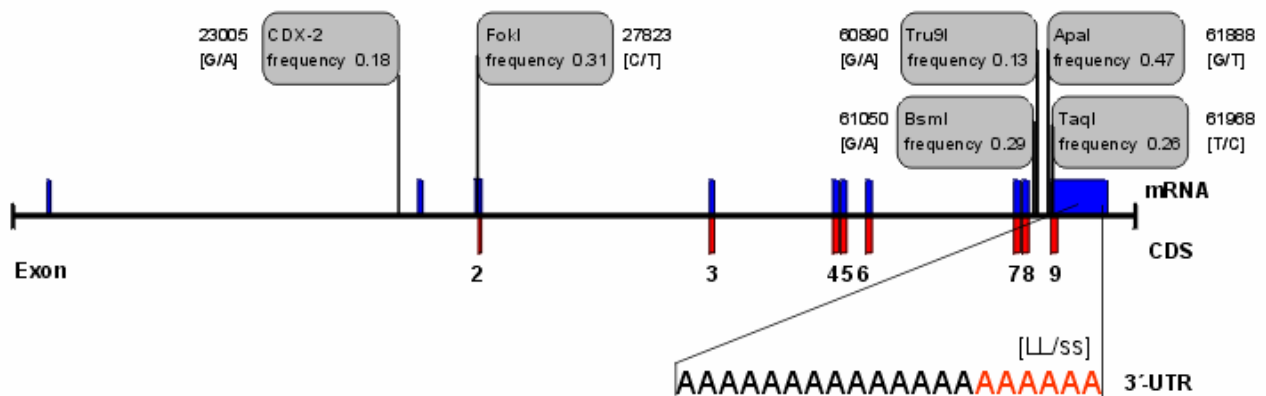
Die Heterodimere (RAR/RXR) binden effizienter an DNA-Retinsäure-responsive-Elemente (RAREs) als die Homodimere (RXR/RXR) oder Heterodimere mit anderen nukleären

Rezeptoren (RXR/NR). Dennoch reguliert der RXR den nukleären Import von ungebundenem VDR. Eine VDR-vermittelte Repression verschiedener  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulierter Gene ist z.B. für den CaSR (Parathyroid calcium sensing receptor) und den PTHR (Parathormon-Rezeptor) bekannt (Darwish und De Luca, 1996).

### 1.3.3 Polymorphismen des Vitamin-D-Rezeptor-Gens, Assoziationen und molekulare Charakterisierung

Das VDR-Gen ist auf Chromosom 12q12-q14 lokalisiert (Labuda et al., 1992), enthält 14 Exons und ist polymorph. Mehr als 100 SNPs wurden bisher für die 67076-bp lange Sequenz beschrieben, die in 8 kodierenden Exons (2-9, schwarz) und 6 alternativ gespleißten Regionen (1a-1f, grau) und auf funktionell relevante Bereiche einschließlich des 3'-nicht- translatierten Bereichs (3'-UTR) und der Promotor-Region verteilt sind. Im VDR-Gen sind zahlreiche Mutationen und Allele beschrieben worden, deren Auftreten teilweise zu einer Reduzierung der Genaktivität führt.

Die häufig vorkommenden Polymorphismen 23005G>A (CDX-2), 27823C>T (FokI), 60890G>A (BsmI), 61050G>A (Tru9I), 61888G>T (ApaI) und 61968T>C (TaqI) (Abb. 7, Übersichtsartikel von Uitterlinden et al., 2004) und Kombinationen dieser Varianten als komplexe Genotypen und Haplotypen (Fang et al., 2007) wurden im Zusammenhang mit zahlreichen Erkrankungen beschrieben.



**Abb. 7** Die Vitamin-D-Rezeptor-Gen-Polymorphismen und der poly(A)-Mikrosatellit. Der strukturelle Aufbau der Exons und Introns ist annähernd maßstabsgerecht gezeichnet. Die Positionen der Polymorphismen sind in bp angegeben. Der entsprechende Basenwechsel ist in Klammern angegeben. Die Frequenzen des Minor-Allels entsprechen kaukasischen Populationen (HapMap; PubMed Acc.No. GI 32891816). Referenzsequenz AY342401 (67076 bp). CDS, coding sequence (aus Flügge et al., 2007).

Der Polymorphismus CDX-2 ist in der Promotorregion lokalisiert und kann die Genregulation beeinflussen. Der Startkodon-Polymorphismus FokI hat ein Protein mit 424 Aminosäuren anstelle von 427 Aminosäuren zur Folge („missense“). Während BsmI, Tru9I und ApaI in Introns zu finden sind, ist TaqI im Exon 9 als synonyme bzw. stille Mutation lokalisiert, d.h. der Polymorphismus codiert für die gleiche Aminosäure und die Aminosäuresequenz bleibt unverändert. Kombinationen von zwei bis vier dieser Varianten sind bei Patienten mit kolorektalem Karzinom untersucht worden und lieferten widersprüchliche Ergebnisse (Grau et al., 2003; Park et al., 2006; Slattery et al., 2001; Sweeney et al., 2006).

Funktionelle Mutationen des VDR führen als genetischer Defekt beim Menschen zu Vitamin-D-resistenter Rachitis.

Verschiedene Mutationen des VDR sind bereits mit zahlreichen Krankheiten assoziiert worden, z.B. mit Osteoporose (Langdahl et al., 2000; Douroudou et al., 2003; Zhang et al., 2003; Kim et al., 2003; Uitterlinden et al., 2001; Pacini et al., 1996), Diabetes mellitus Typ 1 (Gyorffy et al., 2002; Pani et al., 2000; Skrabic et al., 2003), Diabetes mellitus Typ 2 (Oh und Barrett-Connor, 2002), Psoriasis (Hallsall et al., 2005; Park et al., 1999), AIDS-Progression (Nieto et al., 2004), Brustkrebs (Guy et al., 2003; Sillanpaa et al., 2004), Prostatakrebs (Huang et al., 2004), Morbus Basedow (Ban und Taniyama, 2000) und mit primärem Hyperparathyreoidismus (Carling et al., 1998). Die o.g. Studien fanden Assoziationen für die häufig vorkommenden Polymorphismen CDX-2, FokI, BsmI, Tru9I, ApaI und TaqI (Abb. 7) oder für Kombinationen dieser Varianten mit den entsprechenden Erkrankungen (Uitterlinden et al., 2004).

#### **1.3.4 Vitamin-D-Rezeptor-poly(A)-Mikrosatellit**

Der poly(A)-Mikrosatellit (rs17878969, Abb. 7) ist im 3'-UTR des VDR-Gens zu finden und weist eine unterschiedliche Anzahl von A-Repeats auf (TTAAAAATAC[(A)13/16/18/19/23/24]TAGCCGGGCA, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=17878969](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=17878969)).

Derartige Wiederholungen einzelner Nukleotide (SSR, Single Sequence Repeats) in kodierenden Bereichen können als Insertion bzw. Deletion zu einer Verschiebung des Leserasters führen. Diese Wiederholungen sind außerdem hochvariabel: Durch falsche Zusammenlagerung beim Crossing-over während der meiotischen Rekombination haben sich im Verlauf der Evolution viele verschiedene Allele gebildet, die aus jeweils einer anderen Zahl von Wiederholungen bestehen. Jeder Mensch hat dadurch eine sehr spezifische

Zusammensetzung dieser Allele. Ein Einfluss des Polymorphismus auf die mRNA-Stabilität wurde diskutiert (Whitfield et al., 2001).

Varianten des VDR-poly(A)-Mikrosatelliten wurden mit verschiedenen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, z.B. mit Prostatakrebs (Taylor et al., 1996; Ingles et al., 1997; Correa-Cerro et al., 1999), Brustkrebs (Ingles et al., 2000) und Osteoporose (Grundberg et al., 2003, 2004; Kim et al., 2003). Slattery et al. (2001) und Sweeney et al. (2006) fanden eine Assoziation zwischen Varianten des poly(A)-Mikrosatelliten und dem Darmkrebsrisiko.

### **1.3.5 Polymorphismen von Genen des Vitamin-D-Metabolismus**

An der Biosynthese und dem Katabolismus von Vitamin D sind die Hydroxylasen CYP24A1, CYP27A1 und CYP27B1 beteiligt (Abb. 3). Da ein Mangel an Vitamin D und Vitamin-D-Vorstufen mit einem erhöhten Darmkrebsrisiko assoziiert ist (Garland et al., 1999) und CYP24A1, CYP27A1 und CYP27B1 den Vitamin-D-Haushalt maßgeblich regulieren, könnten Polymorphismen dieser Hydroxylasen auch direkt mit dem Vorkommen von kolorektalen Karzinomen assoziiert und für den Vitamin-D-Metabolismus relevant sein.

Drei CYP24A1-Mutationen (rs17219315, rs2762942 und rs2296241) wurden bisher beschrieben (Wjst et al., 2006). Während rs17219315 und rs2762942 in Introns zu finden sind, aber die Gentranskription beeinflussen können (Agarwal et al., 2000; Kuehl et al., 2001), ist rs2296241 in Exon 4 als eine stille Mutation lokalisiert.

Die CYP27A1-Polymorphismen rs4674338, rs11677711, rs4674345, rs6709815 befinden sich alle in nicht-kodierenden Bereichen, sind als häufige Mutationen bei PubMed gelistet und bisher nicht in Assoziationsstudien untersucht worden.

Die häufig vorkommenden Polymorphismen CYP27B1<sub>-1077</sub>, <sub>-1260</sub> und <sub>+2838</sub> wurden bisher nur im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen untersucht (Bailey et al., 2007; Lopez et al., 2004a; 2004b). CYP27B1<sub>-1077</sub> und <sub>-1260</sub> sind in der Promotorregion lokalisiert und können die Genregulation beeinflussen, während <sub>+2838</sub> in Intron 6 lokalisiert ist und bereits von Saito et al. (2002) beschrieben wurde.

Alle oben genannten Polymorphismen sind nach aktuellem Kenntnisstand bisher nicht auf eine Assoziation zum kolorektalen Karzinom untersucht worden, und erscheinen deshalb besonders interessant für eine weiterführende Analyse.

## 1.4 Fragestellung

Krebs ist durch unreguliertes Zellwachstum charakterisiert. Der VDR spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation von Zellproliferation und -differenzierung in verschiedenen Geweben, normalen wie transformierten. Aus In-vitro-Experimenten mit menschlichen Kolonkarzinomzelllinien ist bekannt, dass das Zellwachstum über den VDR moduliert wird. Die Vermutung liegt deshalb nahe, dass Varianten im VDR-Gen zum individuellen Risiko, ein Kolonkarzinom zu entwickeln, beitragen. Einzelne VDR-Varianten sind bereits mit unterschiedlichen Ergebnissen auf ihre Assoziation mit dem Kolonkarzinomrisiko untersucht worden.

Diese Arbeit versucht die Frage zu beantworten, ob ein Zusammenhang besteht zwischen den wichtigsten Polymorphismen im VDR-Gen bzw. in Schlüsselgenen des Vitamin-D-Stoffwechsels und der Suszeptibilität für das kolorektale Karzinom. Die klinischen Studien sollen ergänzt werden durch In-vitro-Experimente auf molekulargenetischer Ebene, um den Einfluss des VDR auf die Genexpression näher zu beschreiben. Zu diesem Zwecke

- wurden ausgewählte VDR-Polymorphismen bei 256 Kolonkarzinompatienten und 256 gesunden Kontrollen bestimmt und die Frequenzen der Genotypen und Haplotypen vergleichend statistisch analysiert.
- wurden wichtige Polymorphismen im Vitamin-D-Stoffwechsel an einem zweiten Kollektiv von über 900 Studienteilnehmern (Karzinompatienten + Kontrollen) bestimmt und eine umfassende Genotypen- und Haplotypenanalyse angeschlossen.
- wurde die Transkription ausgewählter Kandidatengene in VDR-exprimierenden menschlichen Kolonkarzinomzelllinien vor und nach VDR-vermittelter Differenzierung mittels relativer Quantifizierung (Real-time-PCR) gemessen.
- wurde der Einfluss von Vitamin D auf die Expression weiterer Kandidatengene mittels Affymetrix-Mikroarray untersucht.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Studienpopulationen

Nach den Vorgaben der UICC (Union International Centr  Le Cancer) wird das Stadium einer Krebserkrankung mit der TNM-Klassifikation erfasst, in die die Ausdehnung des Tumors (T), der Befall von Lymphknoten (N) und vorhandene Metastasen (M) einfließen. Die Klassifikation der kolorektalen Karzinome in Stadien erfolgt nach den Kriterien der Eindringtiefe des Tumors in die Darmwand, Anzahl der betroffenen Lymphknoten und Vorliegen von Fernmetastasen (Tab. 1).

**Tab. 1** Stadieneinteilung nach UICC (Staging)

Stadium	Primär-tumor	Befall regionärer Lymphknoten	Fern-metastasen	Ausdehnung des Tumors
0	Tis	nein	nein	Carcinoma in situ
Ia	T1	nein	nein	Tumor infiltriert Submucosa
Ib	T2	nein	nein	Tumor infiltriert Muscularis propria
IIa	T3	nein	nein	Tumor infiltriert Subserosa oder nicht peritonealisiertes angrenzendes Gewebe
IIb	T4	nein	nein	Tumor infiltriert direkt andere Organe oder perforiert viszerales Peritoneum
IIIa	Jedes T	1-3	nein	Tumor infiltriert Submucosa, Muscularis propria, Subserosa oder andere Organe
IIIb	Jedes T	4 und mehr	nein	Tumor infiltriert Submucosa, Muscularis propria, Subserosa oder andere Organe
IV	Jedes T	jeder	ja	Tumor infiltriert Submucosa, Muscularis propria, Subserosa oder andere Organe

Die Untersuchungen wurden an zwei Studienpopulationen durchgeführt (Tab. 2, 3). Das erste Kollektiv bestand aus 512 unverwandten Kaukasiern, die in fünf Krankenhäusern in Voronezh-Stadt und Umgebung (Russland, europäischer Teil) rekrutiert worden waren. Alle Studienteilnehmer wurden über die Inhalte und Ziele der Studie informiert und gaben ihr

schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde von der Zentralen Ethikkommission in Moskau genehmigt. 256 Patienten mit histologisch verifiziertem kolorektalem Karzinom (124 Männer und 132 Frauen, Altersverteilung 20-85 Jahre, MW 61,9 Jahre, SD +/- 10,0) und 256 Kontrollen, übereinstimmend in Alter und Geschlecht (125 Männer und 131 Frauen, Altersverteilung 30-85 Jahre, MW 62,3 Jahre, SD +/- 11,2), nahmen an der Studie teil. Die Tumorlokalisation und TNM-Klassifikation zeigt Tab. 2.

**Tab. 2** Tumorlokalisation und TNM-Klassifikation (UICC) bei 256 Darmkrebspatienten (Kollektiv I)

<b>Tumorlokalisation</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Caecum	12	4,7
Colon ascendens	9	3,5
Flexura hepatica	8	3,2
Colon transversum	6	2,4
Flexura lienalis	4	1,6
Colon descendens	10	3,9
Colon sigmoideum	46	18,1
Rectum	159	62,6
<b>Tumorstadium (pT)</b>		
pT1 Submucosa	14	5,5
pT2 Muscularis propria	20	7,8
pT3 Subserosa	165	64,7
pT4 Andere	56	22,0
<b>Lymphknotenmetastasen (pN)</b>		
pN0 Keine Metastasierung	190	78,8
pN1 1-3 Lymphknoten	47	19,5
pN2 $\geq 4$ Lymphknoten	4	1,7
<b>Fernmetastasen (pM)</b>		
pM0 Keine Fernmetastasen	226	89,3
pM1 Fernmetastasen	27	10,7

Das Kontrollkollektiv bestand aus Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen aus den Kliniken für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Chirurgie, Neurologie und Traumatologie.

Das zweite Kollektiv bestand aus 928 unverwandten Kaukasiern (625 Männer und 303 Frauen) aus drei deutschen Krankenhäusern. 452 Patienten mit kolorektalem Karzinom (281 Männer und 171 Frauen) und 508 Kontrollen (344 Männer und 132 Frauen) wurden in die Studie eingeschlossen. Die Fälle stammten aus dem Uniklinikum Magdeburg (Sachsen-Anhalt) und dem Carl-Thiem-Klinikum Cottbus (Brandenburg). Die Proben wurden im Zeitraum 01.12.1992 - 05.05.2004 gesammelt und von ETSI-med European Tumor Sample

Institute gGmbH i.Gr., Berlin-Hennigsdorf, zur Verfügung gestellt. Einen Überblick über Tumormerkmale und TNM-Klassifikation gibt Tab. 3.

**Tab. 3** Tumorlokalisation, Tumorhistologie und TNM-Klassifikation bei 452 Darmkrebspatienten (Kollektiv II)

<b>Tumorlokalisation</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Caecum	32	7,1
Colon ascendens	51	11,3
Colon transversum	26	5,8
Colon descendens	16	3,5
Colon sigmoideum	102	22,6
Rectum	214	47,3
Andere	11	2,4
<b>Tumorhistologie</b>		
Adenokarzinom	414	91,6
Muzinöses Adenokarzinom	28	6,2
Andere	10	2,2
<b>Differenzierungsgrad</b>		
Schlecht	78	17,2
Mäßig	330	73,0
Gut	31	6,9
Undifferenziert	13	2,9
<b>Tumorstadium (pT)</b>		
pT1 Submucosa	22	4,9
pT2 Muscularis propria	109	24,1
pT3 Subserosa	267	59,1
pT4 Andere Organe/Perforationen	54	11,9
<b>Lymphknotenmetastasen (pN)</b>		
pN0 keine Metastasierung	211	46,7
pN1 1-3 Lymphknoten	126	27,9
pN2 4 oder mehr Lymphknoten	102	22,5
Andere	13	2,9
<b>Fernmetastasen (pM)</b>		
pM0 Keine Fernmetastasen	346	76,6
pM1 Fernmetastasen	100	22,1
Andere	6	1,3

Das Kontrollkollektiv bestand aus Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen. Die Proben wurden vom Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin gesammelt. Alle Studienteilnehmer wurden über die Inhalte und Ziele der Studie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

### 2.1.2 Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Nr.</u>	<u>Herkunft</u>
Caco-2	ACC 169	DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,
SW480	ACC 313	Bereich Menschliche und Tierische Zellkulturen, Braunschweig

### 2.1.3 Geräte

<u>Typ</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
<b>Automatisierte Geräte</b>		
	GeneChip® Fluidics Station 450	Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA
	GeneChip® Scanner 3000 System	Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA
	LightCycler®	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
	MagNa Pure LC DNA Extraktor	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
<b>Fragmentlängenanalytoren</b>		
	ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
	ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
<b>Geräte für Elektrophorese</b>		
	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA
	Electrophoresis Power Supply EPS 600	Renner GmbH, Darmstadt
	MEPS 500/500	Renner GmbH, Darmstadt
	PHERO-Stab 500	Biotech-Fischer, Reiskirchen
	PowerPac 200	Bio Rad, München
	Protrans Kammern	Protrans, Ketsch
<b>Homogenisatoren</b>		
	Electronicrührer Maxi HP 1P Variomag	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
	Magnetrührer RCT basic	Ika Labortechnik, Staufen i. Brg.
	Schüttler Red Rocker	Hoefer Scientific Instruments, Holliston, MA, USA
	VF 2	Ika Labortechnik, Staufen i. Brg.
	Vortex Reax 2000	Heiddolph, Schwabach
<b>Inkubatoren</b>		
	APT Line	Biometra GmbH, Göttingen
	Function Line BB 16 CU	Heraeus Instruments, Hanau
	GeneChip® Hybridisierungsofen 640	Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA
	Hybridisierungsofen OV 11	Biometra GmbH, Göttingen
	OV3	Biometra GmbH, Göttingen

**Lichtmikroskope**

Leitz DM IL

Leica Camera Inc., Allendale, NJ, USA

Leitz DM RB

Leica Camera Inc., Allendale, NJ, USA

**Spektrophotometer**

BioPhotometer

Eppendorf, Westbury, NY, USA

NanoPhotometer™

Implen GmbH, München

**Sonstige Geräte**

Cryo 1C Kühlcontainer

Nalge Nunc Inc., Rochester, USA

Dampfsterilisator Varioklav 400

H+P Labortechnik, Oberschleißheim

Eagle Eye II (Digitales Videosystem)

Stratagene, La Jolla, CA, USA

Eismaschine AF 8

Scotsman, Vernon Hills, IL, USA

KNF Neuberger Membranpumpe

Uni Equip, Martinsried

Laminar-Flow-Box Hera Safe HS15

Heraeus-Christ, Hanau

Mikrowelle TDS

Samsung, Schwalbach

Nunc-Immuno™ Wash 8

Nunc GmbH, Langenselbold

pH-Meter CG840

Schott Geräte, Hofheim

Pipetten

Eppendorf, Finnpipetten Labsystems,  
Matrix Technologies

Schüttelwasserbad Red Rocker

Hoefer Scientific Instruments,  
Holliston, MA, USA

SpeedVac (Vakuum-  
Rotationsverdampfer)

Thermo Fisher Scientific Savant,  
Waltham, MA, USA

Stickstoff-Behälter RS750, 35LD

tec-lab, Königstein

Temperierbad GFL

Thermolab, Burgwedel

Thermomixer 5436

Eppendorf, Westbury, NY, USA

Trockenschrank WS50, WS200

MLW, Illmenau

UV-Lampe UVC 30

Kendro Laboratory Products, Hanau

UV-Lampe UV 2400 Stratalinker

Stratagene, La Jolla, CA, USA

Vakuumpumpe

Saskia Labortechnik GmbH, Illmenau

Vakuum Manifold

Millipore Corp., Billerica, MA, USA

**Thermocycler**

GeneAmp PCR System 9600

Applied Biosystems, Foster, CA, USA

GeneAmp PCR System 9700

Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA

Mastercycler Gradient

Eppendorf, Westbury, NY, USA

Primus 96 Plus

MWG Biotech, Ebersberg

**Waagen**

Analysenwaage MC1 Analytik

Sartorius, Göttingen

Owa Labor

Sartorius, Göttingen

**Zentrifugen**

5415C	Eppendorf, Westbury, NY, USA
GALAXY MINI C1213	VWR, Darmstadt
GS-6R	Beckman Coulter, München
LightCycler Carousel	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
Megafuge 1.0	Heraeus-Christ, Hanau

**2.1.4 Chemikalien**

**Typ    Substanz**

**Hersteller**

**Enzyme**

Biotherm™ DNA-Polymerase	Rapidozym, Berlin
ExoSAP-IT®	USB Corp. Cleveland, OH, USA
Protease	Qiagen Inc., Valencia, CA, USA
Restriktionsendonukleasen <i>MseI (Tru9I), FokI, Bpu10I (CDX-2)</i>	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Restriktionsendonukleasen <i>TaqI, MvaI269I (BsmI), BspI20I (ApaI)</i>	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
RNase-free DNase Set	Qiagen Inc., Valencia, CA, USA

**Expressionsanalyse**

AccuGENE 20X SSPE Puffer	Cambrex Inc., Charles City, IA, USA
Acetyliertes bovines Serumalbumin	Ambion Inc., Foster, CA, USA
Agilent RNA 600 Nano Kit	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA
Biotinyliertes Anti-Streptavidin	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
Destilliertes Wasser DNase-, RNase-frei	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA
GeneChip Expression 3' Amplification One Cycle Target Labeling and Control Reagents	Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA
GeneChip Human Genome U 133 Plus 2.0 HG-Array	Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA
Goat IgG-Reagent Grade	Sigma, Deisenhofen
Herring sperm DNA	Promega Corp., Madison, WI, USA
MES Monohydrat	Sigma, Deisenhofen
MES Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Oligo dT (12-18)	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA
Omniscript RT Kit	Qiagen Inc., Valencia, CA, USA
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen Inc., Valencia, CA, USA
QIAshredder	Qiagen Inc., Valencia, CA, USA

RNA 6000 Ladder	Ambion Inc., Foster, CA, USA
RNase AWAY®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RNase ZAP®	Ambion Inc., Foster, CA, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen Inc., Valencia, CA, USA
Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat	Mobitec Molecular Probes
Tween 20	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
UltraPure® DNase-, RNase-freies Wasser	Gibco, Rockville, MD, USA

### Fragmentlängenanalyse

Big Dye Terminator v1.1	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
BigDye Terminator Cycle Sequencing v2.0	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
GeneScan – 500 ROX Size Standard	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
HiDi™ Formamid	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
Polymer POP-4, POP-7	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
Sephadex G-50 Superfine	Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA
Sequenzierungspuffer	Applied Biosystems, Foster, CA, USA

### Gelelektrophorese

Agarose Molecular Biology Grade	Eurogentec Inc., San Diego, CA, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Ficoll Typ 40C	AppliChem, Darmstadt
GeneRuler™ (50 bp, 100 bp, 1 kb DNA-Längenstandard)	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Nusieve® GTG® Agarose	Cambrex Inc., Charles City, IA, USA
Qualex® Gold Agarose	Hybaid GmbH, Garching
SYBR® GOLD	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA

### PCR

10X BioTherm Puffer/10 (GeneCraft 5 U/L)	Rapidozym, Berlin
Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP = dNTPs)	Rapidozym, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	Rapidozym, Berlin
Oligonukleotid-Primer (10 nM)	Tib Molbiol, Berlin

### Zellkultur und RT-PCR

Dulbecco's MEM (1X)	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Low Glucose (1 g/l) mit L-Glutamin	
Dulbecco's PBS (1X) (ohne Ca und Mg)	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA
Wasser (steril für Zellkultur)	PAA GmbH, Pasching, Österreich
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin

Viralex Trypsin-EDTA (10X)	PAA GmbH, Pasching, Österreich
1 $\alpha$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (Vitamin D, Calcitriol)	Merck, Darmstadt
All-trans-Retinsäure (ATRA)	Merck, Darmstadt
Natriumbutyrat (NaB)	Sigma, Deisenhofen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Cell Lifter	Corning Costar, Cambridge, MA, USA
Cell Scraper Costar	Corning Costar, Cambridge, MA, USA

### SNPlex

10X Laufpuffer mit EDTA	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
SNPlex™ System Amplifikation-Kit	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
SNPlex™ System Assay Kontroll-Kit	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
SNPlex™ System gDNA Platten-Kit	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
SNPlex™ System Genotyping Core Reagenzien Kit, 48-plex	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
SNPlex™ System Hybridisierungsbindungspuffer	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
SNPlex™ System Hybridisierungswaschpuffer (10X)	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
SNPlex™ System Kontroll-Pool-Kit	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
SNPlex™ System Ligationssonden	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
SNPlex™ System Oligonukleotid-Ligation-Kit	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
SNPlex™ System Purifikation-Kit	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
SNPlex™ System Standard-Kit, 48-plex	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
SNPlex™ System ZipChute™ Dilution-Puffer	Applied Biosystems, Foster, CA, USA
SNPlex™ System ZipChute™ Kit, 48-plex	Applied Biosystems, Foster, CA, USA

### Sonstige Chemikalien

Borsäure	Merck, Darmstadt
CO <sub>2</sub> technisch	Linde AG, München
Desi-1000® Breitband-Sprühdesinfektion	tec-lab, Königstein
EDTA 0,5 M, pH 8,0	Ambion Inc., Foster, CA, USA
EDTA (Titriplex®)	Merck, Darmstadt
Essigsäure 96% (Rotipuran®)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol 96%	VWR, Darmstadt
Ethanol 99,8% p.a. (Rotipuran®)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol vergällt (Rotisol®)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HCl 1 N	Merck, Darmstadt
Lysetol AP	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt



MagNa Pure LC DNA Isolation Kit I	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
N <sub>2</sub> technisch	Linde AG, München
NaCl 5M	Ambion Inc., Foster, CA, USA
NaOAc	Atria Genetic, San Francisco, CA, USA
NaOH 0,1 N	Merck, Darmstadt
QIAamp DNA Blood Kit	Qiagen Inc., Valencia, CA, USA
TrisHCl 800 mM, pH 9,0	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt

### 2.1.5 Lösungen

<u>Lösung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
2X Färbepuffer	41,7 ml 12X MES Stock-Puffer, 92,5 ml 5 M NaCl, 2,5 ml 10% Tween-20, 113,3 ml dH <sub>2</sub> O
Gelelektrophorese-Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau, 15% Ficoll Typ 40C in 1X TBE-Puffer
2X Hybridisierungspuffer	8,3 ml 12X MES Stock, 17,7 ml 5 M NaCl, 4 ml 0,5 M EDTA, 0,1 ml 10% Tween-20, 19,9 ml H <sub>2</sub> O
12X MES Stock-Puffer	70,4 g MES Monohydrat, 19,3 g MES-Natriumsalz, 800 ml H <sub>2</sub> O
Waschpuffer A	300 ml 20X SSPE, 1 ml 10% Tween-20, 699 ml dH <sub>2</sub> O
Waschpuffer B	83,3 ml 12X MES Stock-Puffer, 5,2 ml 5 M NaCl, 1 ml 10% Tween-20, 910,5 ml dH <sub>2</sub> O
1X TBE-Puffer	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA; pH 8,0-8,3
1X TE-Puffer	10 mM TrisHCl (pH 8,0), 1 mM EDTA

### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

- Sterile Filtereinheit Sterivex-GV 0,22 µm, Multiscreen Manu 030 PCR (PCR-Produkt-Aufreinigung), Multi Screen HV 045 (Big-Dye Terminator-Überschuß Abtrennung) (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)
- Sterile Filtereinheit Nalgene® MF75TM Supor® machV mit PES Membran 0,2 µm (Nalge Nunc Inc., Rochester, USA)
- Uvette 220-1600 nM, RNase-, DNase-frei (Eppendorf, Westbury, NY, USA)
- LightCycler-Kapillaren 20 µl (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz)
- 96er PCR-Platten mit Verschlüssen (Thermofast, Abgene Inc., Surrey, UK)

- Sterile Kulturplatten, sterile Einmalpipetten, Falcon-Röhrchen, Rundbodenröhrchen (Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Pasteurpipetten (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Cryoröhrchen (Greiner, Nürtingen)
- Sterile Zellkulturschalen (TPP, Trasadingen, Schweiz)
- Reaktionsgefäße, sterile Filterspitzen (Applied Biosystems, Foster, CA, USA; Eppendorf, Westbury, NY, USA; Kisker GbR, Steinfurt; Carl Roth GmbH, Karlsruhe; VWR, Darmstadt, Biozym Diagnostics, Oldendorf; Sarstedt, Nümbrecht)
- SNPlex-Hybridisierungsplatten, Septa, Trays, Kapillar-Arrays (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)
- Tough Spots, PCR-Folie, Alufolie, Skalpelle, Einmalhandschuhe

Wird nicht explizit auf eine bestimmte Temperatur verwiesen, erfolgte das Arbeiten bei Raumtemperatur (RT).

## **2.2 Genpolymorphismen**

### **2.2.1 Extraktion genomischer DNA**

#### **Vollautomatische DNA-Extraktion aus Vollblut**

Die DNA-Extraktion erfolgte automatisiert aus 200 µl Vollblut mit dem DNA-Extraktor MagNA Pure LC im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Der Automat wird mit den für die Anzahl der zu isolierenden Proben berechneten Einmalverbrauchsmaterialien beladen und die Volumina der Reagenzien vorgelegt. Die Isolation erfolgte mit dem MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Stand Juli 2004, <https://www.roche-applied-science.com/pack-insert/3003990a.pdf>). Zunächst wurde Lysepuffer zum Blut zugegeben. Dieser enthält ein hochkonzentriertes chaotropes Salz, welches die Blutzellen vollständig lysiert, die im Blut enthaltenen Proteine denaturiert und dadurch die DNA freisetzt. Durch Zugabe von Proteinase K erfolgt die Verdauung der Proteine. Die DNA bindet danach an der siliziumhaltigen Oberfläche von magnetischen Glaspartikeln. Daran schließen sich mehrere Waschschriffe mit Waschpuffer I und II an, um ungebundene Substanzen wie Proteine, Salze, Zellreste und PCR-Inhibitoren zu entfernen und die Konzentration des chaotropen Salzes zu verringern. Schließlich wird die gereinigte DNA im Elutionspuffer gelöst. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgt bei 4°C.

### **Phenol-Chloroform-DNA-Isolierung aus Leukozyten**

Das Blut wurde in EDTA-Röhrchen gesammelt. Die Zellpellets wurden im Institut für Klinische Pharmakologie (Medical Burdenko Academy, Voroneszh, Russland) isoliert und bei -20°C gelagert. Die DNA wurde dann am Institut für Klinische Pharmakologie (Charité – Universitätsmedizin Berlin) mittels Phenol/Chloroform aus Leukozyten extrahiert (Sambrook et al., 1989), in 1X TE-Puffer aufgenommen, auf 40 ng/µl eingestellt und bei 4°C gelagert.

### **Manuelle Qiagen-DNA-Isolierung aus Tumorzellverbänden und Vollblut**

Zur manuellen Isolierung von DNA aus empfindlichem Material, Zellsuspensionen und inhomogenen Tumorzellproben wurde mit QIAamp DNA Blood Mini Kit gearbeitet. Alle Proben und Lösungen wurden auf RT gebracht. Zunächst wurde nach Zentrifugation der Zellsuspension das DMSO durch PBS ersetzt. 100 µl Probenmaterial wurden dann mit 100 µl PBS versetzt, homogenisiert und die Zellen mit 20 µl Protease aufgeschlossen. Die weitere Durchführung erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Stand Januar 1999, <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000190>). Nach Zugabe von Puffer AL wurde für 10 min bei 56°C inkubiert. Die DNA wurde in 60 µl Puffer AE eluiert.

#### **2.2.2 DNA-Quantifizierung**

Die DNA-Konzentration wurde über die Bestimmung der Absorption mittels UV/VIS-BioPhotometer ermittelt. Nukleinsäuren besitzen bei 260 nm ein Absorptionsmaximum. Verunreinigung durch Proteine oder Kohlenhydrate lassen sich durch hohe Absorptionen bei 280 nm oder 230 nm identifizieren. Das angestrebte 260/280 Verhältnis liegt zwischen 1,8 und 2,0. Die Messung der optische Dichte (OD) erfolgte gegen einen Blindwert, d.h gegen das entsprechende Elutionsmittel der DNA-Isolierung (MagNAPure-Puffer, TE-Puffer, Qiagen Puffer AE). Wenn notwendig wurde die DNA verdünnt oder mittels Rotationsverdampfer eingengt.

#### **2.2.3 Genotypisierung mittels PCR und Restriktionsverdau (PCR-RFLP)**

Die Bestimmung der VDR-Polymorphismen erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)-Analyse. Spezifische Primer für die Polymorphismen CDX-2 (Flügge et al., 2007), FokI (Langdahl et al., 2000; Grau et al., 2003), BsmI (Douroudis et al., 2003), Tru9I (Gyorffy et al., 2002), ApaI

(Douroudis et al., 2003), TaqI (Douroudis et al., 2003) wurden ausgewählt und validiert. Die untersuchten VDR-Polymorphismen sind historisch bedingt nach ihrem entsprechenden Restriktionsenzym benannt (Tab. 4).

**Tab. 4** Nomenklatur der untersuchten Vitamin-D-Rezeptor-Polymorphismen

SNP	Lokalisation	Position	NCBI-Nr.	Basenwechsel
CDX-2	Intron 1e	23005	rs2238136	G/A
FokI	Exon 2	27823	rs2228570	C/T
BsmI	Intron 8	60890	rs1544410	G/A
Tru9I	Intron 8	61050	rs757343	G/A
ApaI	Intron 8	61888	rs7975232	G/T
TaqI	Exon 9	61968	rs731236	T/C

Position in Basenpaaren, NCBI offizielle Nomenklatur, Basenwechsel für Major-Allel/Minor-Allel, Referenzsequenz AY342401, GI 32891816

Während der PCR/RFLP wurde mit einem Gesamtvolumen von 40 µl und 2 ng/µl DNA gearbeitet. Die Amplifizierung erfolgte unter folgenden PCR-Bedingungen: 2 min 94°C, 35 Zyklen mit 40 sec 94°C, 40 sec 61°C bis 67°C (Tab. 5) und 2 min 72°C, und schließlich 3 min 72°C. Die PCR-Produkte wurden dann mit dem jeweiligen Restriktionsenzym verdaut (Tab. 5).

**Tab. 5** PCR-RFLP-Bedingungen zur Genotypisierung von Vitamin-D-Rezeptor-Polymorphismen und Identifikation der Varianten mittels Restriktionsendonukleasen

SNP	Primersequenzen vorwärts (F) / rückwärts (R)	Annealing- Temperatur	Fragment- länge (bp)	Restriktions- endonuklease	Referenz
CDX-2	5'-cag cat gcc tgt cct cag c-3' (F) 5'-tgc aga cct ctg tct tcc agt g-3' (R)	61°C	250	Bpu10I	-
FokI	5'-act ctg gct ctg acc gtg-3' (F) 5'-atg gaa aca cct tgc ttc tcc ctc-3' (R)	61°C	250	FokI	Langdahl et al. (2000)
BsmI	5'-caa cca aga cta caa gta ccg cgt cag tga-3' (F) 5'-cac ttc gag cac aag ggg cgt tag c-3' (R)	67°C	1932	Mva 1269I	Douroudis et al. (2003)
Tru9I	5'-tga ggt ttc ttg cgg gca ggg ta-3' (F) 5'-cag ggc cgc ccc tct ttg ga-3' (R)	61°C	212	MseI	Gyorffy et al. (2002)
ApaI	5'-caa cca aga cta caa gta ccg cgt cag tga-3' (F) 5'-cac ttc gag cac aag ggg cgt tag c-3' (R)	67°C	1932	Bsp120I	Douroudis et al. (2003)
TaqI	5'-caa cca aga cta caa gta ccg cgt cag tga-3' (F) 5'-cac ttc gag cac aag ggg cgt tag c-3' (R)	67°C	1932	TaqI	Douroudis et al. (2003)

bp Basenpaare, Referenzsequenz AY342401, Acc.No. 32891816

Entsprechende Kontrollen wurden bei allen Experimenten mitgeführt und die Experimente nach dem Zufallsprinzip wiederholt. Die Anwesenheit oder das Fehlen der Restriktionsstelle wurde nach Agarose-Gel-Elektrophorese mit SYBR® Gold-Färbung visualisiert (25 µl SYBR® GOLD in 500 ml 1X TBE-Puffer).

Mit der Methode der Polymerasekettenreaktion ist es möglich, spezifische DNA-Sequenzen exponentiell zu vervielfältigen. Das Prinzip dieser Vervielfältigung ist die wiederholte Synthese der jeweiligen DNA-Sequenz und beruht auf der Fähigkeit der Taq-Polymerase, DNA-Einzelstränge zu synthetisieren. Die Spezifität wird durch den Einsatz von 2 Oligonukleotiden (Primer) erzielt, die der Taq-Polymerase als Startpunkte dienen. Die Primer-Oligonukleotide (5 nmol/l) wurden HPLC-gereinigt und lyophilisiert (TibMolbiol) und mit 500 µl H<sub>2</sub>O auf eine Endkonzentration von 10 pmol/µl verdünnt. Die PCR wurde nach folgendem Protokoll angesetzt und im Thermocycler inkubiert.

#### Reaktionsansatz für PCR

<i>Reagenz</i>	<i>µl</i>	<i>Endkonzentration</i>
DNA (40 ng)	2,0	2 ng/µl
Biotherm-Puffer	4,0	1X
dNTPs	1,0	50 µmol/l
Primer F (vorwärts)	0,5	0,125 µmol/l
Primer R (rückwärts)	0,5	0,125 µmol/l
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,8 bis 1,4	1,00 to 1,75 mmol/l
Biotherm Taq-Polymerase	0,2	0,025 U/µl
H <sub>2</sub> O	30,4 bis 31,0	-
Ansatzvolumen	40,0	

#### Temperaturprogramm für PCR

<i>Programmfunktion</i>	<i>Temperatur (°C)</i>	<i>Zeit (min:sec)</i>
Initiale Denaturierung	94	02:00
35 Zyklen - Denaturierung	94	00:40
- Annealing	61 bis 67 (Tab. 5)	00:40
- Extension	72	02:00
Finale Extension	72	03:00

Zur Kontrolle des PCR-Ergebnisses wurden je Probe 5 µl des Amplifikats mit 10 µl Ladepuffer auf ein entsprechend konzentriertes Agarosegel (Tab. 6) aufgetragen und in 250 ml TBE-Puffer elektrophoretisch bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt. Als

Vergleich dienten 2,5 µl des 50-bp- oder 1-kb-DNA-Längenstandards. Nach Ablauf der Elektrophorese erfolgte die Anfärbung der DNA-Fragmente für 1-2 Stunden im Färbepad (25 µl SYBR® GOLD auf 500 ml TBE-Puffer). Anschließend wurde das Gel im Bildverarbeitungssystem Eagle Eye unter UV-Licht fotografiert, wobei SYBR® GOLD als fluoreszierender Farbstoff zur Sichtbarmachung der DNA-Banden diente.

Die PCR/RFLP-Methode basiert auf einer Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse. Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, Doppelstrang-DNA an definierten Stellen zu schneiden. Die Schnittstelle ist für jedes Enzym spezifisch und wird von ihm an der Abfolge ganz bestimmter Basenpaarungen erkannt. Treten durch Punktmutationen Änderungen in der Nukleotidabfolge auf, gehen Schnittstellen verloren oder es treten neue Schnittstellen auf. Anhand der entstehenden unterschiedlichen Fragmentlängen können so Punktmutationen identifiziert werden. Die Enzyme werden dabei so gewählt, dass sie an der zu untersuchenden Mutationsposition schneiden. Zur Identifikation der Mutationen des VDR-Gens kamen verschiedene Restriktionsendonukleasen zum Einsatz. Als Ausgangsmaterial diente das jeweilige PCR-Produkt (Tab. 6).

**Tab. 6** Reaktionsansatz für Restriktionsverdau

	SNP					
	CDX-2	FokI	BsmI	Tru9I	Apal	TaqI
<b>Restriktion</b>						
Enzym	Bpu10I	FokI	Mva 1269I	MseI	Bsp120I	TaqI
Ausgangskonzentration (U/µl)	5	4	10	10	10	20
Konzentration im Ansatz (U/µl)	0,11	0,10	0,21	0,17	0,14	0,29
Temperatur (°C)	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C	65°C
<b>Reaktionsansatz</b>						
Enzymmenge (µl)	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
Puffer (µl)	1,5	1,7	1,5	1,5	1,5	1,5
BSA (µl)	-	-	-	0,05	-	-
Aqua dest. (µl)	3,2	3,0	3,2	3,25	3,3	3,3
PCR-Produkt (µl)	9	7	9	7	9	9
Gesamtvolumen	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>14</b>
<b>Elektrophorese</b>						
Agarose-Gel (%)	2,5	2,5	1,5	2,5	1,5	1,5
Zeit (min)	45	45	60	45	60	60

Der Verdau wurde in 96er PCR-Platten angesetzt. Zu 5 µl Enzym-Mastermix (bestehend aus Enzym, zugehörigem Puffer und Aqua dest.) wurden 5 µl des jeweiligen PCR-Produkts gegeben. Dieser Ansatz wurde dann für 16 Stunden (über Nacht) bei der für das jeweilige Enzym geeigneten Temperatur inkubiert. Anschließend wurde das gesamte verdaute Produkt mit jeweils 10 µl Ladepuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Als Vergleich dienten 2,5 µl des 50-bp- oder 1-kb-DNA-Längenstandards. Nach Ablauf der Elektrophorese erfolgte die Anfärbung der DNA-Fragmente für 1-2 Stunden im Färbegrad (25 µl SYBR® Gold auf 500 ml TBE-Puffer). Anschließend wurde das Gel im Bildverarbeitungssystem Eagle Eye unter UV-Licht fotografiert.

#### **2.2.4 Fragmentlängenanalyse mittels Genescan® und Sequenzierung**

Die Differenz in Basenpaaren zwischen zwei Allelen des VDR-poly(A)-Polymorphismus (Abb. 7, rs17878969) wurde mittels GeneScan®-Fragmentlängen-Analyse bestimmt. Anschließend wurde die Anzahl der Repeats (gleichlautende aufeinanderfolgende Basen) der homozygoten Varianten durch Sanger-Sequenzierung ermittelt. Die Primer wurden mit der Software Primer Designer® ausgewählt. Gemäß Ingles et al. (1997) werden Allele mit 18 oder mehr Basenwiederholungen als lange Variante (L, Major-Allel) und Allele mit weniger als 18 A-Repeats als kurze Variante (S, Minor-Allel) bezeichnet.

#### **Grundlagen und Durchführung**

Die Sequenzierung ist eine Methode, mit der die lineare Abfolge der Nukleotide eines DNA-Einzelstranges ermittelt werden kann. Die hier verwendete Methode nach Sanger basiert auf dem Prinzip des Kettenabbruchs. Dabei enthält der Sequenzieransatz neben den üblichen 2'-Deoxynukleotiden auch eine kleine definierte Menge an farbstoffmarkierten 2',3'-Dideoxynukleotiden (ddNTPs, Dye-Terminatoren), denen die reaktive OH-Gruppe in 3'-Position fehlt, sodass dort, wo ein Dye-Terminator in den neu entstehenden Strang eingebaut wird, ein Kettenabbruch resultiert. Der Einbau der farbstoffmarkierten ddNTPs erfolgt zufällig. Die DNA-Vorlage wird somit in sämtlichen möglichen Längen, von einem Nukleotid bis zu ihrer Gesamtlänge, repliziert. Diese Fragmente können entsprechend ihrer Länge in Sequenziergeräten elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert werden. Da jede Base ihre eigene Farbe hat, lässt sich Anhand von Länge und Farbe die Abfolge der Basenpaare ermitteln.

Als Ausgangsmaterial diente das jeweilige PCR-Produkt. Da dieses noch Reste an Primern, dNTPs, Biotherm-Puffer etc. enthält, muss es vor der eigentlichen Sequenzierreaktion gereinigt werden. Dazu wurden jeweils 60 µl PCR-Produkt in eine 96er Millipore-Multiscreen-PCR-Platte (MANU 30 PCR) gegeben. Diese bestand am Boden aus einer semipermeablen Membran, über der der Überstand mittels Vakuum abgesaugt wurde und das PCR-Produkt zurückblieb. Anschließend wurden 200 µl Aqua dest. zugegeben und wiederum abgesaugt. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt.

Das gereinigte PCR-Produkt konnte dann in 30 µl Aqua dest. aufgenommen und in die Endproduktplatte überführt werden. Zur Kontrolle, ob nach der Reinigung noch genügend PCR-Produkt zurückgeblieben ist, wurden analog zur PCR-Kontrolle jeweils 5 µl gelelektrophoretisch untersucht.

Anschließend erfolgte die eigentliche Sequenzierreaktion. Da die Anlagerung der farbstoffmarkierten ddNTPs nur jeweils an einen der beiden DNA-Stränge erfolgen sollte, waren pro zu sequenzierendem Fragment 2 Ansätze mit nur je einem Primer notwendig, für den Vorwärtsstrang mit dem 5'-Primer und für den Rückwärtsstrang mit dem 3'-Primer. Zu 6 µl Sequenzieransatz wurden 4 µl gereinigtes PCR-Produkt gegeben. Im Cyclyer erfolgte dann die Farbstoff-Anlagerung.

Das Aufreinigen des Sequenzierproduktes erfolgte mittels Sephadex. Dazu wurde Sephadex G 50 auf eine 96er Millipore-Platte (MAHV N45) gegeben und der Überschuss abgestreift. Nach Zugabe von 300 µl Aqua dest. wurde das entstehende Gel zum Quellen für 3 Stunden bei Zimmertemperatur gelagert.

Nachdem sich die Gelsäulen ausgebildet hatten, wurde die Sephadex-Platte 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde jeweils 150 µl Aqua dest. zugegeben und wiederum 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde noch einmal wiederholt. Jetzt konnten die Sequenzierprodukte ad 40 µl mit Aqua dest. aufgefüllt und in die Mitte der Sephadex-Säulen überführt werden. Zum Auffangen der gereinigten Sequenzierprodukte wurde unter die Sephadex-Platte eine PCR-Platte für Endprodukte gestellt. Nach erneuter 5-minütiger Zentrifugation bei 1500 rpm konnte das Filtrat mit Rahmen und Septen versehen und im Sequenzer analysiert werden.



### **Sequenzierung des poly(A)-Mikrosatelliten**

Um die Sequenz der homozygoten Proben zu analysieren, wurde mit 4 µl des anfänglichen 413-bp Fragments (I) ein weiteres 121-bp Nested-PCR-Produkt (III) mit den Primern 5'-GAG ACC AAC CTG ACC A-3' (vorwärts) und 5'-CCT CAG CCT CCT GAG T-3' (rückwärts) bei einer Annealing-Temperatur von 58°C hergestellt. Die PCR-Bedingungen waren: 2 min 94°C, 20 Zyklen mit 40 sec 94°C, 40 sec 58°C und 2 min 72°C, und schließlich 3 min 72°C. Nachfolgende Schritte waren: Entfernung überschüssiger Primer und dNTPs durch Reinigung des Amplifikates mit 96er Millipore-Multiscreen-PCR-Platten, Kontrolle des PCR-Produktes mit Agarose-Gelelektrophorese (2,5%), Durchführung einer Sequenzier-Reaktion für jeden einzelnen Primer mit BigDye Terminatoren v3.0 entsprechend den Anweisungen des Herstellers als Two-Step-PCR mit 2 min 94°C, 25 Zyklen mit 15 sec 96°C und 4 min 58°C, Beseitigung von ungebundenen Dye-Terminatoren mit Sephadex G50 in 96er Filterplatten. 40 µl des gefilterten Produktes wurden dann mit Sanger-Sequenzierung auf einem ABI Prism<sup>TM</sup> 310 Genetic Analyzer mit 22 min Laufzeit, 27 sec Injektionszeit und dem Modul SeqPOP4(1ml)E aufgetrennt. Die erhaltenen Rohdaten der Sequenzierung wurden mit den Programmen Chromas 2.22 und BioEdit 7.0.1 ausgewertet.

### **GeneScan des poly(A)-Mikrosatelliten**

Die GeneScan®-Analyse wurde mit einem 413-bp PCR-Fragment (I) aus den Primern 5'-GAC AGA GGA GGG CGT GAC TC-3' (vorwärts) und 5'-GTG TAG TGA AAA GGA CAC CGG A-3' (rückwärts) und einer Annealing-Temperatur von 66°C begonnen. Die PCR/RFLP wurde in einem Gesamtvolumen von 40 µl mit 1x Biotherm-Puffer, 50 µmol/l dNTPs, 1,75 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0,025 U/µl Biotherm Polymerase, 0,125 µmol/l Primer und 2 ng/µl der zu untersuchenden DNA angesetzt. Die Amplifizierung erfolgte unter folgenden PCR-Bedingungen: 2 min 94°C, 30 Zyklen mit 40 sec 94°C, 40 sec 66°C und 2 min 72°C, und schließlich 3 min 72°C. Um zwangsläufig auftretende Stotterbanden zu minimieren, wurde eine Nested-PCR (II) mit einem 5:1-Verhältnis der Primerkonzentrationen etabliert. Diese Reaktion wurde mit einem mutierten Vorwärts-Primer 5'-AAA GAG ACC AAC CTG ACC A-3' und einem fluoreszierenden Amidit-Matrix-Rückwärts-Primer 5'-FAM-CCT CAG CCT CCT GAG T-3' bei einer Annealing-Temperatur von 58°C durchgeführt. Es entstanden 115/116/120/121/122/123-bp Fragmente, die jeweils 14/15/19/20/21/22 A-Wiederholungen entsprechen. Die Amplifizierung erfolgte unter

folgenden PCR-Bedingungen: 2 min 94°C, 14 Zyklen mit 40 sec 94°C, 40 sec 58°C und 2 min 72°C, und schließlich 3 min 72°C. Das Nested-PCR-Produkt wurde mit Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Eine 1:50 Verdünnung des Nested-PCR-Produktes wurden mit 0,5 µl internem Größenstandard GeneScan™-500 ROX™ versetzt. GeneScan™-500 ROX™ eignet sich zur Detektion einzelsträngiger DNA-Fragmente im Bereich von 35 bis 500 bp, wobei sich 16 Fragmente (35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490, 500) ergeben. Der Gesamtansatz wurde 5 min bei 95°C denaturiert und dann auf einem ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer aufgetrennt. Die Parameter waren: 25 min Laufzeit, 5 sec Injektionszeit, Modul GS STR POP4 D bei einer Temperatur von 60°C. Die Analyse-Parameter wurden auf die ersten erhaltenen Template-Peaks adjustiert. Die Rohdaten wurden danach mit der Software GeneScan® Analysis 3.7 verarbeitet. Homozygote Proben wiesen einen Maximum-Peak auf, während sich die Signale von heterozygoten Individuen in zwei Banden mit einem Hauptpeak für jedes Allel, separiert durch eine reproduzierbare Distanz, aufspalteten. Die Ergebnisse wurden mit Standards verglichen und die Experimente wurden randomisiert wiederholt.

### 2.2.5 Multiplex-Analyse (SNPlex) zur Bestimmung von Polymorphismen von Genen des Vitamin-D-Metabolismus

Die Bestimmung von 10 ausgewählten Polymorphismen der Vitamin-D-regulierenden Gene CYP27B1, CYP27A1 und CYP24A1 erfolgte mittels SNPlex™-Technologie und Sequenzierung. Die Charakterisierung der untersuchten Varianten ist in Tab. 7 dargestellt.

**Tab. 7** Genotypisierung von CYP27B1-, CYP27A1- und CYP24A1-Polymorphismen mittels SNPlex und Sequenzanalyse

<i>Gen</i>	<i>NCBI Gen- Nummer</i>	<i>SNP</i>	<i>rs-Nummer</i>	<i>Lokali- sation</i>	<i>Basen- wechsel</i>
CYP27B1 (25-Hydroxyvitamin-D <sub>3</sub> - 1-alpha-hydroxylase)	NM_000785 12q13	_-1260 <sup>a</sup>	rs10877012	Promotor	[G/T]
		_-1077 <sup>a</sup>	rs3782130	Promotor	[C/G]
		_+2838 <sup>a</sup>	rs4646536	Intron 6	[T/C]
CYP27A1 (Vitamin- D <sub>3</sub> -25- hydroxylase)	NM_000784 2q33	_I1_200	rs4674338	Intron 1	[G/A]
		_I1_500	rs11677711	Intron 1	[G/T]
		_I1_628	rs4674345	Intron 1	[G/A]
		_I2_540	rs6709815	Intron 2	[G/T]
CYP24A1 (Vitamin- D <sub>3</sub> -24- hydroxylase )	NM_000782 20q13	_I2_352	rs17219315	Intron 2	[A/G]
		_I2_400	rs2762942	Intron 2	[A/G]
		_E4_400	rs2296241	Exon 4	[A/G]

<sup>a</sup>Sequenzierung; <sup>b</sup> offizielle Nomenklatur, Referenzsequenz; <sup>c</sup> [Major-Allel / Minor-Allel]

Die im Folgenden beschriebenen Sequenzierungen der CYP27B1-Polymorphismen wurden mit von mir validierten Primern von der CENiMED GmbH durchgeführt. Die Messung der Proben mittels SNPlex-Analyse und die Erhebung der Rohdaten erfolgte durch die CENiMED GmbH in Berlin-Buch unter meiner Mitarbeit.

### CYP27B1-Sequenzierung

Die Polymorphismen +2838, -1260, -1077 des CYP27B1-Gens wurden durch Sanger-Sequenzierung ermittelt. Spezifische Primer wurden dafür ausgewählt und validiert. Die Bedingungen sind in Tab. 8 dargestellt.

**Tab. 8** Sequenzierung der CYP27B1-Polymorphismen -1260, -1077 und +2838

<i>rs-Nummer</i>	<i>SNP</i>	<i>Basenwechsel</i>	<i>Primersequenzen vorwärts (F) / rückwärts (R)</i>	<i>Annealing-Temperatur</i>	<i>Fragmentlänge (bp)</i>
rs10877012	-1260	[G/T]	5'- gct gac tgc gtc tcc tct g -3' (F) 5'- gtg ttc cct aag tgt tgt ctc-3' (R)	63°C	666
rs3782130	-1077	[G/C]	5'- gct gac tgc gtc tcc tct g -3' (F) 5'- gtg ttc cct aag tgt tgt ctc-3' (R)	63°C	666
rs4646536	+2838	[C/T]	5'- tgg atg gaa gca ggg aga ta -3' (F) 5'- gcc caa gat agt gag gaa tg -3' (R)	63°C	271

Referenzsequenz NM\_000785, AY288916, GI 30527185

Die initiale PCR wurde nach folgendem Protokoll angesetzt und im Thermocycler inkubiert.

### Reaktionsansatz für PCR

<i>Reagenz</i>	<i>µl</i>	<i>Endkonzentration</i>
DNA (30 ng/µl)	1,5	1,43 ng/µl
Biotherm-Puffer	3,0	1X
dNTPs	1,5	0,1 mM
Primer F (vorwärts)	0,5	0,17 µM
Primer R (rückwärts)	0,5	0,17 µM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,2	2 mM
Biotherm Taq-Polymerase	0,2	1 U/µl
H <sub>2</sub> O	23,1	-
Ansatzvolumen	31,5	

## Temperaturprogramm für PCR

<i>Programmfunktion</i>	<i>Temperatur (°C)</i>	<i>Zeit (min:sec)</i>
Initiale Denaturierung	94	02:00
35 Zyklen - Denaturierung	94	00:40
- Annealing	63	00:40
- Extension	72	02:00
Finale Extension	72	05:00

Zur Kontrolle des PCR-Ergebnisses wurden je Probe 12 µl des Amplifikats mit 2 µl Ladepuffer auf ein 2,5 %iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch bei 118 V 50 min aufgetrennt. Als Vergleich dienten 3 µl des 100-bp-DNA-Längenstandards. Nach Ablauf der Elektrophorese erfolgte die Anfärbung der DNA-Fragmente für 1-2 Stunden im SYBR® GOLD-Färbebad.

Zur Reinigung der PCR-Produkte wurden nun überschüssige Primer und Nukleotide mit ExoSAP-IT® entsprechend der Packungsbeilage des Herstellers (Stand 08/2005, [http://www.usbweb.com/brief\\_proto/78200b.pdf](http://www.usbweb.com/brief_proto/78200b.pdf)) entfernt. Dabei dephosphoryliert die SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Tiefseegarnele, *Pandalus borealis*) die Nukleotide aus dem PCR-Ansatz, sodass diese nicht mehr aktiv sind. Das Enzym Exonuklease I zerstört alle einzelsträngigen Oligonukleotide, sodass die PCR-Primer abgebaut werden. Diese enzymatische Aufreinigung erfolgte für 15 min bei 37°C, die Hitzeinaktivierung des Enzyms für 15 min bei 80°C.

Die Sequenzierreaktion wird einzeln für jeden der verwendeten Primer (Vorwärts-/Rückwärts-Sequenzierung) nach folgendem Protokoll angesetzt und im Thermocycler inkubiert.

## Reaktionsansatz für PCR

<i>Reagenz</i>	<i>µl</i>	<i>Endkonzentration</i>
Gereinigtes PCR-Produkt	2,0	-
Sequenzierungspuffer	1,7	5X
Primer (vorwärts/rückwärts)	0,4	10 µM
Big Dye Terminator v1.1	0,7	-
H <sub>2</sub> O	5,2	-
Ansatzvolumen	10,0	

## Temperaturprogramm für PCR

<i>Programmfunktion</i>	<i>Temperatur (°C)</i>	<i>Zeit (min:sec)</i>
Initiale Denaturierung	96	01:00
25 Zyklen - Denaturierung	96	00:10
- Annealing	50	00:05
- Extension	60	04:00

Das Sequenzierprodukt wurde anschließend mittels Ethanolpräzipitation folgendermaßen aufgereinigt: In jede Vertiefung wurden 2 µl NaOAc/EDTA-Puffer gegeben, kurz zentrifugiert, 25 µl 96%iges EtOH hinzugegeben, durchmischt, 30 min bei 3000 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt, 15 sec bei 70 x g zentrifugiert, 50 µl 70%iges EtOH hinzugegeben, 5 min bei 3000 x g zentrifugiert, erneut der Überstand entfernt, 15 sec bei 70 x g zentrifugiert, 50 µl 70%iges EtOH hinzugegeben, 5 min bei 3000 x g zentrifugiert und den der Überstand erneut entfernt. Dann wurden die Platten mindestens 10 min luftgetrocknet, der Rückstand in 15 µl HiDi<sup>TM</sup> Formamid aufgenommen, kurz zentrifugiert und 2 min bei 95°C denaturiert, um unspezifische Bindungen zu lösen.

Die Kapillarelektrophorese erfolgte mit 10 µl der aufgereinigten Probe auf ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer mit 12 sec Injektionszeit, 22 min Laufzeit und POP-7 Polymer.

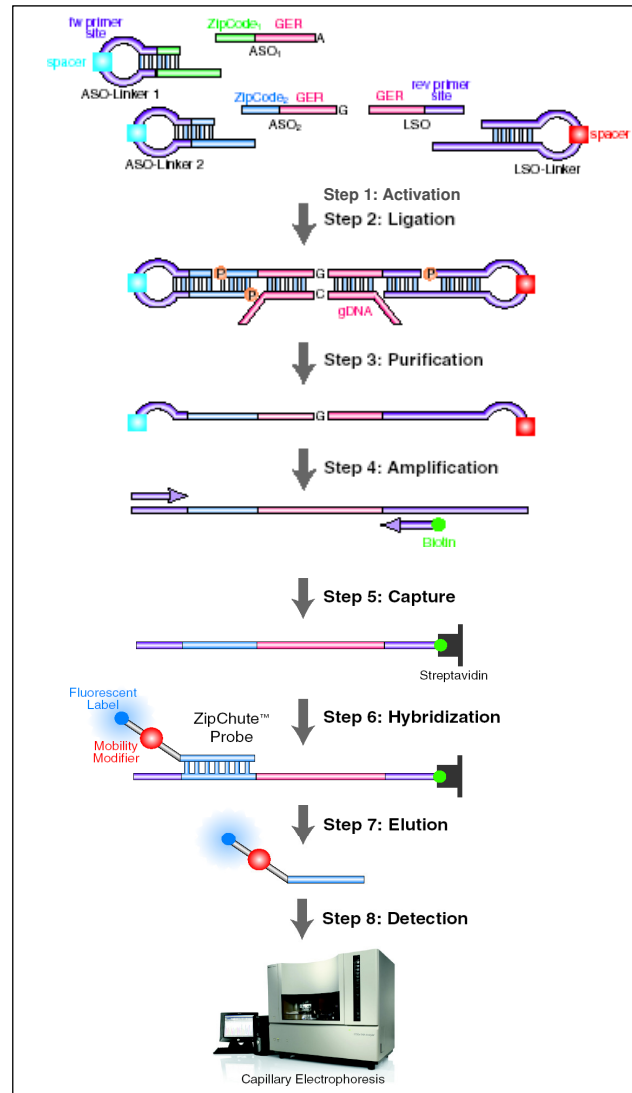
**SNPlex-Technologie**

Die SNPlex<sup>TM</sup>-Technologie (Applied Biosystems) erlaubt die simultane Genotypisierung von bis zu 48 SNPs mit einer Menge von 1 ng gDNA pro Genotyp. Das Prinzip beruht auf der allel- und lokusspezifischen Ligation von Sonden mit einer bestimmten Adresssequenz an die genomische DNA. Bei der Ligation allelspezifischer Oligonukleotide werden insgesamt zwei verschiedene Oligonukleotide verwendet. Dabei enthält das erste Oligonukleotid die SNP-Position, so dass hier entsprechend der SNP-Varianten mehrere Oligonukleotide zur Verfügung stehen müssen. Das zweite Oligonukleotid endet genau vor der SNP-Position, so dass die beiden Oligonukleotide mit den jeweiligen Sequenzen am SNP enden. Hybridisieren beide Oligonukleotide komplett, kann die beigefügte Ligase beide Oligonukleotide miteinander verbinden. Es entsteht ein intakter DNA-Einzelstrang, der den Bereich des SNP überspannt. Ist die Hybridisierung am SNP durch nicht komplementäre Nukleotide unterbrochen, erfolgt keine Ligation. Ein Nachweis der Ligationsprodukte erfolgt dann über die Nutzung des biochemischen Verfahrens mit OLA (oligonucleotide ligation assay,

Landegren et al., 1988a,b). Durch eine anschließende PCR wird dabei das Signal verstärkt und mittels Kapillarelektrophorese auf einem Sequenziergerät detektiert.

### Ablauf der SNPlex-Analyse

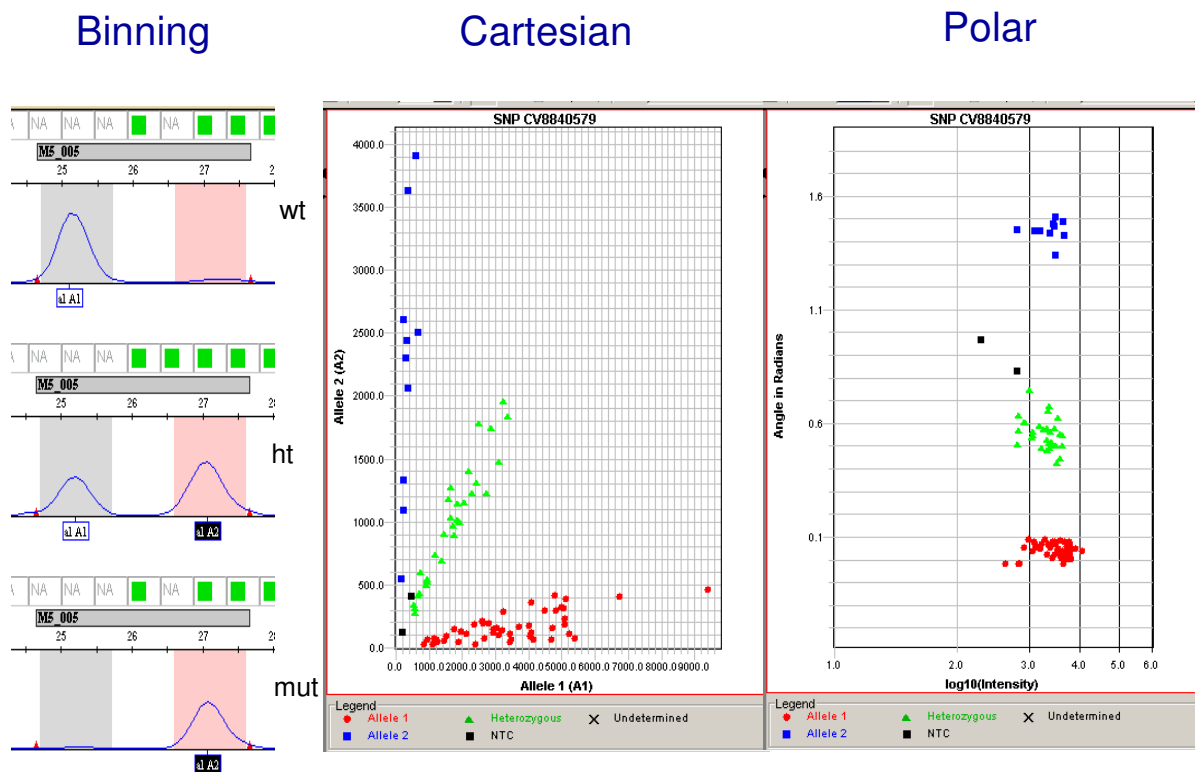
Zuerst wird genomische DNA (gDNA, Länge > 12 kb, 50-200 ng/μl, Ratio > 1,8) fragmentiert und mit Gelelektrophorese kontrolliert. Die gDNA wird mit SNP-spezifischen Ligations-Sonden (ASO, 96 Allel-spezifische Oligonukleotide) und universellen Linkern (LSO, 48 Lokus-spezifische Oligonukleotide) durch Phosphorylierung aktiviert (Abb. 8). Danach erfolgt eine allelische Diskriminierung mittels Oligonukleotid-Ligations-Assay (OLA), d.h. eine Lokus-spezifische wird mit einer von 2 Allel-spezifischen Oligonukleotid-Sonden durch Ligation verknüpft (OLA-Reaktion). Die OLA-Produkte werden nun durch Verdau mit Exonukleasen (Exonuklease I, Lambda-Exonuklease) gereinigt, um nicht ligierte Oligonukleotid-Sonden (ASO, LSO) enzymatisch abzubauen. Eine Amplifikation mit Biotin-Universal-



**Abb. 8** Ablauf der Genotypisierung mittels SNPlex™ (Applied Biosystems)

primern schließt sich an. Die Biotin-markierten PCR-Produkte werden nun auf Hybridisierungsplatten gebunden, welche mit Streptavidin versehen sind, anschließend wird denaturiert und mittels Nunc-Immuno™ Wash 8 gewaschen. Dann werden sogenannte ZipChutes an die einzelsträngigen PCR-Produkte hybridisiert, die an einen jeweils anderen SNP binden, denn jedes ZipChute-Paar ist für einen SNP spezifisch. Neben dem Fluorophor beinhaltet jede ZipChute-Sonde einen „Mobilitäts-Modifikator“, welcher der ZipChute-Sonde

eine spezifische Mobilitätsrate bei der Kapillarelektrophorese gibt. Nach Waschen und Eluieren werden die im Eluat enthaltenen gebundenen ZipChutes durch Kapillarelektrophorese über Auftrennung nach Fragmentlänge auf einem 3130xl Genetic Analyzer analysiert, wobei bis zu 4 verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe detektiert werden. GeneMapper SNPlex Software v4.0. wird zur Analyse der Rohdaten der Kapillarelektrophorese und zur Genotyp-Bestimmung genutzt. Zwei fluoreszierende Peaks im Kapillarelektrophorese-Elektropherogramm repräsentieren die zwei möglichen Allele eines spezifischen SNPs (Abb. 9). Die Software ist in der Lage, individuelle Genotypen in Abhängigkeit von Intensität und Lokalisation der Peaks zuzuordnen.



**Abb. 9** Exemplarischer Binning-Plot, kartesischer Cluster-Plot und polarer Cluster-Plot von Genotypen. Visualisierung der Daten mit GeneMapper® 4.0 Software. Wt homozygot Wildtyp (rot), ht heterozygot mutiert (grün), mut homozygot mutiert (blau). Das kleine schwarze Quadrat stellt die Negativkontrolle (NTC) dar. Die Software gibt für jeden SNP einen Genotyp-Binning-Plot (links) und nutzt einen Cluster-Algorithmus, um Genotypen zuzuordnen. Im kartesischen Cluster-Plot (Mitte) sind die Intensitäten beider Peaks auf der x- und y-Achse aufgetragen. Im polaren Cluster-Plot (rechts) sind der log10 der Intensität der Peaks auf der x-Achse und das Verhältnis dieser beiden Peakhöhen auf der y-Achse als Winkel im Bogenmaß abgebildet.

Die ZipChute-Paare, die die beiden Allele eines SNPs repräsentieren, werden in sogenannten Markern zur SNP-Identifizierung arrangiert. Ein LSO-Marker stellt eine bekannte SNP-

Lokalisation dar und besteht jeweils aus zwei Allelen. Die zwei Bindungsbereiche (Binning, Abb. 9) jedes Markers stellen den erwarteten Ort eines Peaks bzw. Allels, definiert durch Fragmentgröße und Farbe, dar und stehen für beide Allele eines SNPs. Die Signalintensität jedes Bindungsbereiches wird durch die Software in einen Cluster-Plot umgewandelt (Allel-Identifikation). Um nun die Genotypen zu erhalten, werden die Cluster-Plots mit den Daten der ZipChute-Paare, die individuellen SNPs entsprechen, in Verbindung gebracht.

### **Durchführung**

Die genomische DNA wurde bei 99°C 5 min fragmentiert. Die Gelelektrophorese zur Kontrolle von gDNA und fragmentierter DNA erfolgte mit 0,8% Agarose, 1 kb Längensstandard, Bromphenolblau-Ladepuffer und SYBR® Gold-Färbung. 2,3 µl gDNA (auf 30 ng/µl eingestellt mit 1X TE-Puffer, pH 8,0) wurden initial in der OLA-Reaktion eingesetzt. Die Denaturierung wurde mit 50 µl 0,1 N NaOH durchgeführt. Die Negativkontrolle und die Kontroll-DNA sind jeweils mit 1X TE-Puffer (pH 8,0) angesetzt worden. Alle weiteren Reagenzien der OLA-Reaktion, Exonuklease-Verdau, PCR-Reaktion und Hybridisierung, sind im SNPlex™ Genotyping System Core Reagents Kit (48-plex) enthalten. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und die Temperaturprotokolle entsprechen den Angaben der Gebrauchsanweisung. Alle Inkubationen wurden in Thermocyclern durchgeführt. Die Kapillarelektrophorese erfolgte am 3130xl Genetic Analyzer mit POP-7-Polymer. Der Assay wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt (Stand 03/2006, [http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/general\\_documents/cms\\_039279.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/general_documents/cms_039279.pdf)). Die Werte der Proben sollten über dem Wert der Negativkontrolle, also >2,5 der log(10) Intensitäts-Skala, liegen. Gegebenenfalls müssen die Genotypen manuell im Programm editiert bzw. die Analyse der Proben wiederholt werden.

### **2.2.6 Qualitätskontrolle**

#### **Reproduzierbarkeit, Richtigkeit, Präzision**

Kontrollen für Genotypen und DNA-Längensstandards (50 bp, 100 bp, 1kb) wurden bei allen Experimenten mitgeführt. Einzelne Genotypisierungen wurden nach dem Zufallsprinzip wiederholt. Die PCR/RFLP-Reaktion musste das genaue Banden-Schnittmuster des Restriktionsenzym wiedergeben.

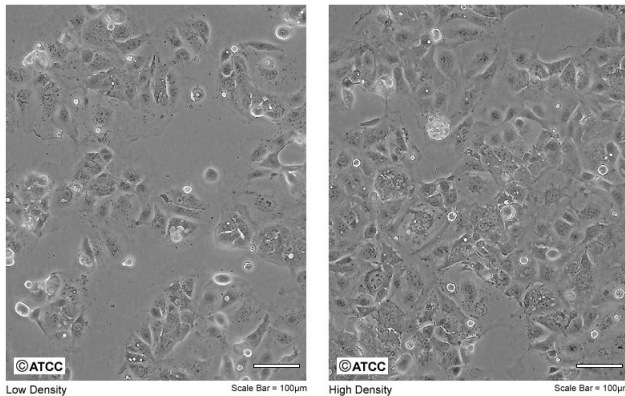


## 2.3 Zellkulturen und induzierte Differenzierung

### 2.3.1 Zellkultur

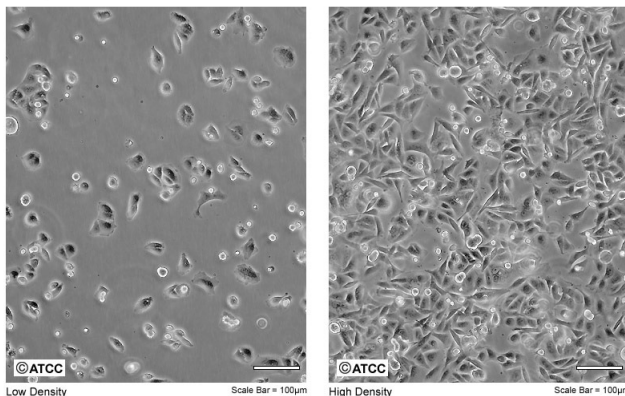
Zur Untersuchung der Expression auf mRNA-Ebene wurden die zwei humanen Darmkrebs-Zelllinien Caco-2 und SW480 (Abb. 10 und 11) verwendet. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$ .

ATCC Number: **HTB-37**  
Designation: **Caco-2**



**Abb. 10** Caco-2-Zellen sind Darmepithelzellen, die in Kultur als Monolayer wachsen. Bei hoher Zelldichte differenzieren sie spontan. Sie wurden im Jahre 1974 aus dem kolorektalen Adenokarzinom eines 72-jährigen Kaukasiers isoliert und als permanente Zelllinie etabliert (Rousset, 1986).

ATCC Number: **CCL-228**  
Designation: **SW 480**



**Abb. 11** SW480-Zellen wachsen in Kultur als Monolayer und bilden dabei Kolonien aus. Sie wurden 1976 aus dem undifferenzierten kolorektalen Adenokarzinom eines 50-jährigen Kaukasiers isoliert und als permanente Zelllinie etabliert (Leibovitz et al., 1976).

### 2.3.2 Kultivierung der Zellen

Beide Zelllinien wurden in 2 ml DMEM mit 5% FCS bei 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  und einem angestrebten pH-Wert von 7,4 kultiviert. Die Zellen wurden in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bis 80% Konfluenz gezüchtet. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Wachstum, Zelldichte, Morphologie und Kontamination wurden täglich mittels Lichtmikroskopie geprüft. Bei Erreichen einer kritischen Zelldichte wurden die Zellen mit PBS FCS-frei gewaschen und unter Verwendung von Trypsin-EDTA-Lösung passagiert.

### 2.3.3 Induktion der Zelldifferenzierung

Vitamin D (Calcitriol), Vitamin A (ATRA) und Natriumbutyrat (NaB) wurden entsprechend der folgenden Übersicht als Lösungen angesetzt. Alle Lösungen wurden unter Lichtschutz bei -20°C aufbewahrt.

<i>Reagenz</i>	<i>Ansatz</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>Konzentration im Well</i>
Vitamin D (Calcitriol)	50 µg in 1200 µl EtOH	100 µM	100 nM
Vitamin A (ATRA)	500 mg in 333 µl und 1664 µl EtOH	5 mM 1 mM	5 µM 1 µM
Natriumbutyrat (NaB)	220,2 mg in 1000 µl und 2000 ml H <sub>2</sub> O	2 M 1 M	2 mM 1 mM

Es wurden Vorversuche mit verschiedenen Inkubationszeiten (6, 12, 24, 48, 96 h) und Konzentrationen (0,1 mM bis 5 mM NaB, 0,01 µM bis 100 µM ATRA, 100 nM Vit. D) durchgeführt (nicht dargestellt).

Die Zellen wurden mit 2 µl dieser Reagenzien (entspricht 0,1% des Medienvolumens) oder der entsprechenden Menge Lösungsmittel (0,1% Ethanol) inkubiert. Die Behandlung wurde frühestens 24 h nach der Passage bei 80% Konfluenz begonnen. Die Induktion erfolgte 6, 12 und 24 h vor der gemeinsamen Ernte. Bei 100% Konfluenz wurden die Zellpellets gesammelt. Mit jedem Ansatz wurden mehrere unabhängige Experimente durchgeführt (n=3-4). Zellen, die mit den entsprechenden Lösungsmitteln (H<sub>2</sub>O oder EtOH) der verwendeten Induktoren behandelt wurden, dienten als Vergleich.

### 2.3.4 Zellernte und Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellkulturlysate

Die Zellen wurden zweimal mit PBS FCS-frei gewaschen, mit einem Gummiwischer in 600 µl Lysispuffer (400 µl β-ME in 40 ml RLT-Puffer) überführt und durch Zentrifugation mit dem Qiasredder 2 min bei Höchstgeschwindigkeit homogenisiert. Die Präparation der Gesamt-RNA wurde mittels Qiagen RNeasy Mini Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Stand Juni 2001, <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000291>) vorgenommen. Durch die Verwendung von RNase-free DNase Set wurden dabei DNasen beseitigt; die Anwendung erfolgte gemäß der Packungsbeilage

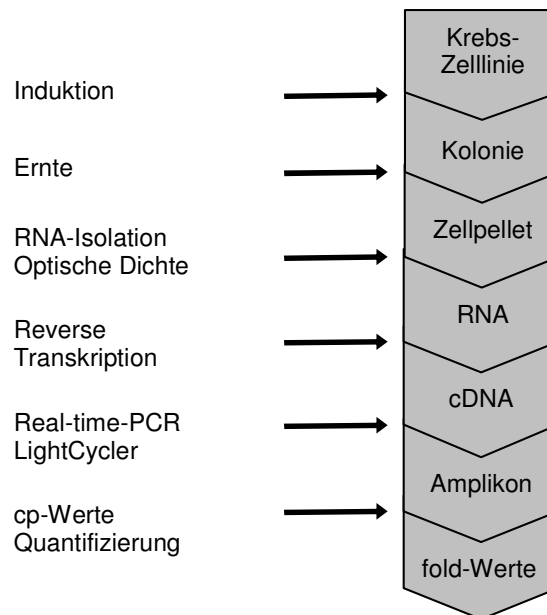
(Stand Juli 2005, <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000280>). Die RNA wurde in 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

## 2.4 Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

### 2.4.1 Ablauf der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

Um Differenzierung und Genexpression zu untersuchen, wurde ein In-vitro-Differenzierungsassay mit 2 humanen Darmkrebszelllinien (Caco-2, SW480), 3 differenzierenden Agenzien (NaB, ATRA, Vit.D), entsprechenden Kontrollen (H<sub>2</sub>O, EtOH) und unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt. Der Ablauf des Zellkultur-Experiments ist in Abb. 12 dargestellt.

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration wurden die Zellkulturen parallel mit 1 mM NaB, 1 µM ATRA und 100 nM Vitamin D für 6 h, 12 h und 24 h bei regelmäßigem Mediumwechsel behandelt. Als Kontrollen dienten die entsprechenden nur mit den Lösungsmitteln der Induktoren behandelten Kulturen.



**Abb. 12** Ablauf des Zellkultur-Experiments

### 2.4.2 RNA-Isolierung und Bestimmung der RNA-Konzentration

Aus den geernteten Zellpellets wurde mittels RNeasy Mini Kit die RNA extrahiert (Kap. 2.3.4.) Nach der RNA-Isolierung wurden von jeder Probe zwei 1:50 Verdünnungen hergestellt und quantifiziert. Die RNA-Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm (RNA, Konzentration), 280 nm (Proteine, A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>-Verhältnis) und 320 nm (Hintergrundkorrektur) photometrisch bestimmt. Die restliche RNA (38 µl) wurde auf 1 ng/µl eingestellt und sofort zur cDNA-Synthese verwendet oder bei -80°C eingefroren.

### 2.4.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

1 µg Gesamt-RNA wurden in 7 µl Gesamtvolumen 2 min bei 65°C denaturiert und danach in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit Omniscript RT Kit (Stand Mai 2004, <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000158>) bei 37°C 1 h im Thermocycler mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase nach folgendem Protokoll in cDNA umgeschrieben:

#### Reaktionsansatz für Reverse Transkription

<i>Reagenz</i>	<i>µl</i>	<i>Endkonzentration</i>
RNA	7,0	0,1 µg/µl
10x Puffer RT	1,0	1X
dNTP Mix (5 mM je dNTP)	1,0	0,5 mM
Oligo-dT Primer (500 ng/µl)	0,5	25 ng/µl
Omniscript Reverse Transkriptase	0,5	2 U
Ansatzvolumen	10,0	

### 2.4.4 Real-time-PCR

Die Real-time-PCR wurde mit dem QuantiTect™ SYBR®Green PCR Kit nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt (Stand November 2005, <http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000269>).

Mittels Primer Designer® wurden spezifische, Exon-Exon-Bereiche umspannende Primer für 4 Kandidatengene ausgewählt (Tab. 9) und validiert.

**Tab. 9** Primer und Bedingungen der mRNA-Quantifizierung mittels Real-time-PCR

<i>Gensymbol</i>	<i>Acc. No.</i> <i>Lokalisation</i>	<i>Primersequenz</i>	<i>T<sub>m</sub> (°C)</i>	<i>bp</i>	<i>AE</i>
GAPDH	NM_002046	F: 5'-cca gca aga gca caa gag ga-3' R: 5'-caa ggg gtc tac atg gca ac-3'	83°C	114	1,84
Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase	12p13				
ACTB	NM_001101	F: 5'-atg tgg atc agc aag cag ga-3' R: 5'-aaa gcc atg cca atc tca tc-3'	82°C	149	1,76
Beta Actin	7p15-p12				
CDH1	NM_004360	F: 5'-gaa gag gac cag gac ttt ga-3' R: 5'- ggt tgg tgc aac gtc gtt ac-3'	84°C	87	1,77
E-Cadherin (epithelial)	16q22.1				
VDR	NM_000376	F: 5'-gtt ccg gcc tcc agt tgc tg-3' R : 5'-cct ttt gga tgc tgt aac tg-3'	84°C	266	1,93
1α,25-Dihydroxy-vitamin-D3-Rezeptor	12q13.11				

T<sub>m</sub>, Schmelzpunkt; bp, Basenpaare; AE, Primer-spezifische Amplifikations-Effizienz; F, Vorwärts-Primer; R, Rückwärts-Primer

Zur relativen Quantifizierung der mRNA wurden dann folgende Reagenzien miteinander für die Amplifikation in den LightCycler® gegeben.

#### Reaktionsansatz für Real-time-PCR

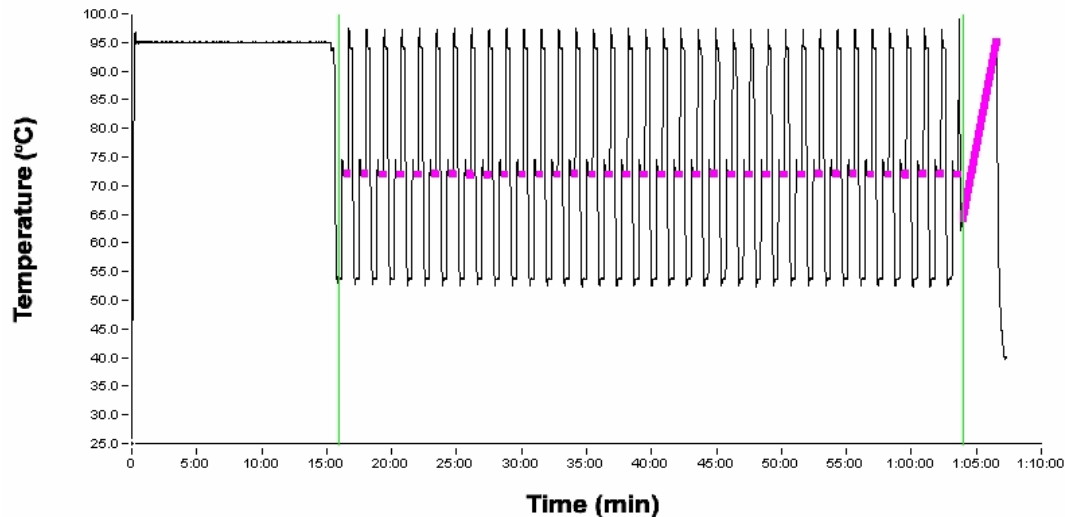
<i>Reagenz</i>	<i><math>\mu</math>l</i>	<i>Endkonzentration</i>
cDNA	4,0	1,25 bis 5,0 ng/ $\mu$ l
SYBR Green Mix	8,0	1X
Primer F (vorwärts)	0,8	0,5 $\mu$ M
Primer R (rückwärts)	0,8	0,5 $\mu$ M
H <sub>2</sub> O	2,4	-
Ansatzvolumen	16,0	

Der SYBR Green Mix enthält DNA-abhängige HotStart Taq DNA Polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR Puffer, Desoxyribonukleotid-Mix (dNTP) inklusive dUTP, SYBR Green I, passiven Referenzfarbstoff ROX und 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Für jedes Gen wurden 3 cDNA-Konzentrationen (entsprechend 5,00 (1:20), 2,50 (1:40) und 1,25 (1:80) ng RNA) in einem Gesamtvolumen von 16  $\mu$ l eingesetzt. Die Reaktion wurde mittels LightCycler® durchgeführt und unter Verwendung der Second-Derivative-Maximum-Methode analysiert. Der Fluoreszenzkanal F1 für SYBR Green I absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 498$  nm und emittiert grünes Licht bei  $\lambda_{\max} = 522$  nm. Der Schmelzpunkt  $T_m$ , ist die Temperatur, bei der die Hälfte der komplementären Sequenzen hybridisiert vorliegen. Folgendes Temperaturprogramm (Tab. 10) wurde am LightCycler® etabliert: eine initiale Denaturierung gefolgt von 35 Zyklen mit Denaturierung, Annealing und Extension.

**Tab. 10** Temperaturprotokoll der Real-time-PCR

<i>Programm-</i> <i>funktion</i>	<i>Segment-</i> <i>Nummer</i>	<i>Zyklen</i>	<i>Temperatur</i> <i>(°C)</i>	<i>Zeit</i> <i>(min:sec)</i>	<i>Anstieg</i> <i>(C°/sec)</i>	<i>Mess-</i> <i>methode</i>
Denaturierung	1	1	95	15:00	20	Keine
Amplifikation	1	36	94	00:15	20	Einzeln (Quantifizierung)
	2		54	00:20	20	
	3		72	00:20	20	
Schmelzen	1	1	95	00:00	20	Fortlaufend (Schmelzkurve)
	2		65	00:10	20	
	3		95	00:00	0,2	
Kühlen	1	1	40	00:10	20	Keine

Der LightCycler® kombiniert schnelles thermales Cycling einer PCR mit der Real-time-Fluoreszenz-Messung. Während der Amplifizierung wird die über die Zyklen entstandene Menge an Amplifikat quantifiziert. Anschließend wird mittels einer Schmelzkurve über die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Amplifikats dessen Spezifität ermittelt (Abb. 13).



**Abb. 13** Real-time-PCR-Temperaturprogramm am LightCycler® (Denaturierung, Amplifikation, Schmelzkurve). Farbige Punkte stellen Meßpunkte dar.

Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenz-Messung von DNA-bindenden Farbstoffen (Fluorochrome) bei der Detektion von doppelsträngiger DNA. Der Cyanin-Farbstoff SybrGreen bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz von SybrGreen stark zunimmt. Die Fluorophore werden mit einer Blaulicht-emittierenden Diode (470 nm) beleuchtet. Gelb-grüne Fluorophore wie SybrGreen werden dadurch spezifisch angeregt und die resultierende Emissionsfluoreszenz wird im Kanal 1 (F1, 530 nm) gemessen. Für die Erstellung von Genexpressionsprofilen wird die Kopienzahl der gesuchten mRNA-Sequenz eines Zielgens relativ quantifiziert. Die Amplifikationskurve zeigt typischerweise einen sigmoiden Verlauf. Während der ersten Amplifikationszyklen sind der Gehalt an PCR-Produkten und damit die resultierende Fluoreszenz noch unterhalb der Nachweisgrenze, weshalb die Amplifikationskurve in diesem Abschnitt eine Steigung von annähernd Null besitzt (Basislinie). Nach Eintritt in den detektierbaren Bereich wird (bei einer maximalen PCR-Effizienz) in jedem PCR-Zyklus eine Verdoppelung der Menge an PCR-Produkt registriert, was sich als exponentieller Anstieg der Amplifikationskurve darstellt. Durch Substratverbrauch sinkt die Vermehrungsrate im späteren Verlauf der Reaktion bis auf annähernd Null ab, was zu einer Abflachung der Amplifikationskurve führt.

Die Fluoreszenz wurde fortlaufend als Zyklus-Einzelmessung zur Quantifizierung erfasst und anschließend eine Schmelzkurve ermittelt (Abb. 13). Die Fluoreszenz-Signale wurden dann für jede Probe gegen die Anzahl der Zyklen (semiquantitative Quantifizierung) oder die Temperatur aufgetragen (Schmelzkurvenanalyse).

### 2.4.5 Relative Quantifizierung

Um zu ermitteln, ob die Anzahl der Transkripte durch die verwendeten Induktoren verändert wurde, wurden die während der Real-time-PCR erhaltenen Wendepunkte (cp, crossing point) der Kurven ermittelt, wobei  $cp \sim 1/C_{RNA}$  ist. Die Linearität wurde durch 3 Verdünnungstufen kontrolliert. Die Produktspezifität wurde durch Schmelzkurvenanalyse überprüft und bestätigt. Es wurde keine absolute Quantifizierung mit externen Standards durchgeführt, sondern eine relative Quantifizierung basierend auf der Second-Derivative-Maximum-Methode mit Effizienzkorrektur. Die relative Quantifizierung erfolgte nach der Methode von Pfaffl (2001) unter Einsatz zweier Referenzgene.

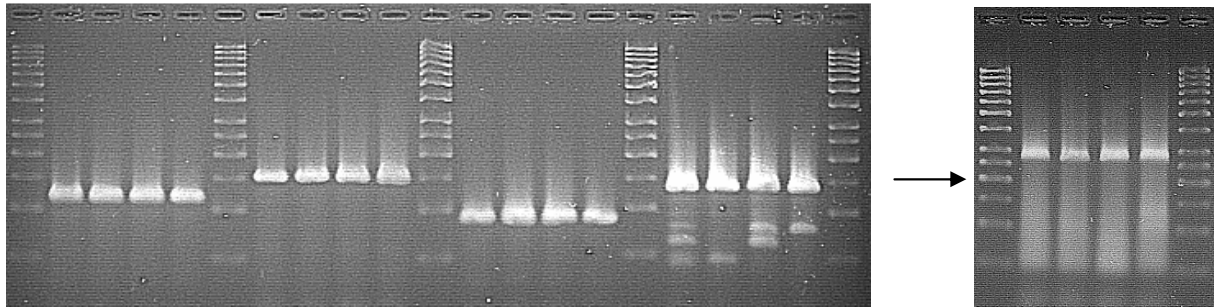
Die Berechnungen wurden nach Krusekopf et al. (2005) durchgeführt. Die fold-Werte für jedes Kandidatengens wurden aus dem Mittelwert aus drei Experimenten mit 3 Verdünnungen bestimmt. Für die einzelnen Experimente wurden die fold-Werte für behandelte und unbehandelte Proben nach  $fold = E^{[-1/(cp_{treatment} - cp_{control})]}$  für alle 3 Verdünnungen berechnet und daraus der Mittelwert gebildet. Für die parallelen Experimente wurde dann das geometrische Mittel der fold-Werte der 3 Verdünnungen ermittelt. Das geometrische Mittel und der Variationskoeffizient (CV) dienen zur SD- und CI-Bestimmung. CV wurde nach  $100 \cdot (e^{SD(\ln(\text{foldchange}))} - 1)$  berechnet. Die untere und obere Grenze des Konfidenzintervalls wurde folgendermaßen kalkuliert:  $SD(\ln(\text{fold change})) = \ln(1 + CV/100)$ , untere = fold-Wert  $\cdot e^{-SD(\ln(\text{fold change}))}$ , obere = fold-Wert  $\cdot 1/e^{SD(\ln(\text{fold change}))}$ .

Folgende Kandidatengene wurden bestimmt: E-Cadherin epithelial (CDH1) und  $1\alpha,25$ -Dihydroxy-Vitamin-D3-Rezeptor (VDR). Als Referenzgene für die Normalisierung wurden Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) und Beta-Actin (ACTB) benutzt.

### 2.4.6 Gelelektrophorese

Die Produkte der LightCycler-RT-PCR-Amplifikation wurden mittels Gelelektrophorese und SYBR®Gold-Färbung überprüft, um Nebenprodukte auszuschließen. Auch wenn nach Aussage der Ergebnisse des LightCyclers nur ein Produkt vorlag, wurde diese

Qualitätskontrolle durchgeführt. Die entsprechenden LightCycler-Läufe für die Gelelektrophorese wurden ohne Schmelzkurve durchgeführt, da die amplifizierte Strukturen nach dem Schmelzen nicht wieder komplett hergestellt sein können und eventuell entstandene ssDNA das Gelergebnis verfälschen würde. Die Einzelbanden der Kandidatengene GAPDH, ACTB, CDH1 und VDR sind in Abb. 14 dargestellt.



**Abb. 14** Qualitätskontrolle durch Gelelektrophorese der Kandidatengene GAPDH (114 bp), ACTB (149 bp), CDH1 (87 bp), VDR (136 bp, 1. Primerpaar) und VDR (266 bp, 2. Primerpaar) nach Real-Time PCR am LightCycler® (ohne Schmelzkurve), 50 bp DNA-Längenstandard.

#### 2.4.7 Qualitätskontrolle

##### Löslichkeit, Stabilität, Toxizität

Für die verwendeten Induktoren wurde das geeignete und in der Literatur beschriebene Lösungsmittel verwendet. Die angefertigten Lösungen wurden in Reaktionsgefäßen mit Lichtschutz aufbewahrt, mit Parafilm-Schutzfolie versehen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Toxizität der eingesetzten Induktoren wurde nach dem Trypan-Blau-Verfahren bestimmt. Waren mehr als 5% der Zellen nicht vital, wurde diese Passage nicht für weitere Experimente verwendet.

##### Linearität, Präzision, Reproduzierbarkeit, Richtigkeit

Die Linearität bei der RNA-Quantifizierung mittels RT-PCR am LightCycler wurde durch Verwendung von 3 Verdünnungen sichergestellt. Außerdem wurden die Zellkulturversuche in Parallelansätzen durchgeführt.

Um die Qualität der Real-time-PCR, die Linearität der Daten und den Zustand der amplifizierten cDNA einzuschätzen, wurden die cp-Werte der 3 Verdünnungen als lineare Regression ( $y=ax+b$ ) aufgetragen – der Anstieg der Regressionsgerade (RGP, Regressionskoeffizient) des  $\log(2)$  der Konzentration aufgetragen gegen den cp-Wert der



drei Konzentrationen. Die Effizienz (E) der Amplifikation wurde nach  $E = 2^{-1/RGP}$  berechnet. E ist Primer-abhängig und liegt optimalerweise bei 2, wobei der RGP nahezu -1 und das Bestimmtheitsmaß ( $r^2$ ) nahezu +1 sein sollten.

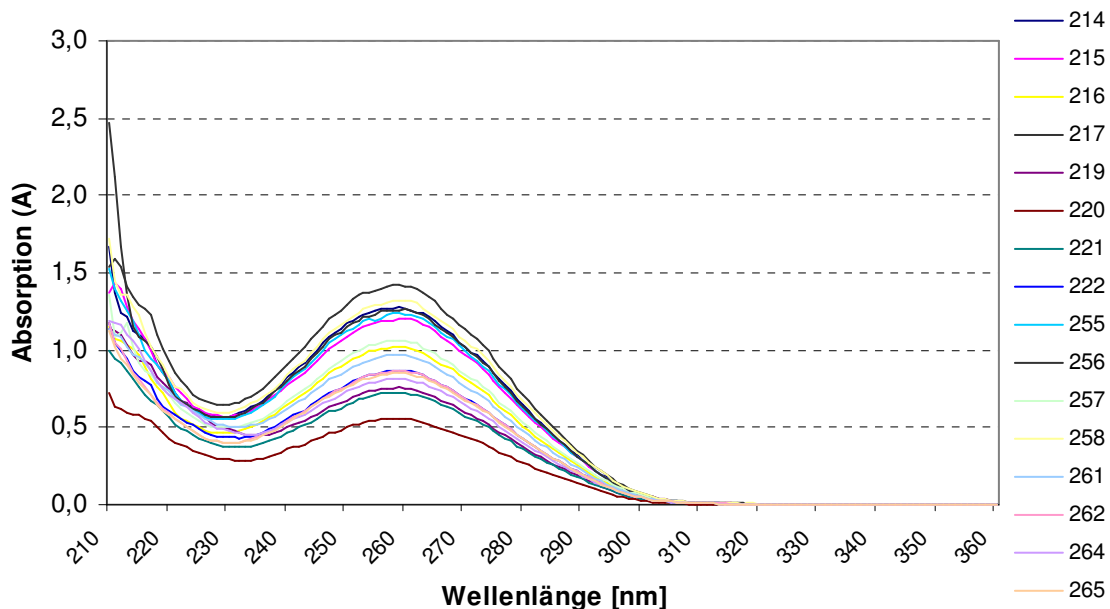
### Normalisierung

Zur Normalisierung wurde aus dem geometrischen Mittel paralleler Experimente das Verhältnis Kandidatengen/Referenzgen gebildet. Es standardisiert die Werte auf das Referenzgen. Für die statistische Analyse wurde das 95% CI der Fold-Change-Werte normalisiert auf 1 bestimmt und logarithmisch dargestellt.

## 2.5 Genexpressionanalyse mit GeneChip-Mikroarrays

### 2.5.1 Bestimmung der RNA-Konzentration (Quantität)

Zur Qualitätskontrolle (QC) wurde die Konzentration der Gesamt-RNA vor der cDNA-Synthese (1. QC) und die cRNA vor der Fragmentierung (2. QC) mit 1 µl Probe und dem Nano-Photometer<sup>TM</sup> ermittelt. Die Extinktionswerte der 1. QC sind Abb. 15 dargestellt.



**Abb. 15** Absorptionsspektrum der isolierten RNA-Proben der Zellkulturversuche (Nano-Photometer<sup>TM</sup>). Das deutliche Maximum bei 260 nm und die geringe Absorption bei 230 nm und 320 nm weisen auf eine gute RNA-Qualität hin.

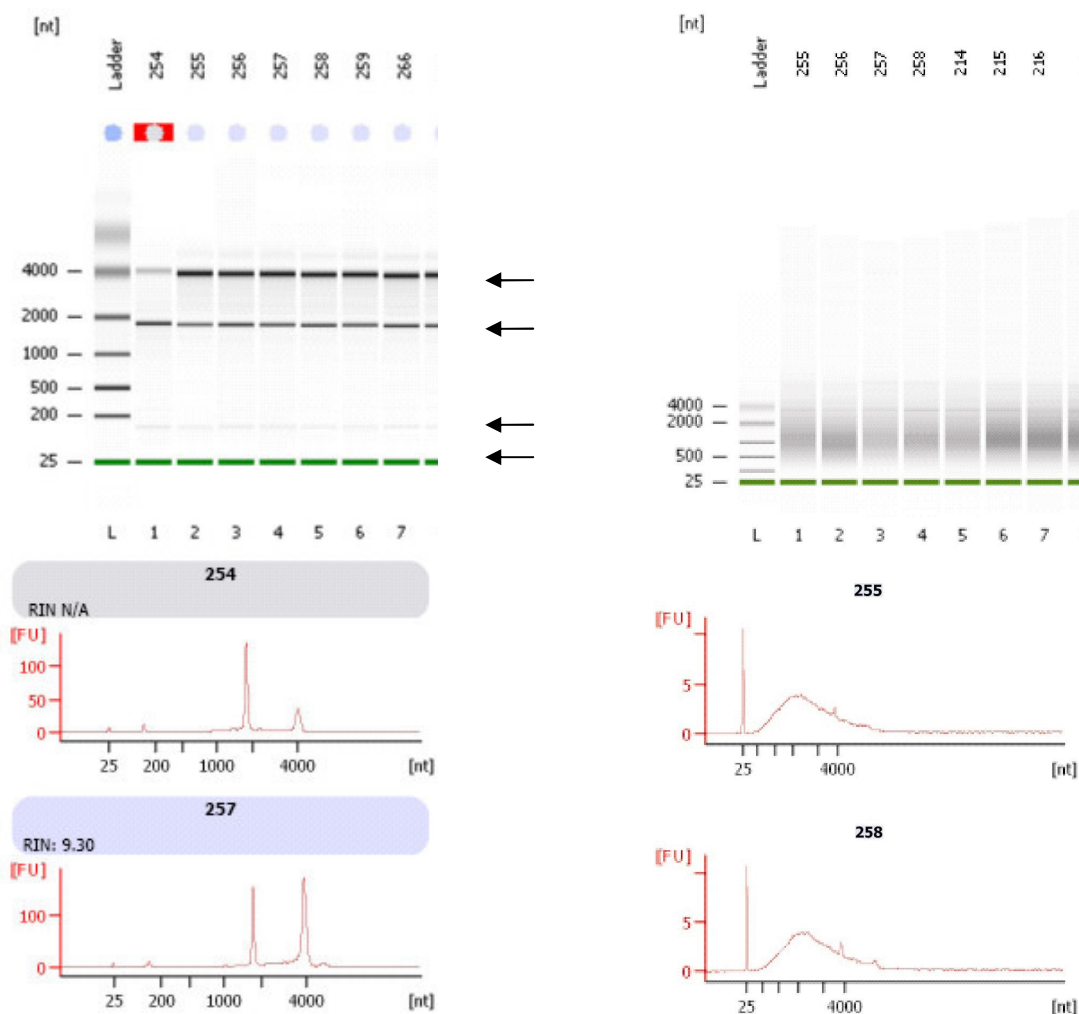
Die isolierten RNA-Proben der Zellkulturversuche wiesen in der spektralphotometrischen Analyse der 1. QC eine durchschnittliche Konzentration von 1609 ng/µl auf. 2 µg wurden dann im folgenden Schritt in die Amplifikation eingesetzt. Das Minimum bei 230 nm und das Maximum bei 260 nm sind deutlich ausgeprägt. Die Kurven weisen keine erheblichen Schwankungen oder Heterogenität auf. Die Extinktionswerte der 2. QC ergeben ein ähnliches Spektrum, die Extinktionen liegen hingegen deutlich tiefer (<1,0).

### **2.5.2 Bestimmung der RNA-Integrität (Qualität)**

Zur Qualitätskontrolle (QC) wurde die aus der Zellkultur gewonnene Gesamt-RNA vor der cDNA-Synthese (1. QC, total RNA Assay) und die cRNA vor der Fragmentierung (2. QC, mRNA Assay) am 2100 Agilent Bioanalyzer mit dem Agilent RNA 600 Nano Kit überprüft. Dieses Verfahren dient zur Aufdeckung von RNA-Abbau durch ubiquitär vorkommende RNasen, mangelhafter cRNA-Transkription und sonstigen Verunreinigungen. Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers mit 1 µl Probe (Stand August 2006, <http://ipmb.sinica.edu.tw/microarray/index.files/Agilent%20RNA%206000%20Series%20II%20Nano%20Kit%20Guide.pdf>).

Das auf dem Prinzip einer miniaturisierten Kapillarelektrophorese basierende Verfahren wird auf einem Glas-Chip (RNA Nano Chip) in Form einer quadratischen 16-Lochplatte durchgeführt und ist für eine Probenkonzentration von 25-500 ng/µl geeignet. In einem Minichip, welcher aus einem Netzwerk untereinander verbundener Kanäle besteht, wird eine spannungsinduzierte Größentrennung von RNA-Fragmenten nach Molekulargewicht vorgenommen. Die Erfassung der RNA-Fragmente erfolgte mittels laserinduzierter Fluoreszenzdetektion. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz korreliert mit der Menge an RNA einer bestimmten Größe in der Probe. Für jede RNA-Probe entsteht sowohl ein Elektropherogramm als auch eine Abbildung der gelelektrophoretischen Auftrennung der RNA-Fraktionen. Die Software Agilent Expert 2100 berechnet anhand des RNA-Standards die RNA-Konzentration und eine RIN-Nummer (RNA integrity number) als Maß für die RNA-Integrität. Letztere ist umso größer, je höher die RIN ist (Skala 0-10). Die RIN-Bestimmung erfolgt im Elektropherogramm durch die Analyse verschiedener Faktoren. Die Höhe des 28S-Peak gibt Auskunft über den RNA-Degradationsgrad. Liegt degradierte RNA vor, wird dieser Peak flacher (Schroeder et al., 2006). Nur Proben mit einer RIN > 9 wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet und für die cDNA-Synthese eingesetzt.

Die Testung der Qualität von RNA und cRNA in der Kapillarelektrophorese ist in Abb. 16 abgebildet, wobei die 28S- und 18S-Banden der ribosomalen RNA als Indikatoren für gute RNA-Qualität und als Auswahlkriterien für die Array-Analyse galten. Die entsprechenden Proben wiesen eine durchschnittliche Integrität (RIN) von 9,6 auf und wurden in den weiteren Untersuchungen verwendet. Die für die Mikroarray-Analyse verwendete RNA war bei Kontrolle mit dem Agilent BioAnalyzer frei von toxischen Konzentrationen der Zellkultur-Induktion, Degradierungsprodukten und DNA-Verunreinigung (1. QC). Alle verwendeten cRNA-Proben waren ausreichend transkribiert (2. QC).



**Abb. 16** Elektropherogramm der Auftrennung der Gesamt-RNA (1. QC, links) und cRNA (2. QC, rechts, mRNA-Assay) mittels Agilent 2100 BioAnalyzer gegen den RNA-Standard. Die 18S- und 28S-Untereinheiten der ribosomalen RNA, der Marker bei 25 nt und die tRNA bzw. rRNA kurz unter 200 nt sind durch Pfeile angezeigt. Verstreute, verschmierte Bereiche sind mRNA. Die Probe 254 (links, exemplarisch) stellte sich als ungeeignet heraus - die abgeflachte 28S Bande weist auf RNA-Degradierung hin - und wurde nicht weiter verwendet.

### 2.5.3 GeneChip® Human Genome U133 2.0

Die Expressionsanalyse der RNA aus den Zellkultur-Versuchen wurde mit GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0- Mikroarrays (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA) vollzogen. Mit dem GeneChip® Mikroarray kann die Expression von 38.500 gut charakterisierten Genen analysiert werden. Mehr als 54.000 Probe-Sets bestehend aus 1,3 Millionen Oligonukleotiden (25-mer Länge) werden dabei erfasst, wobei 11 Paare von Oligonukleotid-Sonden für jedes Probe-Set verwendet werden.

Die Synthese von Biotin-markierter cRNA und die Hybridisierung wurden mit dem GeneChip Expression 3'-Amplification One Cycle Target Labeling and Control Reagents Kit entsprechend den Angaben des Herstellers und dem Affymetrix-Protokoll durchgeführt (Stand November 2004, [http://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression\\_analysis\\_technical\\_manual.pdf](http://www.affymetrix.com/support/downloads/manuals/expression_analysis_technical_manual.pdf)). Alle Puffer (Waschpuffer A, Waschpuffer B, Hybridisierungspuffer, MES-Puffer, Färbepuffer) wurden frisch hergestellt, durch die sterile Filtereinheit Nalgene® MF75™ Supor® machV mit PES Membran (0,2 µm Porengröße, 90 mm Membrandurchmesser, 1000 ml Fassungsvermögen) filtriert und bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

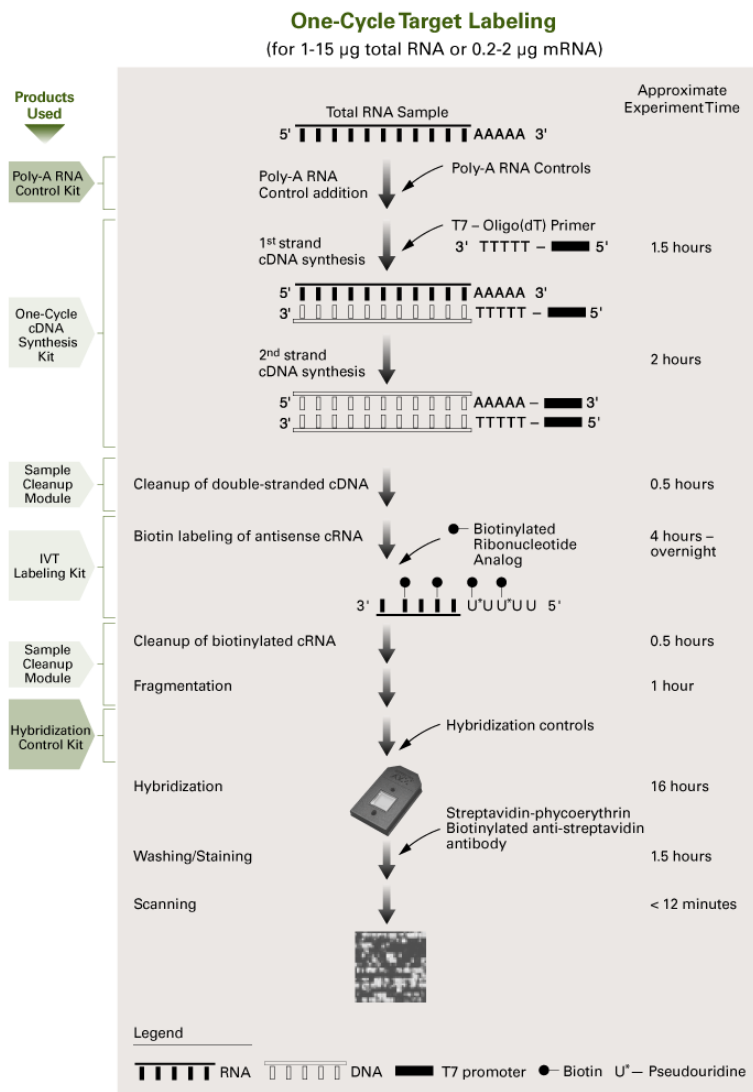
Für die cDNA-Erststrangsynthese wurden 2 ng Gesamt-RNA eingesetzt; für die Hybridisierung wurden 21 µg fcRNA verwendet. Je 4 Parallel-Proben pro Ansatz (Vitamin-D-behandelt / Vitamin-D-unbehandelt, 6 h / 12 h) wurden bestimmt (Tab. 11). Alle 16 Arrays wurden in die Datenanalyse eingeschlossen.

**Tab. 11** Experimentelles Design der Mikroarrayanalyse (Chip-Nummern)

<i>Behandlung</i>	<i>6 h</i>				<i>12 h</i>			
Vitamin D	255	256	257	258	261	262	264	265
EtOH	214	215	216	217	219	220	221	222

### 2.5.4 Ablauf der Genexpressionsanalyse mit GeneChip-Mikroarray

Das Experiment gliedert sich in folgende Teile: cDNA-Erststrangsynthese, cDNA-Zweitstrangsynthese, Reinigung, cRNA-Synthese mit Biotin-Markierung, Reinigung, Fragmentierung, Hybridisierung, Waschen, Färben, Scannen (schematische Übersicht siehe Abb. 17).



**Abb. 17** Ablauf der Genexpressionsanalyse mittels GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array

Die Gesamt-RNA (1-5 µg) wird zuerst in der Erststrang-cDNA-Synthese mit einem T7- Oligo(dt)- Promotor-Primer revers transkribiert. Nach der RNase-H-vermittelten Zweitstrang-cDNA-Synthese wird die doppelsträngige cDNA gereinigt und dient der sich anschließenden In-vitro-Transkriptionsreaktion (IVT) als Vorlage. Die IVT-Reaktion wird für 16 h in Anwesenheit einer T7-RNA-Polymerase und eines mit Biotin markierten Nukleotid-/Ribonukleotid-Mix für die komplementäre cRNA-Amplifikation und die Biotin-Markierung durchgeführt. Die biotinmarkierten

cRNAs werden dann erneut aufgereinigt, fragmentiert (fcRNA) und auf GeneChip Expressionsarrays 16 h hybridisiert (GeneChip Hybridization Oven 640). Dann wird der hybridisierte Array mit Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat gefärbt (GeneChip Fluidics Station 450) und gescannt (GeneChip 3000 Scanner). Die Menge an emittiertem Licht bei 570 nm ist dabei proportional zur gebundenen fcRNA jeder Position auf dem Array.

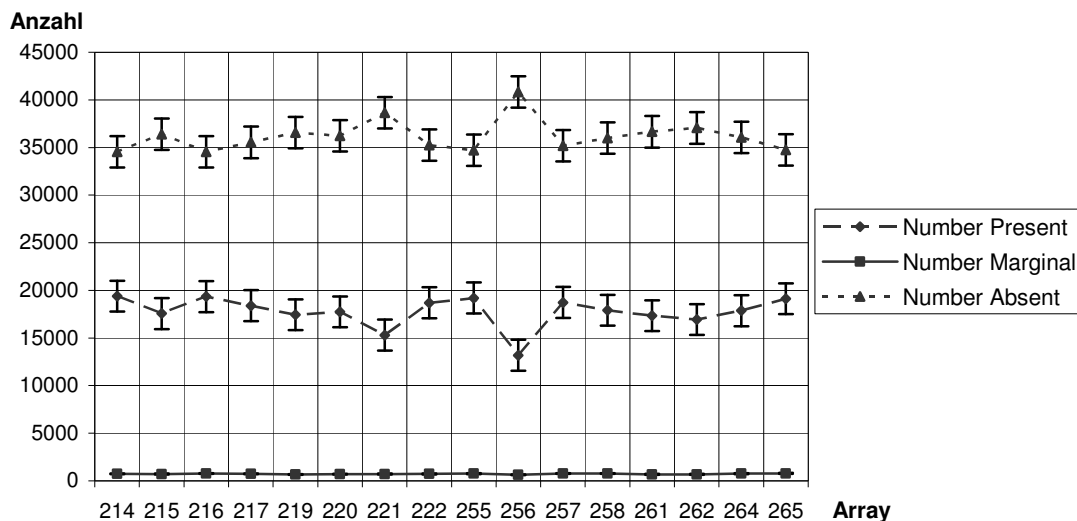
## 2.5.5 Qualitätskontrolle und vergleichende Expressionsanalyse

### Normalisierung

Zur Normalisierung der Genexpressionanalyse mit GeneChip-Mikroarray auf Standardbedingungen wurde nach dem Scannen die Microarray Suite 5.0.1. Software (MAS 5.0, Affymetrix Inc.) angewendet. Dieses standardisierte, gewichtete Verfahren bezieht die auf dem Chip verteilten internen Kontrollen und 5'-Kontrollgene mit ein, gleicht damit die Unterschiede zwischen verschiedenen Chips aus und ermöglicht so den Vergleich unterschiedlicher Experimente.

### Signalqualität

In Abhängigkeit von der Signalstärke und vom Verhältnis von Match-Mismatch (passende und in 1 nt abweichende Oligonukleotide) wurde durch die GeneChip Operating Software für jede Sequenz (Probe-Set-ID) das Signal als abwesend (A, absent), marginal (M) oder präsent (P, present) eingestuft. Die Signalqualität aller 16 Arrays ist in Abb. 18 dargestellt. Der Array 256 weicht in MW und SD von den übrigen Arrays deutlich ab.



**Abb. 18** Signalqualität der 54675 Probe-Set-IDs. MW +/- SD

### Qualitätskontrolle

Zur Qualitätskontrolle der Rohdaten der gescannten Chips dienten verschiedene Parameter und deren Obergrenzen, die sich zwischen den einzelnen Experimenten nicht stark unterscheiden sollten: der Hintergrund sollte  $<100$ , das Rauschen  $>4$ , der Maßstabsfaktor  $<10$ , der prozentuale Anteil an anwesenden Signalen „present“  $>25\%$  und das „GAPDH-3'/5'-

Verhältnis“  $<3$  sein. Die Hybridisierungskontrollen „BioB“, „BioC“, „BioD“ und „Cre“ sollten im Verhältnis BioB<BioC<BioD<Cre stehen, wobei „BioB“  $>50\%$  „present“ haben sollte. Die PolyA-Kontrollen „Lys“, „Phe“, „Thr“ und „Dap“ sollten alle „present“ mit dem Verhältnis Lys<Phe<Thr<Dap sein.

## 2.6 Datenanalyse

### 2.6.1 Software

<i>Software</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Nutzung</i>
AnnHyb 3.5 beta 15	Olivier Friard	Enzymauswahl, Restriktionsschnittmuster
Agilent Expert 2100	Agilent Technologies GmbH, Waghäusel	RNA-Integrität
BioEdit 7.0.1	Isis Pharmaceuticals Inc., USA	Sequenzalignment
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	Sequenz-Homologie-Analyse
Chromas 2.22	Griffith University, Queensland, Australia	Sequenzanalyse
Cluster 3.0	Michael Eisen, Stanford University	Clusteranalyse
GeneCards	Weizmann Institute of Science	Gen-Datenbank
GeneChip Operating	Affymetrix Inc.	Genexpressionsanalyse
GeneMapper 4.0 SNPlex	Applied Biosystems Inc.	SNPlex-Analyse
GeneScan Analysis 3.7	Applied Biosystems Inc.	Fragmentlängenanalyse
GeneSifter Microarray Analysis	VizX Labs, Seattle, WA, USA	Genexpressionsanalyse
Globocan 2002	International Agency for Research on Cancer	Krebs-Statistiken
Haploview 3.32	Daly Lab of the Broad Institute Cambridge, USA	Linkage Disequilibrium
HapMap	International HapMap Project	Allelfrequenzen
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	Signaling Pathways
LightCycler 3 Software 3.5	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	RNA-Quantifizierung, Real-time-PCR
MagNaPure Software	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Automatische DNA-Extraktion
MS Office (Word, Excel, Powerpoint)	Microsoft Inc.	Tabellen, Grafiken, MAF, HWE
NetAffx™ Analysis Center	Affymetrix Inc.	Genexpressionsanalyse
Oligo 6.6 Analysis Phase 2.0	Molecular Biology Insights Inc., USA Stephens et al. 2001	Primer-Design Haplotypenzerlegung
Primer Designer 2.0	Scientific & Educational Software	Primer-Design
PubMed	NCBI, National Center for Biotechnology	Medizinische Datenbank
Sequencing Analysis	Applied Biosystems Inc.	Sequenzanalyse
SPSS 15.0.1	SPSS Inc., Chicago, Ill	Deskriptive Statistik

## 2.6.2 Statistische Analyse

Erwartete Häufigkeiten der Genotypen ( $n=3$ ) wurden aus den erhaltenen Allelfrequenzen nach Hardy-Weinberg berechnet. Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ( $1=p^2+2pq+q^2$ ) wurden mit Chi-Quadrat-Test und G-Test ermittelt.

Als Effektmaß für die Inzidenz bei retrospektiven Fall-Kontroll-Studien diene das relative Risiko (OR). Es wurde nach  $OR = (a \cdot d) / (c \cdot b)$  mit 95% Konfidenzintervall (CI) gemäß  $c_u = OR \cdot e^{(-1.96 \cdot \sqrt{1/a+1/b+1/c+1/d})}$  (unteres) und  $c_o = OR \cdot e^{(+1.96 \cdot \sqrt{1/a+1/b+1/c+1/d})}$  (oberes) und a, b, c, d als Variablen mit den zugehörigen Größen erhoben. Gegebenenfalls wurde es als 2x2-Tabelle für die entsprechende Zeile gegen eine definierte Referenz (1,00) ermittelt.

Da es im zweiten Kollektiv Altersunterschiede zwischen den Darmkrebspatienten und dem Kontrollkollektiv gab, wurde für diese Studienpopulation ein Wichtungsfaktor zur Alterskorrektur verwendet. Diese Wichtungsvariable wurde aus den Angaben zum Alter bei Erstdiagnose für ein kolorektales Karzinom bei Frauen und Männern (Arbeitsgruppe zur Koordination Klinischer Krebsregister, 1996, <http://www.med.uni-giessen.de/~akkk/spez/>) und der Angabe von 6% im Verlaufe des Lebens an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken (Benecke 2005, <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/05/05H165/prom.pdf>) ermittelt.

Zur Analyse der Ergebnisse wurde das Statistikprogramm SPSS 15.0.1 benutzt. Um Alter, Gewicht, BMI, Größe und die jährliche Zigarettenanzahl zwischen Fällen und Kontrollen zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Der Chi-Quadrat-Test wurde durchgeführt, um Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen bezüglich Geschlecht, Tumorlokalisation, beruflichem Kontakt mit karzinogenen Substanzen, Raucherstatus, gegenwärtigem Alkoholkonsum, Häufigkeit und Art des Fleischkonsums zu identifizieren. Um einzelne SNP-Häufigkeiten mit den Fällen und Kontrollen in Bezug zu bringen, wurde ein zweiseitiger Chi-Quadrat-Test angewendet. Fisher's Exakter Test mit exakter Signifikanz oder mit Monte-Carlo-Approximation (99% CI) wurde genutzt, um Paare der Polymorphismen und komplexe Genotypen mit der Fall-Kontroll-Klassifikation in Verbindung zu bringen. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet. Komplexe Genotypen wurden als Kombinationen aus zwei bis sechs Varianten gebildet. Außerdem wurde eine Bonferroni-Korrektur zur Anpassung des Signifikanzniveaus für multiples Testen durchgeführt.



### 2.6.3 Haplotypen-Analyse

Liegen Mutationen auf einem Chromosom oder befinden sie sich in einem starken Kopplungsungleichgewicht (Linkage-Disequilibrium) zueinander, ist eine Zerlegung komplexer Genotypen in geschätzte Haplotypen sinnvoll. Haplotypen wurden für jedes Individuum mit dem Programm PHASE 2.0 (Stephens et al., 2001) aus den erhaltenen Genotypen ermittelt. Die Haplotypen setzen sich aus Kombinationen von drei bis sechs Polymorphismen zusammen. Die Häufigkeiten und Verteilungen der Haplotypen wurden berechnet. Zur Bestimmung des Kopplungsungleichgewichtes diente Haploview 3.32.

### 2.6.4 Datenanalyse der Mikroarrays

#### Hintergrundkorrektur

Die Ergebnisse der GeneChip-Expressionsanalyse wurden zur weiteren Verarbeitung in Excel exportiert. In Abhängigkeit des Verhältnisses von Match:Mismatch wird für jede Sequenz (Probe-Set-ID) ein Signalwert, ein Detektions-p-Wert und ein Status angegeben: **A**, absent, Detektion- $p \geq 0,06$ ; **M**, marginal, Detektion- $p 0,05 < p < 0,06$ , **P**, present, Detektion- $p \leq 0,05$ . Sequenzen, die die GeneChip Operating Software auf allen 16 Arrays als „absent“ charakterisiert hatte, wurden bei der weiteren Datenanalyse nicht berücksichtigt. Um eine Überbewertung von Fold-Change-Werten, die durch Signale unterhalb der Nachweisgrenze verursacht sind, zu vermeiden, wurde aus den Fold-Change-Werten aller „Absent-Sequenzen“ das geometrische Mittel der Mediane jedes Chips gebildet, als Hintergrundkorrektur definiert und alle verbliebenen Signale unterhalb dieses Wertes auf diese Hintergrundkorrektur heraufgesetzt.

#### Sicherungsstufen

Die verbleibenden Sequenzen wurden als ungepaarte, unabhängige Stichproben nach verschiedenen Kriterien und Sicherungsstufen analysiert. Die Fold-Change-Werte für jede Behandlung vs. Vehikel (Tab. 11) wurden aus den Signalen einzeln berechnet. Um den allgemeinen Fold-Change-Wert zu ermitteln, diente das geometrische Mittel aus den Fold-Change-Werten der parallelen Experimente (Replikate). Die nicht normalverteilten Signale wurde dann logarithmiert (ln) und das arithmetische Mittel gebildet. Um unterschiedlich regulierte Gene zwischen Behandlung mit und ohne Vitamin D festzustellen, wurde für den Vergleich ein t-Test aus den logarithmierten Signalen mit einem Signifikanzniveau von  $< 0,05$

oder  $<0,01$  angewendet. Zwei weitere Sicherungsstufen waren ein Signalwert  $>400$  und ein Fold-Change-Wert  $>1,5$ .

Setzt man voraus, dass aus statistischen Gründen bei ca. 5% der Gene ein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zu erwarten ist ( $p<0,05$ ), aber ca. bei 15% der Gene ein solcher tatsächlich gefunden wurde, sind nur ca. 10% der Gene tatsächlich reguliert. Denn durch den Effekt des multiplen Testens erhält man rein zufällig zahlreiche signifikant regulierte Gene. In dem hier durchgeführten Experiment sind bei einem Signifikanzlevel von  $p<0,05$  ungefähr 60% der Gene, deren Expression sich nach der Behandlung signifikant verändert hat, tatsächlich reguliert, bei einem Signifikanzlevel von  $p<0,01$  sind es 79,2%.

Anschließend wurden die signifikanten Ergebnisse und deren Bedeutung mit GeneSifter Microarray Analysis Software ([www.genesifter.net](http://www.genesifter.net)), PubMed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)), KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg>), BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), GeneCards (<http://www.genecards.org/index.shtml>) und NetAffx<sup>TM</sup> Analysis Center ([www.affymetrix.com/analysis/index.affx](http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx)) detaillierter analysiert.

### **Graphische Darstellung**

Die Expression ausgewählter Gene ist logarithmischer Skalierung dargestellt. Das geometrische Mittel und der Variationskoeffizient (CV) dienen zur SD- und CI-Bestimmung. CV wurde nach  $100 \cdot (e^{SD(\ln(\text{fold change}))} - 1)$  berechnet. Die untere und obere Grenze des Konfidenzintervalls wurde folgendermaßen kalkuliert:  $SD(\ln(\text{fold change})) = \ln(1 + CV/100)$ , untere = fold-Wert  $\cdot e^{-SD(\ln(\text{fold change}))}$ , obere = fold-Wert  $\cdot e^{SD(\ln(\text{fold change}))}$ , wie in Krusekopf et al. (2005) beschrieben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 VDR-Genpolymorphismen

##### 3.1.1 Klinische Daten

Die vorliegende Studie wurde mit 256 Darmkrebspatienten und 256 gepaarten Kontrollen durchgeführt (Flügge et al., 2007). Die Tumorlokalisation und die TNM-Klassifikation sind in Tab. 2 gezeigt. Die Charakteristika der Studienpopulation sind in Tab. 12 dargestellt.

**Tab. 12** Allgemeine Charakteristika der Studienpopulation (n=512)

Variable	Fälle (n=256)	Kontrollen (n=256)	Signifikanz $p^a$	OR	OR (95%CI)
<b>Geschlecht</b>					
Frauen % (n)	0,52 (132)	0,51 (131)	0,930	1,016 (CI 0,718-1,437)	1,00 (Ref.)
Männer % (n)	0,48 (124)	0,49 (125)			1,02 (0,72-1,44)
<b>Alter (29-85 Jahre)</b>					
Jahre (MW +/- SD)	61,9 +/- 10,0	62,2 +/- 11,2	0,580		
<b>BMI (14,37-46,06 m<sup>2</sup>/kg)</b>					
BMI (MW +/- SD)	25,5 +/- 4,1	27,4 +/- 4,7	<0,001		
<b>Gewicht (44-130 kg)</b>					
Gewicht (MW +/- SD)	71,2 +/- 12,2	75,2 +/- 14,0	0,005		
<b>Größe (142-193 cm)</b>					
Größe (MW +/- SD)	166,9 +/- 7,3	165,9 +/- 8,5	0,158		
<b>Packungen/Jahr (Bereich 0-132)</b>					
Packungen/Jahr (MW +/- SD)	13,3 +/- 23,4	11,8 +/- 17,8	0,509		
<b>Exposition gegenüber Karzinogenen</b>					
Ja % (n)	0,16 (42)	0,13 (34)	0,320	1,281 (CI 0,785-2,091)	1,00 (Ref.)
Nein % (n)	0,84 (214)	0,87 (222)			1,28 (0,79-2,09)
<b>Raucherstatus</b>					
Raucher (180 m, 7 w) % (n)	0,34 (86)	0,39 (101)	0,169	0,776 (CI 0,541-1,114)	1,00 (Ref.)
Nichtraucher (69 m, 256 w) % (n)	0,66 (170)	0,61 (155)			0,78 (0,54-1,11)
<b>Alkoholkonsum</b>					
1-2 mal/Woche % (n)	0,49 (126)	0,50 (127)	0,519		1,00 (Ref.)
≥ 2-3 mal/Woche % (n)	0,19 (49)	0,23 (58)			1,17 (0,75-1,85)
Kein Alkohol % (n)	0,32 (81)	0,27 (71)			0,87 (0,58-1,30)
<b>Fleischkonsum</b>					
2-3 mal/Woche % (n)	0,46 (118)	0,43 (110)	0,375		1,00 (Ref.)
1 mal/Woche % (n)	0,16 (42)	0,22 (57)			1,51 (0,93-2,43)
Täglich % (n)	0,37 (94)	0,34 (86)			0,99 (0,67-1,47)
Kein Fleisch	0,01 (2)	0,01 (3)			1,51 (0,25-9,09)
<b>Typ</b>					
Gekocht % (n)	0,70 (178)	0,62 (157)			1,00 (Ref.)
Gebraaten % (n)	0,30 (76)	0,38 (96)			1,41 (0,97-2,04)

<sup>a</sup>Basierend auf Chi-Quadrat-Test oder Mann-Whitney-Test, *P*-Werte sind unkorrigiert angegeben, *OR* relatives Risiko, *CI* 95% Konfidenzintervall, m männlich, w weiblich

BMI und Gewicht waren bei den Fällen etwas geringer (Mann-Whitney-Test,  $p < 0,05$ ), was vermutlich durch Erkrankung und Therapie bedingt ist – die Signifikanz wird deshalb als nicht maßgeblich eingeschätzt. Diese Assoziation bleibt bei einer Korrektur für multiples Testen nicht länger signifikant.

### 3.1.2 Ergebnisse der Genotypisierung

Die Verteilung der Genotypen und die entsprechenden Allelfrequenzen für CDX-2, FokI, BsmI, Tru9I, ApaI und TaqI sind in Tab. 13 dargestellt.

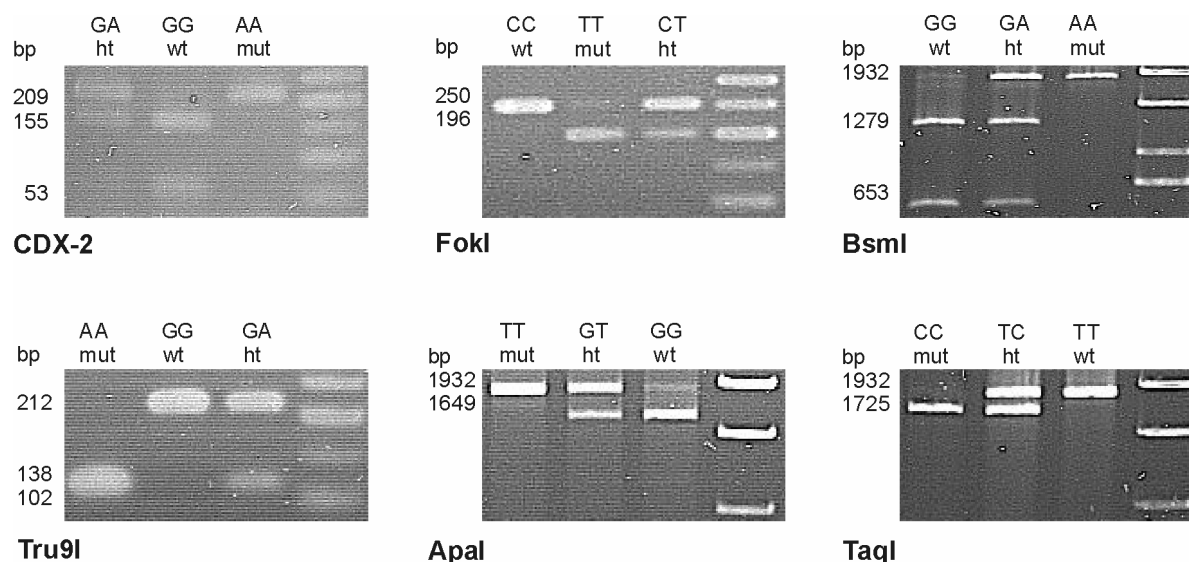
**Tab. 13** Genotyp- und Allelfrequenzen der zwei Studiengruppen

SNP	Fälle (n=256)	Kontrollen (n=256)	Gesamt (n=512)	Signifikanz $p^a$
CDX2	GG	0,41 (104)	0,41 (104)	1,000
	GA	0,50 (128)	0,50 (128)	
	AA	0,09 (24)	0,09 (24)	
	<b>G</b>	<b>0,66</b>	<b>0,66</b>	
	<b>A</b>	<b>0,34</b>	<b>0,34</b>	
FokI	CC	0,30 (76)	0,36 (92)	0,322
	CT	0,51 (132)	0,47 (120)	
	TT	0,19 (48)	0,17 (44)	
	<b>C</b>	<b>0,55</b>	<b>0,59</b>	
	<b>T</b>	<b>0,45</b>	<b>0,41</b>	
BsmI	GG	0,41 (106)	0,41 (105)	0,847
	GA	0,44 (111)	0,45 (116)	
	AA	0,15 (39)	0,14 (35)	
	<b>G</b>	<b>0,63</b>	<b>0,64</b>	
	<b>A</b>	<b>0,37</b>	<b>0,36</b>	
Tru9I	GG	0,83 (213)	0,79 (202)	0,260
	GA	0,15 (38)	0,20 (51)	
	AA	0,02 (5)	0,01 (3)	
	<b>G</b>	<b>0,91</b>	<b>0,89</b>	
	<b>A</b>	<b>0,09</b>	<b>0,11</b>	
ApaI	GG	0,27 (70)	0,27 (70)	0,905
	GT	0,51 (129)	0,49 (125)	
	TT	0,22 (57)	0,24 (61)	
	<b>G</b>	<b>0,53</b>	<b>0,52</b>	
	<b>T</b>	<b>0,47</b>	<b>0,48</b>	
TaqI	TT	0,42 (107)	0,41 (106)	0,952
	TC	0,43 (111)	0,45 (114)	
	CC	0,15 (38)	0,14 (36)	
	<b>T</b>	<b>0,63</b>	<b>0,64</b>	
	<b>C</b>	<b>0,37</b>	<b>0,36</b>	

<sup>a</sup> Chi-Quadrat-Test

Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Kolonkarzinom-Patienten im Bezug auf die Verteilung der Einzelvarianten, auch nicht bei der Kombination von Heterozygoten mit homozygoten Trägern des Minor-Allels.

Die VDR-Polymorphismen CDX-2, FokI, BsmI, Tru9I, ApaI und TaqI wurden für alle Personen der Fall-Kontroll-Studie mit PCR/RFLP bestimmt (Abb. 19).



**Abb. 19** Restriktionsmuster der Vitamin-D-Rezeptor-Genotypisierung. wt, homozygot Wildtyp (Major-Allel); ht, heterozygot mutiert; mut, homozygot mutiert (Minor-Allel); bp, Basenpaare; 50 bp oder 1 kb DNA-Längenstandard; SYBR<sup>®</sup>Gold-Färbung.

### 3.1.3 VDR-Genotypen-Paare

Starke Assoziationen zwischen Paaren der Varianten und der Fall-Kontroll-Klassifizierung wurden festgestellt (Tab. 14).

**Tab. 14** Assoziationsanalyse der Paare von Varianten bei Fällen und Kontrollen

VDR	CDX-2	FokI	BsmI	Tru9I	ApaI
FokI	n.s.				
BsmI	n.s.	n.s.			
Tru9I	n.s.	n.s.	n.s.		
ApaI	n.s.	n.s.	0,053	n.s.	
TaqI	n.s.	n.s.	<0,001 <sup>a</sup>	n.s.	0,017 <sup>b</sup>

p-Werte von Fisher's Exakt Test mit Monte-Carlo-Approximation (99% CI), <sup>a</sup>höchst signifikant nach Bonferroni Korrektur, <sup>b</sup>nicht signifikant nach Bonferroni Korrektur

Während die Einzelvarianten nicht mit der Fall-Kontroll-Klassifizierung in Verbindung gesetzt werden konnten, ergaben Tests mit allen in Betracht kommenden Paaren der Varianten selbst nach Bonferroni-Korrektur eine höchst signifikante Assoziation für das Paar BsmI/TaqI ( $p < 0,001$ , Tab. 14). Der p-Wert für Fisher's Exakt Test war  $2,1 \cdot 10^{-16}$ .

### 3.1.4 VDR-Kopplungsungleichgewicht

Die Haplotypenanalyse lässt ein starkes Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium) zwischen BsmI, ApaI, TaqI und Tru9I erkennen ( $p < 0,001$ , Tab. 15). CDX-2 und FokI zeigen auch eine Kopplung, welche aber deutlich schwächer ist. Keine Variante wies eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht auf.

**Tab. 15** Paarweises Kopplungsungleichgewicht der VDR-Polymorphismen

Variante 1	Variante 2	$D'$ <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>
CDX-2	FokI	0,451	<0,001
CDX-2	BsmI	0,216	<0,001
CDX-2	Tru9I	-0,668	<0,001
CDX-2	ApaI	0,090	0,029
CDX-2	TaqI	0,120	<0,001
FokI	BsmI	0,475	<0,001
FokI	Tru9I	0,303	0,573
FokI	ApaI	0,516	<0,001
FokI	TaqI	0,468	<0,001
BsmI	Tru9I	-0,974	<0,001
BsmI	ApaI	0,934	<0,001
BsmI	TaqI	0,835	<0,001
Tru9I	ApaI	0,982	<0,001
Tru9I	TaqI	-0,922	<0,001
ApaI	TaqI	0,892	<0,001

<sup>a</sup> $D'$  Kopplungsungleichgewicht ( $D'$ -Werte bewegen sich zwischen -1 und +1,  $D'$ -Werte nahe -1 oder +1 gelten als Indikator für eine starke Kopplung von Polymorphismen auf einem Allel), <sup>b</sup>Chi-Quadrat-Test bezogen auf  $D'$

### 3.1.5 VDR-Haplotypen

Die Haplotypenhäufigkeiten sind in Tab. 16 aufgelistet.

**Tab. 16** Haplotypfrequenzen der zwei Studiengruppen

Haplotyp	Fälle	Kontrollen	
111111	72	82	G + + G T + + T
<b>111112</b>	<b>3</b>	<b>15</b>	
111121	3	0	G + + G T + + C
<b>111122</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	
111221	23	29	
<b>112121</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	G + + G C + + C
112122	59	47	
121111	110	81	G + + A T + + T
<b>121112</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	
<b>121122</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	
121221	19	21	G + + A T + + C
<b>122111</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	
<b>122121</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	
122122	46	32	G + + A C + + C
<b>122221</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	
211111	45	36	A + + A T + + T
211211	1	0	
211221	3	4	A + + A T + + C
<b>211222</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	
<b>212111</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	
<b>212121</b>	<b>4</b>	<b>12</b>	A + + A C + + C
212122	68	57	
221111	37	36	
<b>221112</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	
221121	5	2	
<b>221122</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	
221221	1	0	
<b>222111</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	
222122	10	15	

1 Referenzsequenz, 2 mutierte Sequenz, Positionen 1 bis 6 entsprechen CDX-2, FokI, BsmI, Tru9I, ApaI und TaqI

Es stellte sich heraus, dass Personen, die die Kombination G bei BsmI und C bei TaqI oder A bei BsmI und T bei TaqI jeweils auf einem Allel des VDR-Gens tragen, höchstwahrscheinlich der Kontrollgruppe angehören (Abb. 20). Der entsprechende Fisher's Exakt Test mit Monte-Carlo-Approximation (99% CI) ergab die p-Werte  $8,7 \cdot 10^{-7}$  für den Haploypotyp BsmI(G)#TaqI(C) und  $6,8 \cdot 10^{-5}$  für den Haploypotyp BsmI(A)#TaqI(T).

Das relative Risiko für diese Haplotypen ist 0,067 (95% CI, 0,016-0,284) beziehungsweise 0,188 (95% CI, 0,077-0,461), d.h. das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, beträgt für Individuen, die mindestens einen dieser Haplotypen tragen, verglichen mit Nicht-Trägern ca. 7% beziehungsweise 20% (Abb. 20). Gemäß der Bonferroni-Korrektur ist für 21 Signifikanz-Tests (6 SNPs und 15 SNP-Paare gegen Fälle/Kontrollen) ein unkorrigierter p-Wert von  $0,05/21=0,0024$  erforderlich. Somit bleiben die unterschiedlichen Frequenzen der zwei Gruppen von Haplotypen bei Darmkrebspatienten und Kontrollen nach Korrektur für multiples Testen höchst signifikant.

Genotype BsmI/TaqI	GG/TT	GG/TC	GG/CC	GA/CC	GA/TC	GA/TT	AA/TT	AA/TC	AA/CC	
Cases	104	0	2	0	108	0	3	0	3	36
Controls	80	17	8	2	94	0	20	6	3	26
Haplotype										
Protective haplotype										
Carrier										
Cases			2				6			
Controls			27				29			
Non carrier										
Cases			254				250			
Controls			229				227			
OR [95% CI]			<b>0.067</b> (0.016 – 0.284)				<b>0.188</b> (0.077 – 0.461)			

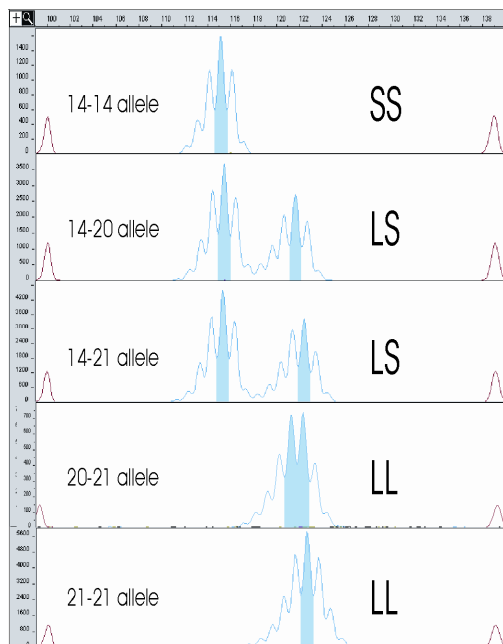
**Abb. 20** Häufigkeit der Genotypen und geschätzten Haplotypen für die BsmI[G/A]-TaqI[T/C]-Kombinationen bei Fällen und Kontrollen (SPSS 15.0.1, Phase 2.0).

Die Schutz-Haplotypen BsmI(G)#TaqI(C) und BsmI(A)#TaqI(T) sind durch graue Quadrate hervorgehoben. Bei der häufigsten Kombination (108 Fälle, 94 Kontrollen) handelt es sich um BsmI(GA)/TaqI(TC); die theoretisch mögliche Alternative BsmI(GC)/TaqI(AT) wurde durch Haplotypenanalyse und das paarweise Kopplungsungleichgewicht (Tab. 15) ausgeschlossen. OR relatives Risiko, CI Konfidenzintervall (aus Flügge et al., 2007)



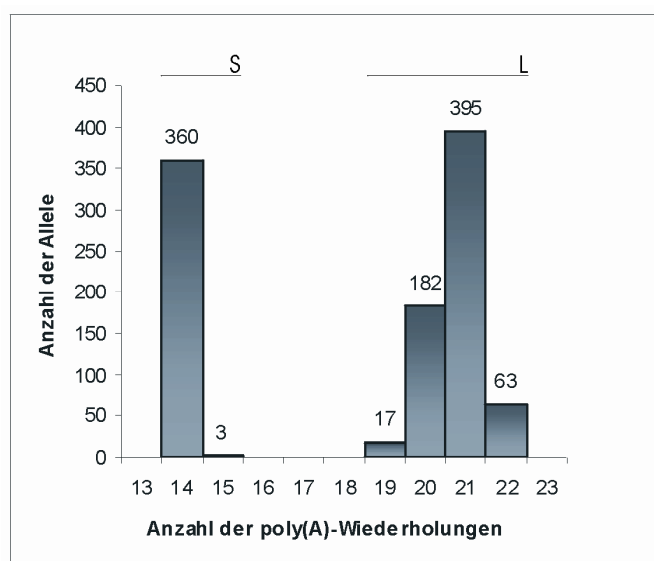
### 3.1.6 Vitamin-D-Rezeptor-poly(A)-Mikrosatellit

Die Anzahl der VDR-poly(A)-Wiederholungen wurde bei 255 Darmkrebspatienten und 255 gepaarten Kontrollen kaukasischer Herkunft mit einer Kombination aus GeneScan®- und Sequenzierungsanalyse bestimmt (Flügge et al, 2008). In Abb. 21 sind GeneScan®-Bilder für einige Allelgruppen beispielhaft gezeigt, wobei Allele mit weniger als 18 A-Wiederholungen mit „S“ und Allele mit mehr als 18 A-Wiederholungen mit „L“ bezeichnet werden.



**Abb. 21** Ergebnis der Bestimmung der VDR-Polymorphismus-poly(A)-Allele mittels GeneScan®- und Sequenzierungsanalyse. LL, lange Variante, homozygot Wildtyp, 19-22 Wiederholungen; LS, heterozygot mutiert; SS, kurze Variante, homozygot mutiert, 14-15 Wiederholungen.

Das Histogramm der VDR-poly(A)-Mikrosatelliten-Allele zeigt eine durch eine Lücke getrennte bimodale Verteilung mit einem Minimum bei 14 und einem Maximum bei 22 A-Wiederholungen (Abb. 22). Am häufigsten sind 14 (S) und 21 (L) A-Wiederholungen.



**Abb. 22** Häufigkeitsverteilung der Allele des VDR-poly(A)-Mikrosatelliten in der Studienpopulation. Beide Allele der 255 Fälle und 255 Kontrollen sind dargestellt (aus Flügge et al. 2008). S, <18 A-Wiederholungen, L, ≥18 A-Wiederholungen.

Die Verteilung der Genotypen, das relative Risiko (OR), die Allelfrequenzen der Major- und Minor-Allele und der einzelnen Allelgruppen (z. B. 14-15, 20-20, 20-22) bei Fällen und Kontrollen zeigt Tab. 17. Der Chi-Quadrat-Test ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen ( $p=0,609$  für LL/SS und  $p=0,090$  für Allelgruppen).

**Tab. 17** Verteilung der Genotypen und Allele des VDR-poly(A)-Mikrosatelliten

Variante	A-Anzahl	Allele	Fälle n (%) n=255	Kontrollen n (%) n=255	Gesamt n (%) n=510	OR (95% CI)
poly(A) [LL/SS]						
<18		SS	36 (14,1)	32 (12,5)	68 (13,3)	0,95 (0,55-1,64)
		LS	108 (42,4)	119 (46,7)	227 (44,5)	1,18 (0,81-1,71)
>18		LL	111 (43,5)	104 (40,8)	215 (42,2)	1,00 (Ref.)
$p^a$ -Wert					0,609	
<b>Allelfrequenz</b>		<b>S</b>	<b>0,35</b>	<b>0,36</b>	<b>0,36</b>	
		<b>L</b>	<b>0,65</b>	<b>0,64</b>	<b>0,64</b>	
poly(A) Allel-Gruppen						
14-14		SS	34 (13,3)	32 (12,5)	66 (12,9)	1,00 (Ref.)
14-15			2 (0,8)	0 (0,0)	2 (0,4)	N.A.
14-19		LS	2 (0,8)	4 (1,6)	6 (1,2)	2,13 (0,36-12,41)
14-20			20 (7,8)	31 (12,2)	51 (10,0)	1,65 (0,78-3,46)
14-21			66 (25,9)	77 (30,2)	143 (28,0)	1,24 (0,69-2,22)
14-22			19 (7,5)	7 (2,7)	26 (5,1)	0,39 (0,15-1,06)
15-21			1 (0,4)	0 (0,0)	1 (0,2)	N.A.
19-20		LL	5 (2,0)	1 (0,4)	6 (1,2)	0,21 (0,02-1,92)
19-21			3 (1,2)	2 (0,8)	5 (1,0)	0,71 (0,11-4,52)
20-20			6 (2,4)	11 (4,3)	17 (3,3)	1,95 (0,64-5,89)
20-21			38 (14,9)	35 (13,7)	73 (14,3)	0,98 (0,50-1,91)
20-22			9 (3,5)	9 (3,5)	18 (3,5)	1,06 (0,37-3,01)
21-21			37 (14,6)	41 (16,1)	78 (15,3)	1,18 (0,61-2,27)
21-22			12 (4,7)	5 (2,0)	17 (3,3)	0,44 (0,14-1,40)
22-22			1 (0,4)	0 (0,0)	1 (0,2)	N.A.
$p^a$ -Wert					0,090	
<b>Allelfrequenz</b>		<b>14</b>	<b>0,35</b>	<b>0,36</b>	<b>0,35</b>	
		<b>15</b>	<b>0,006</b>	<b>0,000</b>	<b>0,003</b>	
		<b>19</b>	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>	<b>0,02</b>	
		<b>20</b>	<b>0,16</b>	<b>0,19</b>	<b>0,18</b>	
		<b>21</b>	<b>0,38</b>	<b>0,39</b>	<b>0,39</b>	
		<b>22</b>	<b>0,08</b>	<b>0,04</b>	<b>0,06</b>	

<sup>a</sup> $p$ -Wert basierend auf Chi-Quadrat-Test; Referenzsequenz AY342401 (GI 32891816); LL, homozygot für Major-Allel; LS, heterozygot; SS, homozygot für Minor-Allel; L, lang ( $\geq 18$  A-Wiederholungen); S, kurz ( $< 18$  A-Wiederholungen); OR, relatives Risiko; CI, Konfidenzintervall; Häufigkeiten des Major- und Minor-Allels und der Allel-Gruppen sind fettgedruckt dargestellt

Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Darmkrebspatienten in Bezug auf die LL/SS-Verteilung oder die einzelnen Allelgruppen. Unter Berücksichtigung der Tumorlokalisation ergab die Differenzierung von Rektumkarzinom, Kolonkarzinom und Kontrollen keine Assoziation zwischen diesen drei Gruppen und poly(A) ( $p=0,376$  für LL/SS,  $p=0,072$  für die Allelgruppen). Keine Einzelvariante und keine Allelgruppe wies eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht auf.

Bei der Verknüpfung der poly(A)-Ergebnisse mit den Daten zu den VDR-Polymorphismen CDX-2, FokI, BsmI, Tru9I, ApaI und TaqI zeigte sich, dass komplexe Genotypen mit poly(A) zwischen Darmkrebspatienten und Kontrollen unterschiedlich verteilt waren. Die paarweise Analyse ergab einen signifikanten Unterschied für poly(A)-TaqI ( $p=7,29 \cdot 10^{-6}$ ) und poly(A)-BsmI ( $p=0,0062$ ) (Tab. 18) sowie für den komplexen Genotyp poly(A)-TaqI-BsmI ( $p < 1 \cdot 10^{-15}$ , Fisher's Exakter Test mit Monte-Carlo-Approximation).

**Tab. 18** Signifikanzen der Paare von Polymorphismen bei Fällen und Kontrollen

VDR	TaqI	ApaI	Tru9I	BsmI	FokI	CDX-2
<b>Poly(A)</b>	<b><math>7,29 \cdot 10^{-6}</math></b> <sup>b</sup>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	<b>0,006</b> <sup>c</sup>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>
TaqI		0,021 <sup>a, c</sup>	n.s.	$< 1 \cdot 10^{-15}$ <sup>a, b</sup>	n.s.	n.s.
ApaI			n.s.	0,069 <sup>c</sup>	n.s.	n.s.
Tru9I				n.s.	n.s.	n.s.
BsmI					n.s.	n.s.
FokI						n.s.

Fisher's Exakter Test mit exakter Signifikanz oder <sup>a</sup>Monte-Carlo-Approximation; <sup>b</sup>höchstsignifikant selbst nach Bonferroni-Korrektur; <sup>c</sup>nicht signifikant nach Bonferroni-Korrektur;  $p$ -Werte sind unkorrigiert angegeben

Gemäß der Bonferroni-Korrektur ist für 9 Signifikanz-Tests (poly(A) LL/SS, Allelgruppen, 6 Paare von komplexen Genotypen mit poly(A) und das poly(A)-TaqI-BsmI-Haplotyp-Tripel gegen Fälle/Kontrollen) ein unkorrigierter  $p$ -Wert von  $0,05/9=0,0056$  erforderlich. Somit bleibt der Unterschied zwischen komplexen Genotypen bei Darmkrebspatienten und Kontrollen nach Korrektur für multiples Testen höchst signifikant für das Paar poly(A)-TaqI und den komplexen Genotyp poly(A)-TaqI-BsmI, während der  $p$ -Wert des Paares poly(A)-BsmI die Bonferroni-Grenze geringfügig überschreitet.

Die Allelverteilung von poly(A), TaqI und BsmI wurde durch Haplotypenanalyse berechnet. Die Verteilung der 8 resultierenden möglichen Haplotypen zwischen Fällen und Kontrollen

ist in Tab. 19 dargestellt. Die kopplungskonformen Haplotypen poly(A)(L)#TaqI(T)#BsmI(G) und poly(A)(S)#TaqI(C)#BsmI(A) waren mit Abstand am häufigsten und zeigten keine Abweichung zwischen beiden Gruppen. Die Haplotypen mit einem Bruch der Kopplung zwischen TaqI und BsmI, also TaqI(C)#BsmI(G) und TaqI(T)#BsmI(A) (fett markiert in Tab. 19), waren deutlich überrepräsentiert in der Kontrollgruppe und wurden bereits als protektiv bezüglich der Inzidenz von kolorektalen Karzinomen beschrieben (Flügge et al., 2007), während die Haplotypen mit einem Bruch der Kopplung nur zwischen poly(A) und TaqI, poly(A)(S)#TaqI(T)#BsmI(G) und poly(A)(L)#TaqI(C)#BsmI(A), zu selten für eine Analyse waren. Die Allele poly(A)(S)#TaqI(T), poly(A)(L)#TaqI(C) und poly(A)(S)#BsmI(G) waren invers assoziiert mit dem Vorkommen von kolorektalen Karzinomen, poly(A)(L)#BsmI(A) überschreitet die Bonferroni-Korrektur.

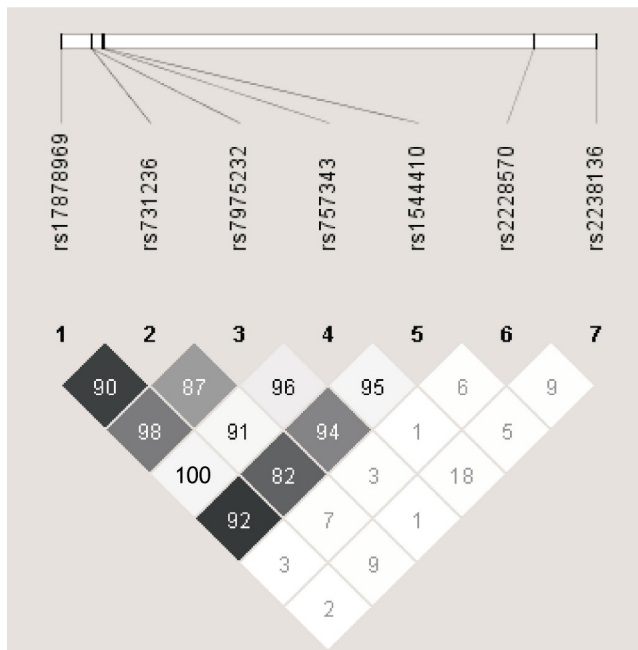
**Tab. 19** Haplotypenverteilung der VDR-poly(A)-TaqI-BsmI-Allele in der Studienpopulation

Haplotypen	poly(A)-TaqI	poly(A)-BsmI	BsmI-TaqI <sup>c</sup>	Fälle	Kontrollen	Gesamt
				n	n	n
poly(A)-TaqI-BsmI						
L-T-G				318	288	606
S-T-G	+	+		0	2	2
<b>L-C-G</b>	+		+	<b>4</b>	<b>20</b>	<b>24</b>
<b>S-C-G</b>		+	+	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
<b>L-T-A</b>		+	+	<b>6</b>	<b>16</b>	<b>22</b>
<b>S-T-A</b>	+		+	<b>0</b>	<b>19</b>	<b>19</b>
L-C-A	+	+		2	3	5
S-C-A				180	147	327
Gesamt				510	510	1020
	S-T	S-G	C-G			
OR (95% CI)	0,49 (0,46-0,52)	0,49 (0,46-0,52)	0,54 (0,48-0,61)			
p-Wert <sup>a</sup>	7,73·10 <sup>-7</sup>	1,33·10 <sup>-5</sup>	2,08·10 <sup>-7</sup>			
	L-C	L-A	T-A			
OR (95% CI)	0,62 (0,51-0,75)	0,70 (0,55-0,90)	0,57 (0,49-0,66)			
p-Wert <sup>a</sup>	2,01·10 <sup>-3</sup>	4,92·10 <sup>-2</sup> <sup>b</sup>	3,20·10 <sup>-6</sup>			

<sup>a</sup> p-Werte basierend auf Chi-Quadrat-Testung; <sup>b</sup> nicht signifikant nach Bonferroni-Korrektur; p-Werte sind unkorrigiert angegeben; <sup>c</sup> Die von der Kopplung abweichenden Kombinationen BsmI(G)#TaqI(C) und BsmI(A)#TaqI(T), kürzlich als Schutzhaplotypen gegenüber kolorektalem Karzinom beschrieben (Flügge et al., 2007), sind fettgedruckt dargestellt; Haplotypen, die aus der Kopplung ausbrechen, sind jeweils mit einem Pluszeichen (+) markiert; alle Individuen sind mit ihren zwei Allelen dargestellt; OR, relatives Risiko; CI, Konfidenzintervall

Der poly(A)-Mikrosatellit befindet sich in einem starken Kopplungsungleichgewicht (LD) mit BsmI, Tru9I, ApaI und TaqI. Poly(A) ist nicht mit CDX-2 und FokI gekoppelt. Das LD-

Schema (Abb. 23) gibt den D'-Wert (Zahlen in den Rauten, 100-fach) und den Korrelationskoeffizienten im Quadrat ( $r^2$ ) zwischen zwei Loci in Grautönen wieder. Hohe D'- und  $r^2$ -Werte deuten auf eine starke Kopplung zwischen Polymorphismen auf einem Chromosomenstrang hin. Die Kopplung von Tru9I konnte aufgrund der geringen Häufigkeit des Minor-Allels (0,10) nicht durch den  $r^2$ -Wert nachgewiesen werden.



**Abb. 23** Kopplung des poly(A)-Mikrosatelliten mit den untersuchten VDR-Polymorphismen. Haploview 3.32,  $r^2$ -Farbschema,  $r^2=0$  weiß,  $0 < r^2 < 1$  grau,  $r^2=1$  schwarz. Reihenfolge der VDR-Polymorphismen:

- 1 - poly(A) (rs17878969),
- 2 - TaqI (rs731236),
- 3 - ApaI (rs7975232),
- 4 - Tru9I (rs757343),
- 5 - BsmI (rs1544410),
- 6 - FokI (rs2228570),
- 7 - CDX-2 (rs2238136).

## 3.2 Polymorphismen von Genen des Vitamin-D-Metabolismus

### 3.2.1 Klinische Daten

Die Studie zur Genotypisierung von Vitamin-D-regulierenden Genen (CYP) wurde mit 452 Darmkrebspatienten und 476 Kontrollen aus Deutschland durchgeführt (Tab. 20). Die Tumorlokalisation und die TNM-Klassifikation sind in Tab. 3 gezeigt.

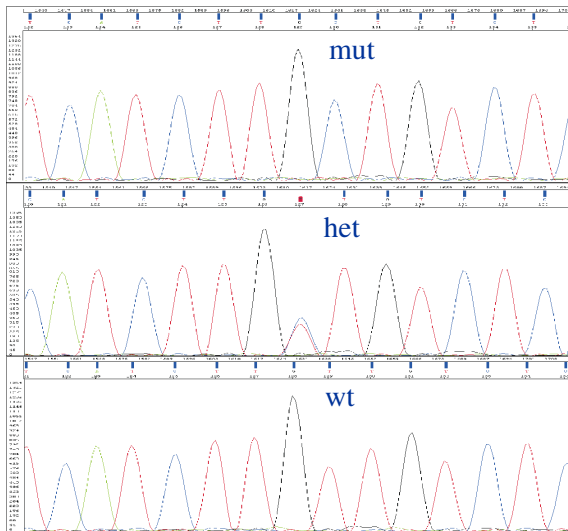
**Tab. 20** Generelle Charakterisierung der Studienpopulation (n=928)

	Fälle n=452	Kontrollen n=476	Signifikanz $p^a$
Geschlecht <sup>a</sup>			
Männer	281 (44,9%)	344 (55,1%)	<0,001
Frauen	171 (56,4%)	132 (43,6%)	
Alter (Bereich) <sup>b</sup>	33-89	19-69	
Jahre	65,24 ± 10,24	37,01 ± 12,31	<0,001

<sup>a</sup>Basierend auf Chi-Quadrat-Test oder <sup>b</sup>Mann-Whitney-Test, P-Werte sind unkorrigiert angegeben, MW +/- SD, relatives Risiko für Geschlecht gegen Zugehörigkeit zu Patienten- oder Kontrollgruppe: 1,254 (CI 1,100-1,431), CI 95% Konfidenzintervall

### 3.2.2 Ergebnisse der Multiplex-Analyse

Alle in Tab. 7 dargestellten CYP27B1-, CYP27A1- und CYP24A1-Polymorphismen wurden mittels SNplex-Technologie und Sequenzierung (Abb. 24) bestimmt. Keine der 10 Varianten wies wesentliche Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht auf.



**Abb. 24** Sequenzierung des Polymorphismus CYP27B1<sub>+2838</sub> [T/C] (beispielhaft). wt, Wildtyp homozygot; ht, heterozygot; mut, homozygot mutiert.

Die Ergebnisse der Genotypisierung sind in den Tab. 21, 22 und 23 dargestellt. Tab. 21 zeigt die Verteilung der Genotypen und die entsprechenden Allelfrequenzen des Minor-Allels für alle 10 untersuchten Polymorphismen der Gene CYP27B1, CYP27A1 und CYP24A1 bei Patienten und Kontrollen. Bei den Einzelvarianten ergab sich keine Assoziation zur Fall-Kontroll-Klassifikation.

Desweiteren wurde getestet, ob zwischen den Einzelvarianten und der Lokalisation des Tumors eine Verbindung besteht. Wie Tab. 22 zeigt, kommt bei Kolon-Karzinom-Patienten das CYP27B1<sub>-1077</sub>-Wildtyp-Allel (GG bzw. G) häufiger vor, während die mutierte Variante (CC bzw. C) des CYP27B1<sub>-1077</sub> Polymorphismus in dieser Gruppe unterrepräsentiert ist ( $p=0,042$ ). Einer Korrektur für multiples Testen würde diese Assoziation nicht standhalten. Alle anderen Vergleiche zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Eine nach Geschlechtern getrennte Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede in der Genotypen- bzw. Allelverteilung (Tab. 23). Die Testung der Einzelvarianten nach verschiedenen Vererbungsmodellen (dominant, rezessiv, overdominant) ergab keine signifikanten Unterschiede (nicht dargestellt).

**Tab. 21** Genotypen und Allelfrequenzen bei 452 Patienten mit kolorektalem Karzinom und 476 Kontrollen

rs- Nummer	Gen	SNP	Basen- wechsel <sup>a</sup>	Wildtyp		Heterozygot		Homozygot mutiert		Minor-Allel-Frequenz		Signifikanz <i>P</i> <sup>c</sup>
				Fälle % (n)	Kontrollen <sup>b</sup> % (n)	Fälle % (n)	Kontrollen <sup>b</sup> % (n)	Fälle % (n)	Kontrollen <sup>b</sup> % (n)	Fälle	Kontrollen <sup>d</sup>	
rs10877012	CYP27B1	<b>-1260</b>	[G/T]	39,2 (166)	43,4 (188)	49,8 (211)	47,1 (204)	11,1 (47)	9,6 (41)	<b>0,36</b>	<b>0,33</b>	0,400
rs3782130	CYP27B1	<b>-1077</b>	[G/C]	38,8 (164)	43,2 (187)	50,1 (212)	47,4 (205)	11,1 (47)	9,4 (41)	<b>0,36</b>	<b>0,33</b>	0,380
rs4646536	CYP27B1	<b>+ 2838</b>	[T/C]	38,9 (168)	42,2 (188)	50,0 (216)	47,9 (213)	11,1 (48)	10,0 (44)	<b>0,36</b>	<b>0,34</b>	0,565
rs4674338	CYP27A1	<b>_I1_200</b>	[G/A]	34,0 (150)	34,5 (153)	46,9 (207)	48,2 (213)	19,0 (84)	17,3 (77)	<b>0,43</b>	<b>0,41</b>	0,815
rs11677711	CYP27A1	<b>_I1_500</b>	[G/T]	91,7 (387)	91,7 (409)	7,6 (32)	8,3 (37)	0,7 (3)	0,0 (0)	<b>0,05</b>	<b>0,04</b>	0,252
rs4674345	CYP27A1	<b>_I1_628</b>	[A/G]	23,5 (103)	26,8 (121)	51,3 (225)	48,6 (220)	25,3 (111)	24,6 (111)	<b>0,51</b>	<b>0,49</b>	0,520
rs6709815	CYP27A1	<b>_I2_540</b>	[G/T]	24,9 (104)	29,3 (130)	50,7 (212)	47,6 (212)	24,4 (102)	23,1 (103)	<b>0,50</b>	<b>0,47</b>	0,361
rs17219315	CYP24A1	<b>_I2_352</b>	[A/G]	96,0 (383)	95,5 (418)	3,8 (15)	4,3 (19)	0,3 (1)	0,2 (1)	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	0,864
rs2762942	CYP24A1	<b>_I2_400</b>	[A/G]	89,0 (397)	87,7 (398)	10,5 (47)	12,1 (55)	0,4 (2)	0,2 (1)	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>	0,621
rs2296241	CYP24A1	<b>_E4_400</b>	[A/G]	28,4 (125)	27,1 (118)	48,2 (212)	50,6 (221)	23,4 (103)	22,3 (97)	<b>0,48</b>	<b>0,48</b>	0,769

<sup>a</sup> Basenwechsel [Major-Allel / Minor-Allel]; <sup>b</sup> Chi-Quadrat-Test der Einzelvarianten gegen die Fall-Kontroll-Klassifikation, Fisher's Exakter Test mit Monte-Carlo-Approximation (99% CI); <sup>c</sup> Kontrollen sind mittels Alterskorrektur adjustiert; p-Werte sind unkorrigiert angegeben; SNP, Einzelnukleotidaustausch, single nucleotide polymorphism

**Tab. 22** Genotypen der Studiengruppen nach Tumorlokalisation

rs-Nummer	Gen	SNP	Basen- wechsel <sup>a</sup>	Wildtyp			Heterozygot			Homozygot mutiert			Signifikanz <i>P</i> <sup>a</sup>	Signifikanz <i>P</i> <sup>b</sup>
				Kontrollen <sup>c</sup> n	Rektum n	Kolon n	Kontrollen <sup>c</sup> n	Rektum n	Kolon n	Kontrollen <sup>c</sup> n	Rektum n	Kolon n		
rs10877012	CYP27B1	<b>-1260</b>	[G/T]	188	72	94	204	100	111	42	29	18	0,151	0,087
rs3782130	CYP27B1	<b>-1077</b>	[G/C]	187	70	94	205	100	112	41	30	17	0,074	<b>0,042</b>
rs4646536	CYP27B1	<b>+ 2838</b>	[T/C]	188	72	96	213	103	113	44	29	19	0,218	0,099
rs4674338	CYP27A1	<b>_I1_200</b>	[G/A]	153	70	80	213	101	106	77	37	47	0,911	0,763
rs11677711	CYP27A1	<b>_I1_500</b>	[G/T]	409	181	206	37	16	16	0	2	1	0,322	0,786
rs4674345	CYP27A1	<b>_I1_628</b>	[A/G]	121	46	57	220	106	119	111	59	52	0,566	0,433
rs6709815	CYP27A1	<b>_I2_540</b>	[G/T]	130	46	58	212	99	113	103	53	49	0,507	0,524
rs17219315	CYP24A1	<b>_I2_352</b>	[A/G]	418	182	201	19	7	8	1	0	1	0,954	1,000
rs2762942	CYP24A1	<b>_I2_400</b>	[A/G]	398	189	208	55	22	25	1	1	1	0,874	1,000
rs2296241	CYP24A1	<b>_E4_400</b>	[A/G]	118	58	67	221	107	105	97	45	58	0,747	0,504

<sup>a</sup> Chi-Quadrat-Test für Kontrollen gegen Rektumkarzinom-Patienten gegen Kolonkarzinom-Patienten; <sup>b</sup> Chi-Quadrat-Test für Rektumkarzinom-Patienten gegen Kolonkarzinom-Patienten; <sup>c</sup> Kontrollen sind mittels Alterskorrektur adjustiert; SNP, Einzelnukleotidaustausch, single nucleotide polymorphism



**Tab. 23** Genotypen der Studiengruppen nach Geschlecht

rs- Nummer	Gen	SNP	Frauen (n=303)							Männer (n=625)						
			Fälle			Kontrollen <sup>a</sup>			<i>P</i> <sup>b</sup>	Fälle			Kontrollen <sup>a</sup>			<i>P</i> <sup>b</sup>
			wt % (n)	ht % (n)	mut % (n)	wt % (n)	ht % (n)	mut % (n)		wt % (n)	ht % (n)	mut % (n)	wt % (n)	ht % (n)	mut % (n)	
rs10877012	CYP27B1	<b>-1260</b>	32,7 (56)	51,5 (88)	10,5 (18)	34,3 (45)	47,9 (63)	10,0 (13)	0,910	39,1 (110)	43,8 (123)	10,3 (29)	41,5 (142)	40,9 (140)	8,2 (28)	0,581
rs3782130	CYP27B1	<b>-1077</b>	32,2 (55)	52,0 (89)	9,9 (17)	34,3 (45)	48,6 (64)	9,3 (12)	0,893	38,8 (109)	43,8 (123)	10,7 (30)	41,2 (142)	40,9 (140)	8,2 (28)	0,488
rs4646536	CYP27B1	<b>2838</b>	33,3 (57)	51,5 (88)	11,1 (19)	34,3 (45)	49,3 (65)	9,3 (12)	0,869	39,5 (111)	45,6 (128)	10,3 (29)	41,5 (142)	43,1 (148)	9,3 (32)	0,792
rs4674338	CYP27A1	<b>_I1_200</b>	32,7 (56)	44,4 (76)	20,5 (35)	30,7 (41)	47,1 (62)	16,5 (22)	0,711	33,5 (94)	46,6 (131)	17,4 (49)	32,7 (112)	43,9 (151)	16,0 (55)	0,969
rs11677711	CYP27A1	<b>_I1_500</b>	91,2 (156)	4,7 (8)	0,0 (0)	88,6 (117)	6,4 (9)	0,0 (0)	0,457	82,2 (231)	8,5 (24)	1,1 (3)	84,9 (291)	8,2 (28)	0,0 (0)	0,187
rs4674345	CYP27A1	<b>_I1_628</b>	25,1 (43)	49,1 (84)	22,8 (39)	27,9 (37)	44,2 (59)	23,6 (31)	0,754	21,4 (60)	50,2 (141)	25,6 (72)	24,5 (84)	47,0 (161)	23,3 (80)	0,544
rs6709815	CYP27A1	<b>_I2_540</b>	25,1 (43)	50,3 (86)	19,9 (34)	30,7 (41)	41,4 (55)	22,9 (30)	0,292	21,7 (61)	44,8 (126)	24,2 (68)	26,1 (90)	45,9 (157)	21,2 (73)	0,405
rs17219315	CYP24A1	<b>_I2_352</b>	88,9 (152)	3,5 (6)	0,0 (0)	88,6 (117)	3,6 (5)	0,0 (0)	1,000	82,2 (231)	3,2 (9)	0,4 (1)	87,7 (301)	4,1 (14)	0,3 (1)	0,917
rs2762942	CYP24A1	<b>_I2_400</b>	86,0 (147)	11,7 (20)	0,6 (1)	81,4 (108)	13,6 (18)	0,7 (1)	0,804	89,0 (250)	9,6 (27)	0,4 (1)	84,6 (290)	10,7 (37)	0,0 (0)	0,505
rs2296241	CYP24A1	<b>_E4_400</b>	25,7 (44)	48,5 (83)	22,2 (38)	20,7 (27)	49,3 (65)	22,9 (30)	0,678	28,8 (81)	45,9 (129)	23,1 (65)	26,4 (91)	45,3 (156)	19,5 (67)	0,747

<sup>a</sup> Kontrollen sind mittels Alterskorrektur adjustiert; <sup>b</sup> Chi-Quadrat-Test; wt, Wildtyp homozygot; ht, heterozygot; mut, homozygot mutiert; SNP, Einzelnukleotidaustausch, single nucleotide polymorphism

### 3.2.3 Korrelationen von Genotypen

Um potenzielle Assoziationen zu ermitteln, wurden für alle Einzelvarianten (Tab. 21, 22, 23) und alle Variantenpaare Chi-Quadrat-Tests bei Fällen und Kontrollen durchgeführt (Tab. 24). Assoziationen zwischen Paaren der Varianten und der Fall-Kontroll-Klassifizierung konnten nicht festgestellt werden.

Komplexe Genotypen aus zwei SNPs wurden außerdem gebildet und in Haplotypen zerlegt und daraus Diplotypen gebildet. Die Chi-Quadrat-Testung dieser Diplotypen (Kombination aus zwei Haplotypen) ergab keine Signifikanzen (nicht dargestellt).

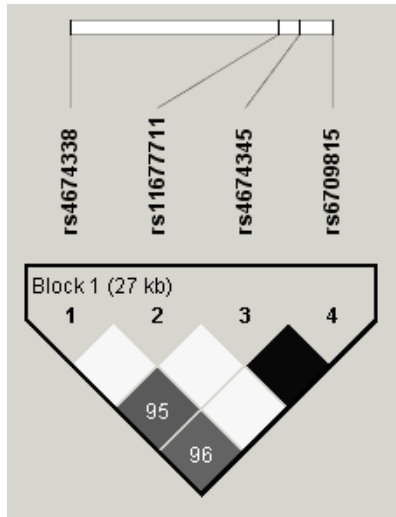
**Tab. 24** Assoziationsanalyse der Variantenpaare von CYP27B1, CYP24A1 und CYP27A1 bei Fällen und Kontrollen

		CYP27B1			CYP27A1				CYP24A1		
p-Wert <sup>a</sup>		rs10877012	rs3782130	rs4646536	rs4674338	rs11677711	rs4674345	rs6709815	rs17219315	rs2762942	rs2296241
		<b>-1260</b>	<b>-1077</b>	<b>+2838</b>	<b>_I1_200</b>	<b>_I1_500</b>	<b>_I1_628</b>	<b>_I2_540</b>	<b>_I2_352</b>	<b>_I2_400</b>	<b>_E4_400</b>
<b>CYP27B1</b>	rs10877012	<b>-1260</b>									
	rs3782130	<b>-1077</b>	0,546								
	rs4646536	<b>+2838</b>	0,307	0,400							
<b>CYP27A1</b>	rs4674338	<b>_I1_200</b>	0,957	0,958	0,987						
	rs11677711	<b>_I1_500</b>	0,394	0,367	0,586	0,645					
	rs4674345	<b>_I1_628</b>	0,856	0,831	0,959	0,349	0,336				
	rs6709815	<b>_I2_540</b>	0,489	0,519	0,766	0,485	0,322	0,605			
<b>CYP24A1</b>	rs17219315	<b>_I2_352</b>	0,392	0,379	0,611	0,881	0,858	0,618	0,481		
	rs2762942	<b>_I2_400</b>	0,587	0,559	0,671	0,760	0,715	0,799	0,545	0,962	
	rs2296241	<b>_E4_400</b>	0,612	0,685	0,917	0,726	0,462	0,847	0,886	0,997	0,967

<sup>a</sup>Fisher's Exakter Test mit Monte-Carlo-Approximation (99% CI) der Paarkombinationen gegen die Fall-Kontroll-Klassifikation ( $n \cdot (n-1) / 2 = 45$  mögliche Paare)

### 3.2.4 Kopplungsanalyse

Die Kopplungsanalyse für CYP27A1 zeigt, dass alle 4 untersuchten Polymorphismen in einem Block liegen ( $p < 0,001$ , Abb. 25, Tab. 25). Die 3 CYP24A1-Varianten sind dagegen nur teilweise gelinkt (Abb. 26, Tab. 26). Nach Haplotypenanalyse wurde desweiteren ein starkes Kopplungsungleichgewicht der 3 untersuchten CYP27B1-Varianten gefunden ( $p < 0,001$ , Tab. 27). Alle untersuchten Varianten des CYP27B1-Gens sind stark in einem Block untereinander gelinkt ( $p < 0,001$ ). Die 3 möglichen Paare sind in Abb. 27 abgebildet.

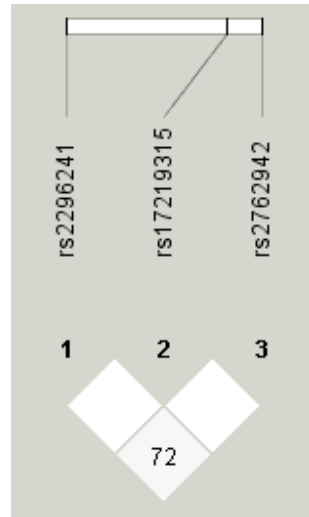


**Abb. 25** Paarweise Kopplung der CYP27A1-Polymorphismen aus geschätzten Haplotypen (Phase 2.0, Haploview 3.32). Reihenfolge der Polymorphismen: **1** \_I1\_200 (rs4674338), **2** \_I1\_500 (rs11677711), **3** \_I1\_628 (rs4674345), **4** \_I2\_540 (rs6709815).

**Tab. 25** Paarweises Kopplungsungleichgewicht der CYP27A1-Polymorphismen

Variante 1	Variante 2	D' <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>
_I1_200	_I1_628	-0,865	<0,001
_I1_200	_I1_500	<b>-1,000</b>	<0,001
_I1_200	_I2_540	-0,872	<0,001
_I1_628	_I1_500	<b>1,000</b>	<0,001
_I1_628	_I2_540	<b>1,000</b>	<0,001
_I1_500	_I2_540	<b>1,000</b>	<0,001

<sup>a</sup>D' Kopplungsungleichgewicht; <sup>b</sup>Chi-Quadrat-Test bezogen auf D'

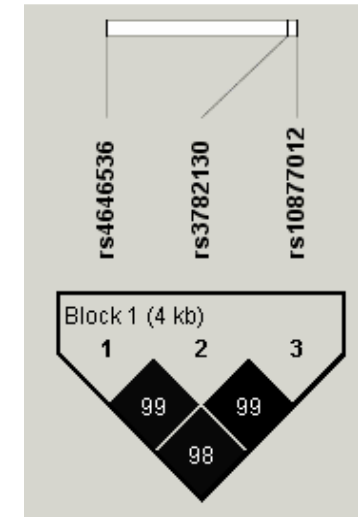


**Abb. 26** Paarweise Kopplung der CYP24A1-Polymorphismen aus geschätzten Haplotypen (Phase 2.0, Haploview 3.32). Reihenfolge der Polymorphismen: **1** \_E4\_400 (rs2296241), **2** \_I2\_352 (rs17219315), **3** \_I2\_400 (rs2762942).

**Tab. 26** Paarweises Kopplungsungleichgewicht der CYP24A1-Polymorphismen

Variante 1	Variante 2	D' <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>
_I2_400	_E4_400	0,883	<0,001
_I2_400	_I2_352	<b>-1,000</b>	0,277
_E4_400	_I2_352	<b>-1,000</b>	<0,001

<sup>a</sup>D' Kopplungsungleichgewicht; <sup>b</sup>Chi-Quadrat-Test bezogen auf D'



**Abb. 27** Paarweise Kopplung der CYP27B1-Polymorphismen aus geschätzten Haplotypen (Phase 2.0, Haploview 3.32). Reihenfolge der Polymorphismen: **1** +2838 (rs4646536), **2** -1077 (rs3782130), **3** -1260 (rs10877012)

**Tab. 27** Paarweises Kopplungsungleichgewicht der CYP27B1-Polymorphismen

Variant 1	Variant 2	D' <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>
+2838	-1260	<b>1,000</b>	<0,001
+2838	-1077	<b>1,000</b>	<0,001
-1260	-1077	<b>1,000</b>	<0,001

<sup>a</sup>D' Kopplungsungleichgewicht; <sup>b</sup>Chi-Quadrat-Test bezogen auf D'

Die LD-Schemata (Abb. 25, 26, 27) geben den  $D'$ -Wert (Zahlen in den Rauten, 100-fach) und den Korrelationskoeffizienten im Quadrat ( $r^2$ ) zwischen zwei Loci in Grautönen wieder ( $r^2$ -Farbschema:  $r^2=0$  weiß,  $0<r^2<1$  grau,  $r^2=1$  schwarz).  $D'$ -Werte bewegen sich zwischen -1 und +1 (Tab. 25, 26, 27).  $D'$ -Werte nahe -1 oder +1 gelten als Indikator für eine starke Kopplung von Polymorphismen auf einem Allel. Die Daten konnten durch die Programme Phase 2.0 und Haploview 3.32 gegenseitig bestätigt werden.

### 3.2.5 Komplexe Genotypen und Haplotypen

Bei 717 von den insgesamt 957 Studienteilnehmern wurden die CYP27A1-Polymorphismen bestimmt. Von 81 theoretisch möglichen komplexen Genotypen (KG) kommen 18 Kombinationen tatsächlich vor. Die 5 häufigsten KG und 4 von 7 ermittelten Haplotypen sind in Tab. 28 dargestellt. Die statistische Analyse ergab für einzelne komplexe Genotypen und Haplotypen lediglich Trends.

Für 760 Individuen wurden aus den CYP24A1-Polymorphismen komplexe Genotypen ermittelt. Von 27 theoretisch möglichen komplexen Genotypen kommen 12 tatsächlich vor. Tab. 29 zeigt die 5 häufigsten Genotypen und die 3 häufigsten Haplotypen. Alle anderen Haplotypen kamen mit einer Häufigkeit  $< 5\%$  vor. Die Fall-Kontroll-Klassifikation ergab keine Unterschiede ( $p=0,956$ ).

In Tab. 30 sind die 3 häufigsten KG und 2 häufigsten Haplotypen des CYP27B1-Gens aufgelistet. Die Chi-Quadrat-Testung der KG und Haplotypen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen.

Aus den ermittelten Haplotypen wurden außerdem Kombinationen für jedes Allel (Diploypen) gebildet. Die statistische Analyse dieser Diploypen ergab keine Signifikanzen (nicht dargestellt). Die Bildung noch größerer Haplotypen ist aus statistischer Sicht nicht sinnvoll.

**Tab. 28** Frequenzen der häufigsten komplexen Genotypen und Haplotypen von CYP27A1 bei Fällen und Kontrollen

	rs4674338	rs4674345	rs11677711	rs6709815	Kontrollen n (%)	Fälle n (%)	Gesamt n (%)	P-Wert	OR	P-Wert
Komplexe Genotypen	GG	AG	GG	GT	37 (10,1)	35 (9,9)	72 (10,0)	1,000	1,00 (0,62-1,62)	
	GG	GG	GG	TT	75 (20,5)	73 (20,6)	148 (20,6)	0,858	1,04 (0,73-1,48)	
	GA	AA	GG	GG	41 (11,2)	27 (7,6)	68 (9,4)	0,132	0,68 (0,41-1,13)	
	GA	AG	GG	GT	138 (37,9)	150 (42,4)	288 (40,1)	0,178	1,22 (0,92-1,61)	
	AA	AA	GG	GG	74 (20,3)	69 (19,5)	143 (19,9)	0,928	0,98 (0,69-1,41)	0,484
				$\Sigma$ 363	$\Sigma$ 354	$\Sigma$ 717				
Haplotypen	G	G	T	T	95 (10,0)	73 (8,1)	168 (9,1)	0,169	0,79 (0,57-1,09)	
	G	A	T	G	411 (43,2)	398 (44,0)	809 (43,6)	0,708	1,04 (0,86-1,24)	
	G	A	G	G	37 (3,9)	38 (4,2)	75 (4,0)	0,726	1,09 (0,69-1,74)	
	A	G	T	T	390 (40,9)	375 (41,5)	765 (41,2)	0,814	1,02 (0,85-1,23)	0,347
				$\Sigma$ 933	$\Sigma$ 884	$\Sigma$ 1817				

Fisher's Exakter Test mit zweiseitiger Signifikanz; für die Haplotypenanalyse ist jeder Studienteilnehmer mit zwei Allelen berücksichtigt.

**Tab. 29** Frequenzen der häufigsten komplexen Genotypen und Haplotypen von CYP24A1 bei Fällen und Kontrollen

	rs2762942	rs2296241	rs17219315	Kontrollen n (%)	Fälle n (%)	Gesamt n (%)	P-Wert	OR	P-Wert
Komplexe Genotypen	AA	AA	AA	100 (25,6)	100 (27,1)	200 (26,3)	0,690	1,07 (0,78-1,46)	
	AA	AG	AA	171 (43,7)	158 (42,8)	329 (43,3)	0,784	0,96 (0,73-1,26)	
	AA	GG	AA	74 (18,8)	72 (19,5)	146 (19,2)	0,928	1,04 (0,73-1,48)	
	AG	AG	AA	25 (6,3)	22 (6,0)	47 (6,1)	0,881	0,94 (0,52-1,70)	
	AG	GG	AA	22 (5,6)	17 (4,6)	39 (5,1)	0,624	0,82 (0,43-1,57)	0,956
				$\Sigma$ 391	$\Sigma$ 369	$\Sigma$ 760			
Haplotypen	A	A	A	475 (49,9)	452 (50,0)	927 (49,9)	1,000	1,00 (0,84-1,20)	
	A	G	A	400 (42,0)	384 (42,5)	784 (42,2)	0,851	1,02 (0,85-1,23)	
	G	G	A	53 (5,5)	46 (5,1)	99 (5,3)	0,680	0,91 (0,61-1,37)	0,959
				$\Sigma$ 928	$\Sigma$ 882	$\Sigma$ 1810			

Fisher's Exakter Test mit zweiseitiger Signifikanz; für die Haplotypenanalyse ist jeder Studienteilnehmer mit zwei Allelen berücksichtigt.

**Tab. 30** Frequenzen der häufigsten komplexen Genotypen und Haplotypen von CYP27B1 bei Fällen und Kontrollen

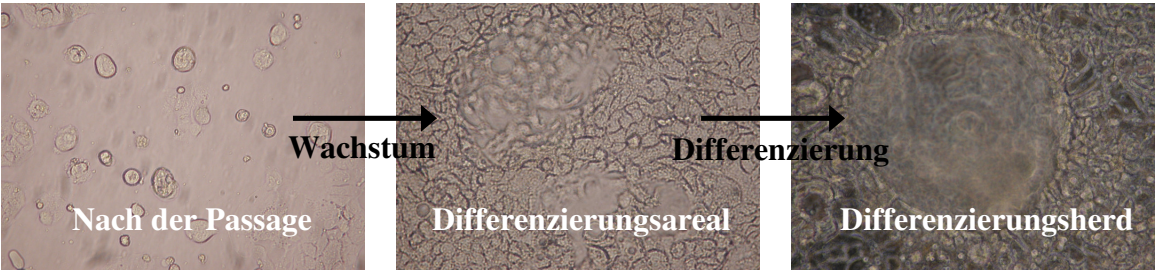
	rs10877012	rs3782130	rs4646536	Kontrollen n (%)	Fälle n (%)	Gesamt n (%)	P-Wert	OR	P-Wert
Komplexe Genotypen	GG	GG	TT	182 (38,2)	163 (36,1)	345 (37,1)	0,498	1,05 (0,91-1,21)	
	GT	GC	TC	198 (41,5)	210 (46,5)	408 (43,9)	0,146	0,90 (0,79-1,03)	
	TT	CC	CC	40 (8,4)	45 (10,0)	85 (9,1)	0,427	0,91 (0,73-1,13)	0,304
				$\Sigma$ 420	$\Sigma$ 418	$\Sigma$ 838			
Haplotypen	G	G	T	617 (64,7)	571 (63,2)	1188 (64,0)	0,499	1,04 (0,94-1,14)	
	T	C	C	324 (34,0)	329 (36,4)	653 (35,2)	0,307	0,95 (0,86-1,05)	0,228
				$\Sigma$ 941	$\Sigma$ 900	$\Sigma$ 1841			

Fisher's Exakter Test mit zweiseitiger Signifikanz; für die Haplotypenanalyse ist jeder Studienteilnehmer mit zwei Allelen berücksichtigt

### 3.3 Genexpressionsanalyse mit RT-PCR

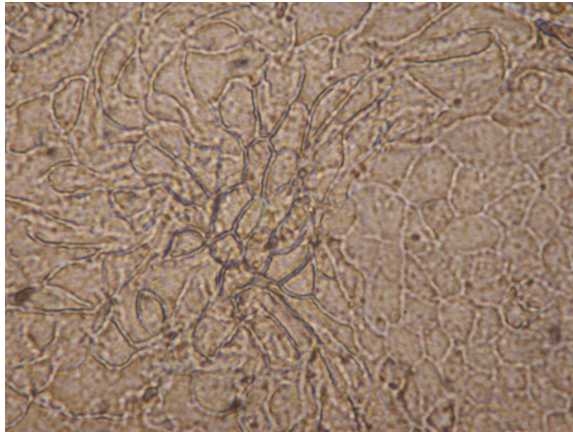
#### 3.3.1 Induktionsversuche (Differenzierungsmodell)

Um die mRNA-Expression verschiedener Kandidatengene für das kolorektale Karzinom zu untersuchen, wurde eine vergleichende induzierte Differenzierung durchgeführt (Abb. 28). Die Zellen wurden in parallelen Ansätzen mit den Induktoren Natriumbutyrat, all-trans-Retinsäure und Calcitriol mit unterschiedlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten behandelt. In Vorversuchen wurden die Konzentrationen ermittelt, die nicht cytotoxisch sind und zu einer sichtbaren Differenzierung im Mikroskop führen. Inkubationszeiten von 6 h, 12 h und 24 h erwiesen sich als am besten geeignet.

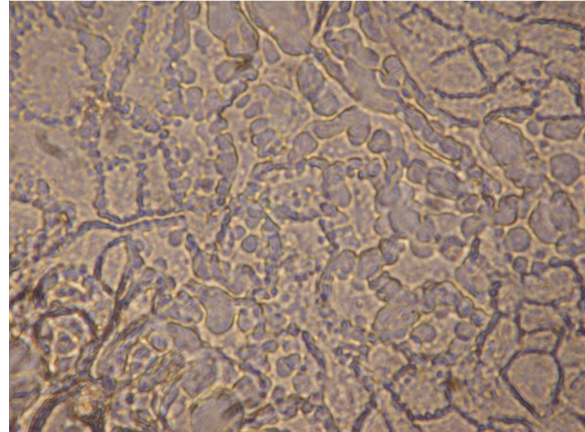
<b>Induktoren:</b>		
Natriumbutyrat (NaB)	1 mM	Lösungsmittel H <sub>2</sub> O
Retinsäure (ATRA)	1 µM	Lösungsmittel EtOH 0,1% [v/v]
Calcitriol (Vit.D)	100 nM	Lösungsmittel EtOH 0,1% [v/v]
<b>Zelllinien:</b>		
Caco-2 / SW480-Zellen		
<b>Inkubationszeit:</b>		
6 / 12 / 24 h		
<b>Versuche:</b>		
n = 3 – 6		
		
<b>Abb. 28</b> Induzierte und spontane Differenzierung von humanen Darmkrebs-Zelllinien		



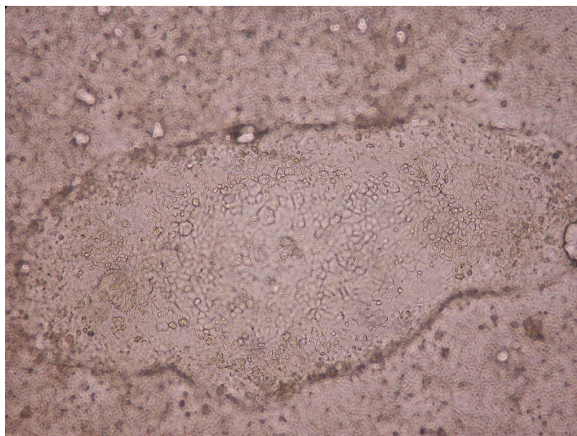
Charakteristisch für die Caco-2-Zelllinie ist deren Eigenschaft, spontan zu differenzieren und vielfältige morphologische Zell-Strukturen zu bilden (Abb. 29).



Spontane Differenzierung (Tag 30)



Spontane Differenzierung (Tag 30)



Differenzierungsherd (Tag 11)



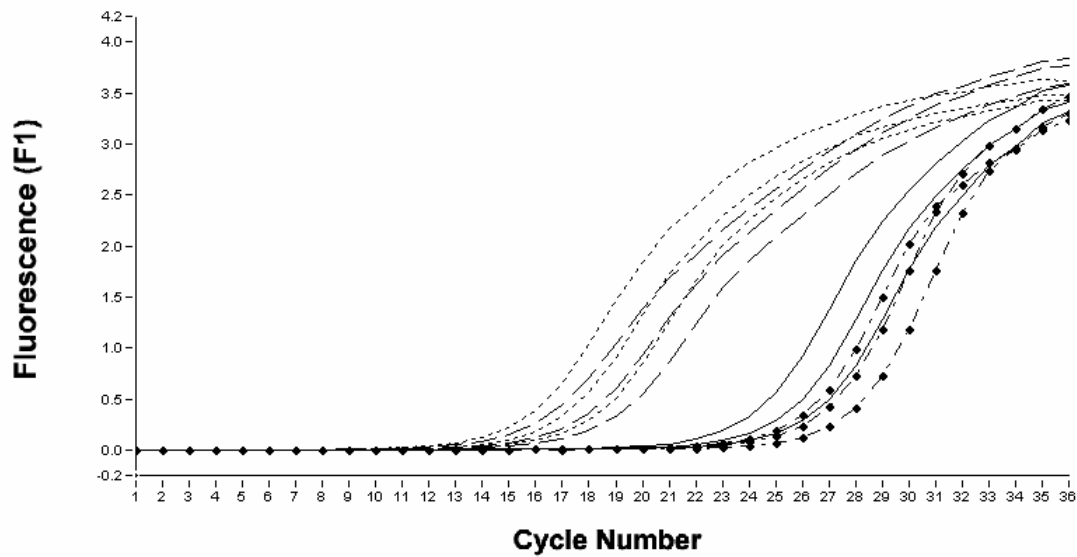
Spontane Differenzierung (Tag 30)

**Abb. 29** Caco-2-Zellen im Durchlicht mit 100facher Vergrößerung

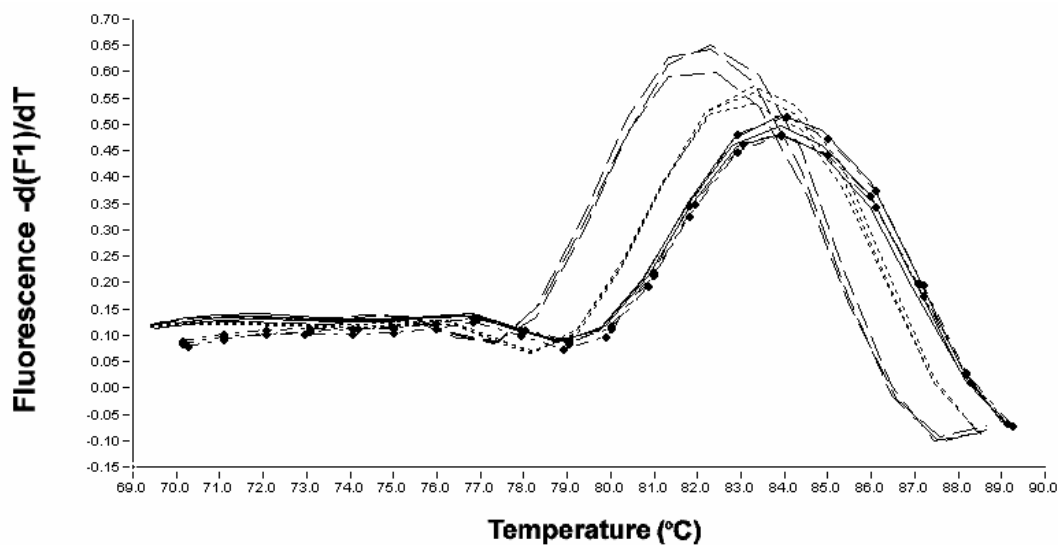
### 3.3.2 Relative Quantifizierung der mRNA

Die Fluoreszenz wurde fortlaufend als Zyklus-Einzelmessung zur Quantifizierung nach RT-PCR erfasst (Abb. 30). Anschließend wurde eine Schmelzkurve ermittelt, um die Spezifität des Produktes zu bestätigen und Primerdimere und Nebenprodukte auszuschließen (Abb. 31). Die Fluoreszenz-Signale wurden dabei gegen die Anzahl der Zyklen oder die Temperatur aufgetragen.





**Abb. 30** Relative Quantifizierung der 1:20, 1:40 und 1:80 Verdünnungen von GAPDH (-----), ACTB (— — —), CHD1 (———) und VDR (—•—•—). Bestimmung über Second Derivative Maximum Methode mit Effizienz-Korrektur aus den Wendepunkten der Kurven. Keine Adjustierung der Basislinie.

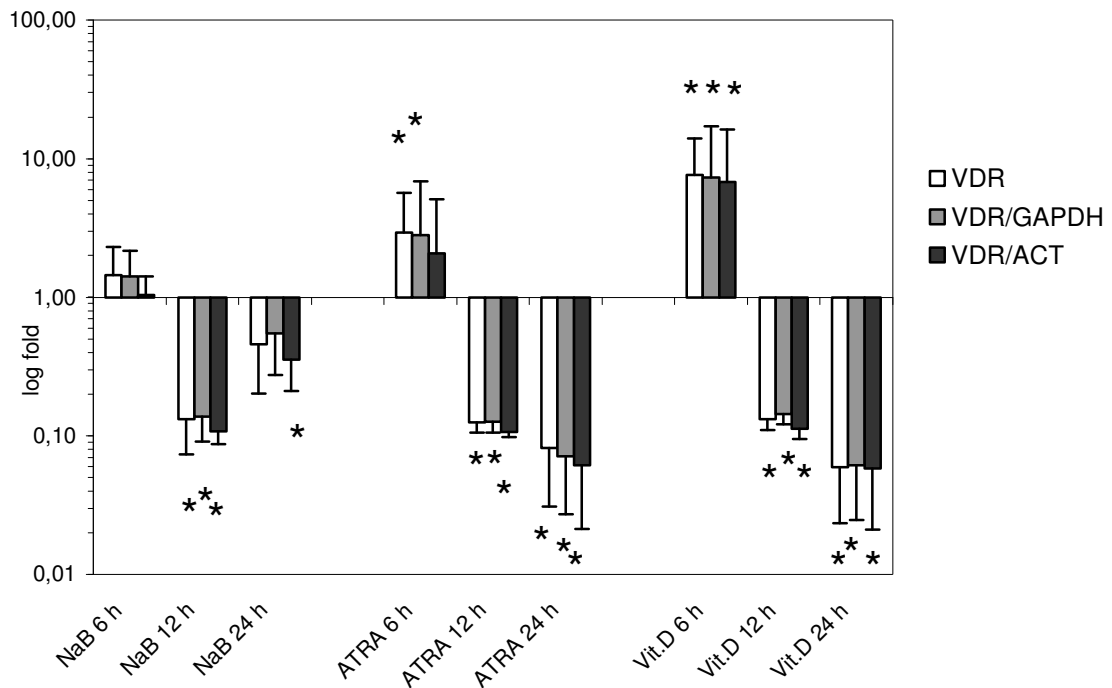


**Abb. 31** Schmelzkurven der 4 Kandidatengene GAPDH (-----), ACTB (— — —), CHD1 (———) und VDR (—•—•—). Digitalfilter aktiviert.

### 3.3.3 VDR-Genexpression in Caco-2-Zellen

Die Behandlung der Caco-2-Zellen mit den differenzierenden Reagenzien Natriumbutyrat, Retinsäure und Vitamin D lässt nach 6 Stunden eine signifikant vermehrte VDR-Expression und nach 12 und 24 Stunden eine signifikant verminderte VDR-Expression erkennen (Abb. 32), was spezifisch für die Caco-2-Zellen zu sein scheint (vgl. Abb 33-35). In Abb. 32-35 sind

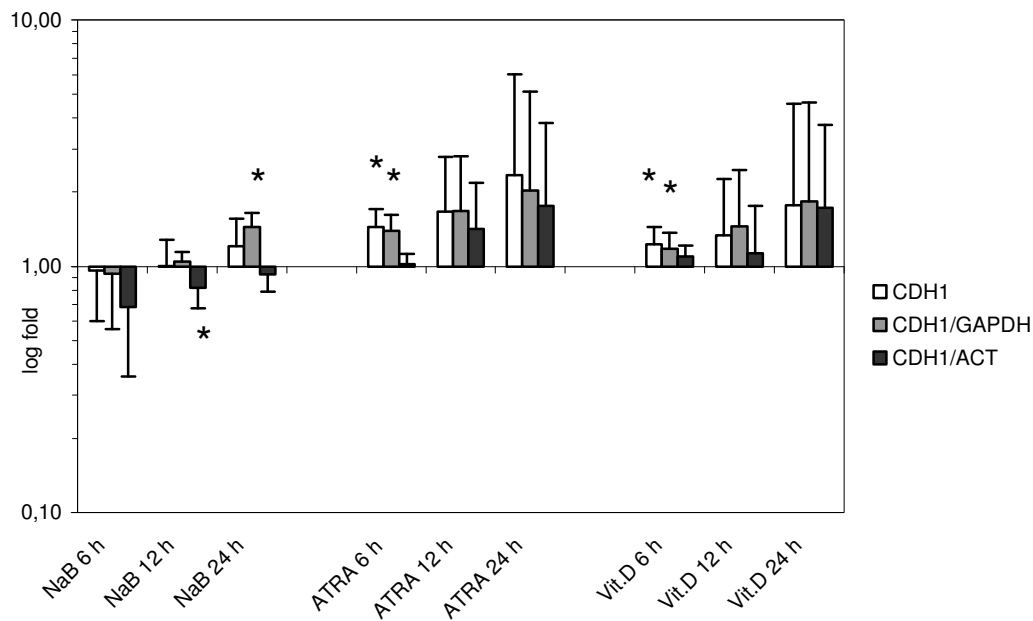
für jede Induktionsart sortiert nach Reagenz und Zeit (x-Achse) jeweils die Fold-Werte logarithmisch mit 95% CI (y-Achse) dargestellt. Hervorgehoben ist das Kandidatengen (VDR oder CDH1) ohne Normalisierung (weiß), normalisiert auf GAPDH (hellgrau) und normalisiert auf ACTB (dunkelgrau).



**Abb. 32** VDR-mRNA-Quantifizierung nach Behandlung mit differenzierenden Agenzien in Caco-2-Zellen (n=4). Die fold-change-Werte der behandelten zu unbehandelten Zellen sind logarithmisch dargestellt (Kontrollen gleich 1; 95% CI, \* wenn Interval ober- oder unterhalb von 1) ohne Normalisierung (weiß), normalisiert auf GAPDH (hellgrau) und normalisiert auf ACTB (dunkelgrau).

### 3.3.4 CDH1-Genexpression in Caco-2-Zellen

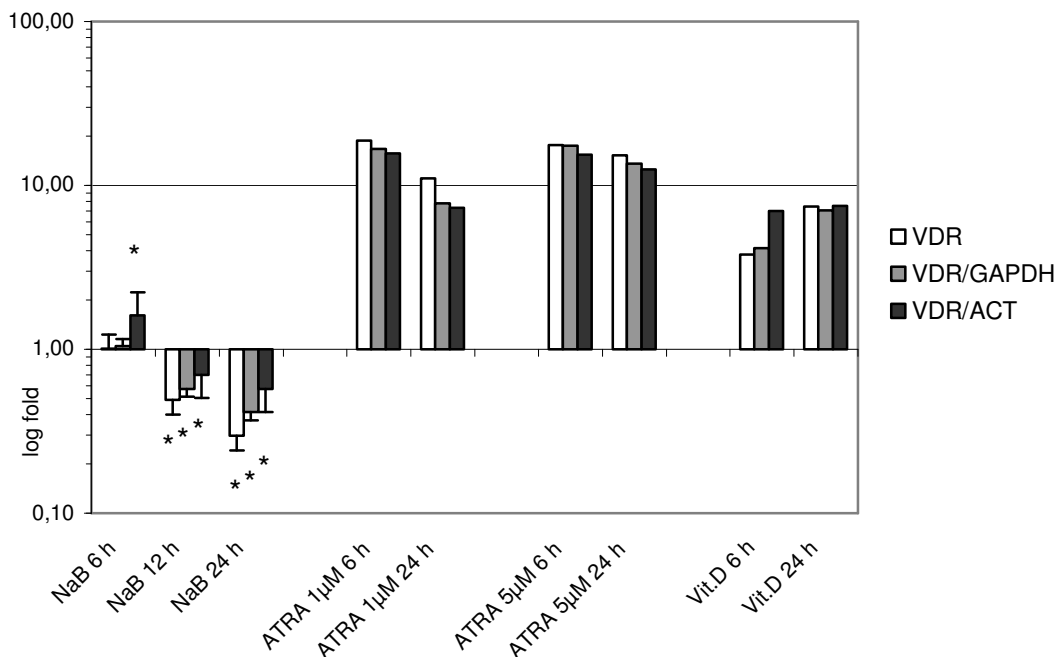
Wie in Abb. 33 zu sehen ist, kann ein alternierender Effekt für E-Cadherin nicht gezeigt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass Retinsäure und Vitamin D eine vermehrte CDH1-Expression zu allen Zeitpunkten induzieren. Die Induktion mit Natriumbutytrat war für E-Cadherin nicht aussagekräftig.



**Abb. 33** CDH1-mRNA-Quantifizierung nach Behandlung mit differenzierenden Agenzien in Caco-2-Zellen (n=4). Die fold-change-Werte der behandelten zu unbehandelten Zellen sind logarithmisch dargestellt (Kontrollen gleich 1; 95% CI, \* wenn Interval ober- oder unterhalb von 1) ohne Normalisierung (weiß), normalisiert auf GAPDH (hellgrau) und normalisiert auf ACTB (dunkelgrau).

### 3.3.5 VDR-Genexpression in SW480-Zellen

Die VDR-Expression in SW480-Zellen ist in Abb. 34 dargestellt.

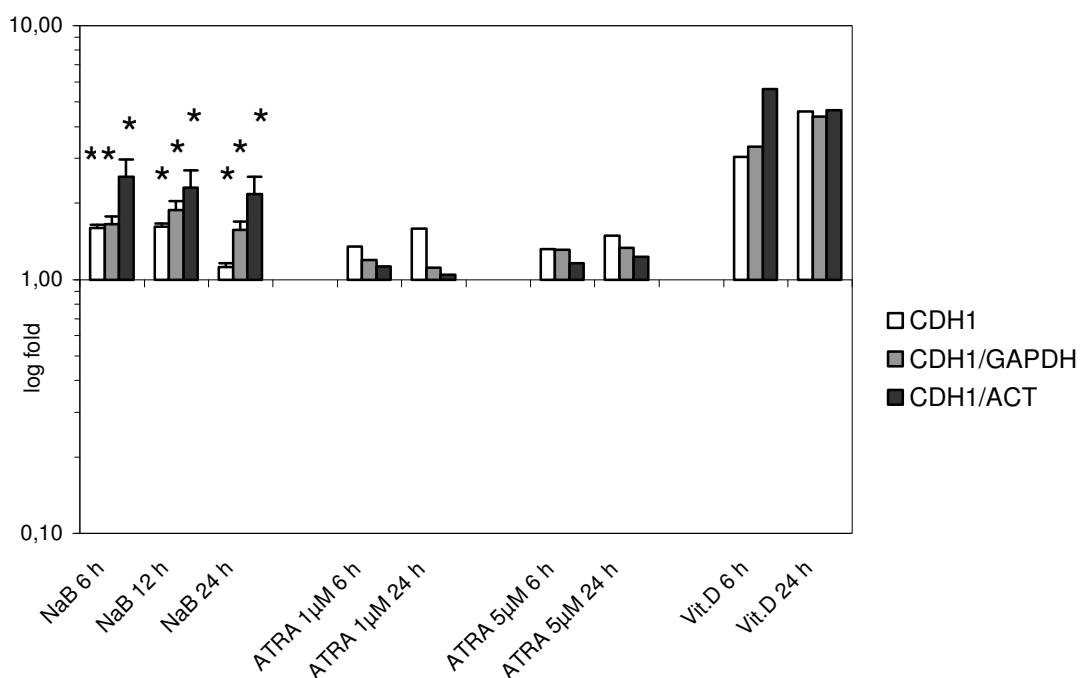


**Abb. 34** VDR-mRNA-Quantifizierung nach Behandlung mit differenzierenden Agenzien in SW480-Zellen (n=4). Die fold-change-Werte der behandelten zu unbehandelten Zellen sind logarithmisch dargestellt (Kontrollen gleich 1; 95% CI, \* wenn Interval ober- oder unterhalb von 1) ohne Normalisierung (weiß), normalisiert auf GAPDH (hellgrau) und normalisiert auf ACTB (dunkelgrau).

In SW480-Zellen konnte auch eine Tendenz für eine Hochregulation der VDR-Expression nach Exposition gegenüber ATRA und Vitamin D für 6, 12 und 24 Stunden festgestellt werden. Mit ATRA war der maximale Effekt bereits nach 6 Stunden erreicht. Die Behandlung mit NaB führte zu einer verminderten VDR-Expression.

### 3.3.6 CDH1-Genexpression in SW480-Zellen

E-Cadherin wurde in SW480-Zellen durch die drei Induktoren NaB, ATRA und Vitamin D deutlich hochreguliert (Abb. 35).



**Abb. 35** CDH1-mRNA-Quantifizierung nach Behandlung mit differenzierenden Agenzien in SW480-Zellen (n=4). Die fold-change-Werte der behandelten zu unbehandelten Zellen sind logarithmisch dargestellt (Kontrollen gleich 1; 95% CI, \* wenn Interval ober- oder unterhalb von 1) ohne Normalisierung (weiß), normalisiert auf GAPDH (hellgrau) und normalisiert auf ACTB (dunkelgrau).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Differenzierung durch NaB, ATRA und Vit. D in den Darmkrebszelllinien Caco-2 und SW480 hervorgerufen werden kann und dass diese Induktion zu einer gesteigerten Expression von VDR und CDH1 führt. Vitamin D zeigte die einheitlichsten und ausgeprägtesten Effekte. Auf der Grundlage dieser Vorversuche wurden Caco-2-Zellen und als Induktor Vitamin D mit Inkubationszeiten von 6 h und 12 h für die Mikroarray-Genexpressionsanalyse ausgewählt.

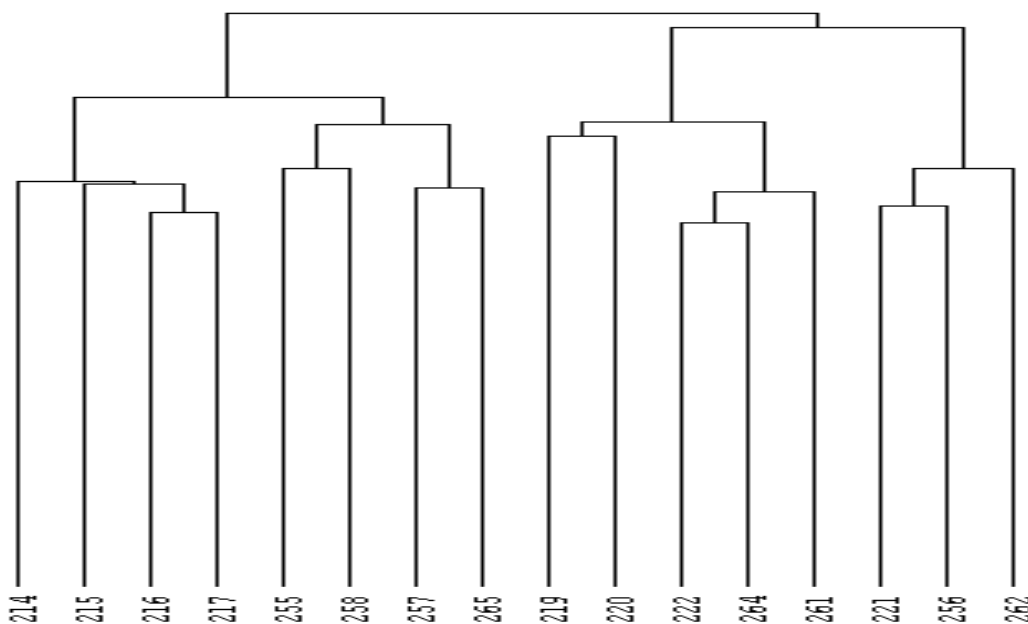
### 3.4 Genexpressionsanalyse mit GeneChip-Mikroarrays

#### 3.4.1 Clusteranalyse

Mit der Clusteranalyse können Strukturen in Daten entdeckt werden. Innerhalb der Qualitätskontrolle wurden hierarchische Cluster aus den logarithmierten und normalisierten Daten gebildet, die verschiedenen Cluster- und Fusionsalgorithmen folgen. Die Ähnlichkeit zwischen den Arrays wurde mit zentriertem Spearman-Test und die Array-Signale mit euklidischer Distanz bestimmt. Die Fusion der Objekte erfolgt nach Average-Linkage-Algorithmus. Es werden homogene Gruppen gebildet, welche die reale Struktur des Datensatzes gut widerspiegeln.

Zur Bewertung der Qualität der durchgeführten Mikroarray-Analysen dienen sogenannte hierarchische Clusterbäume. Die Ähnlichkeit zweier Chips wird durch die Länge des Weges zwischen diesen beiden Chips dargestellt, je kürzer dieser Weg ist, desto ähnlicher sind sich die Chips. Mittels des Programs Cluster 3.0 wurde das Ähnlichkeitsmaß für alle Probe-Set-IDs aus den logarithmierten und normalisierten Daten mit dem Clusteralgorithmus „zentrierter Spearman-Test“ und dem Fusionsalgorithmus „Average-Linkage“ ermittelt.

Zur Clusteranalyse der Arrays und Array-Signaldaten und Darstellung als Dendrogramm diente Cluster 3.0 mit Java TreeView (Michael Eisen, Alok Saldanha, Stanford University, <http://bonsai.ims.u-tokyo.ac.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm#ctv>).

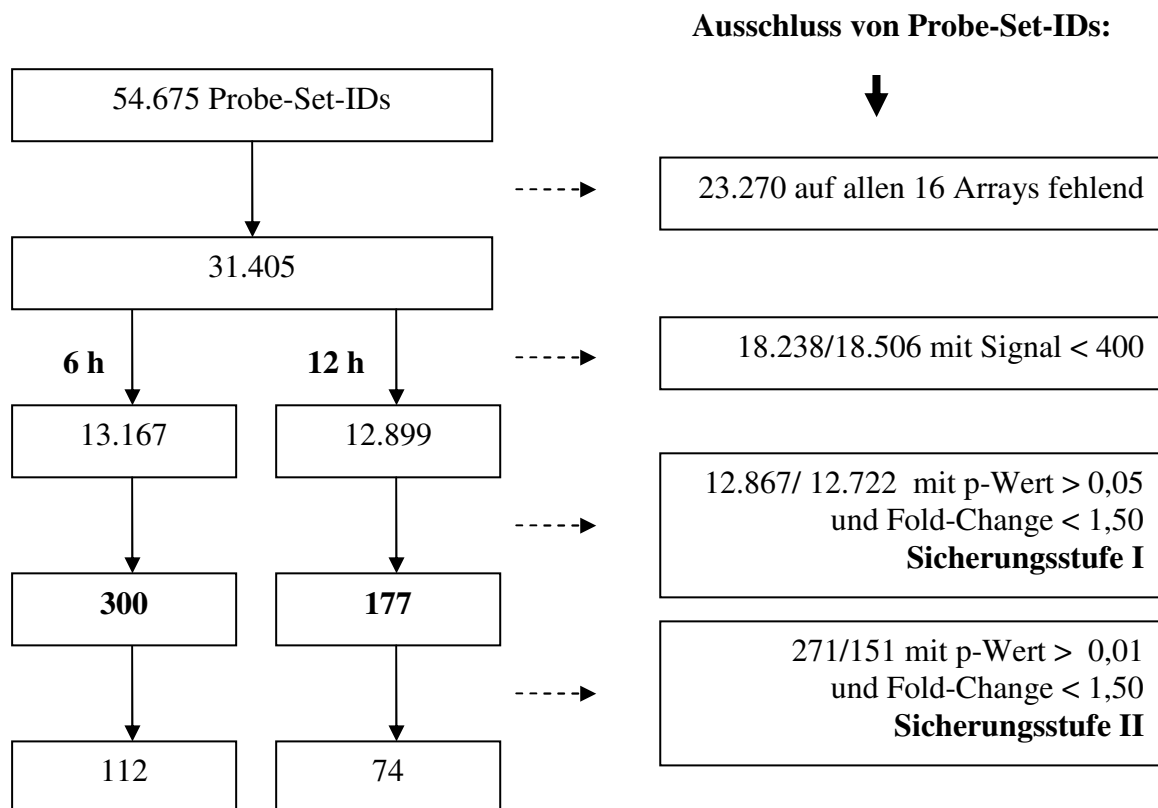


**Abb. 36** Hierarchisches Dendrogramm der Arrays (Cluster 3.0, Spearman-Test, Average Linkage). 214-215-216-217 (6 h, Vehikel), 255-256-257-258 (6 h, Vitamin D), 219-220-221-222 (12 h, Vehikel), 261-262-264-265 (12 h, Vitamin D)

Das Clusterverhalten der Arrays ist in Abb. 36 abgebildet. Die 4 Parallel-Proben 214, 215, 216, 217 clustern optimal (links), d.h. die Chips sind sich sehr ähnlich und bilden eine eigene Gruppe. Das Clusterverhalten der anderen 12 Arrays ist nicht eindeutig. Vor allem der Chip Nr. 256 clustert mäßig, was bei der weiteren Datenauswertung berücksichtigt werden muss und sich auch in den Signalwerten niederschlägt.

### 3.4.2 Datenanalyse der regulierten Gene (Sicherungsstufen)

23.270 Signale von 54.675 Sequenzen (Abb. 37) wurden auf allen 16 Arrays als „absent“ festgestellt (Kap. 2.6.3) und wurden bei der weiteren Datenanalyse nicht berücksichtigt. Als Wert für die Hintergrundkorrektur ergab sich  $HGK = 41,8$ . Alle verbliebenen Signale unterhalb dieses Wertes wurden auf diesen Wert heraufgesetzt.



**Abb. 37** Flussdiagramm der Datenanalyse der Probe-Set-IDs (Sicherungsstufen I und II)

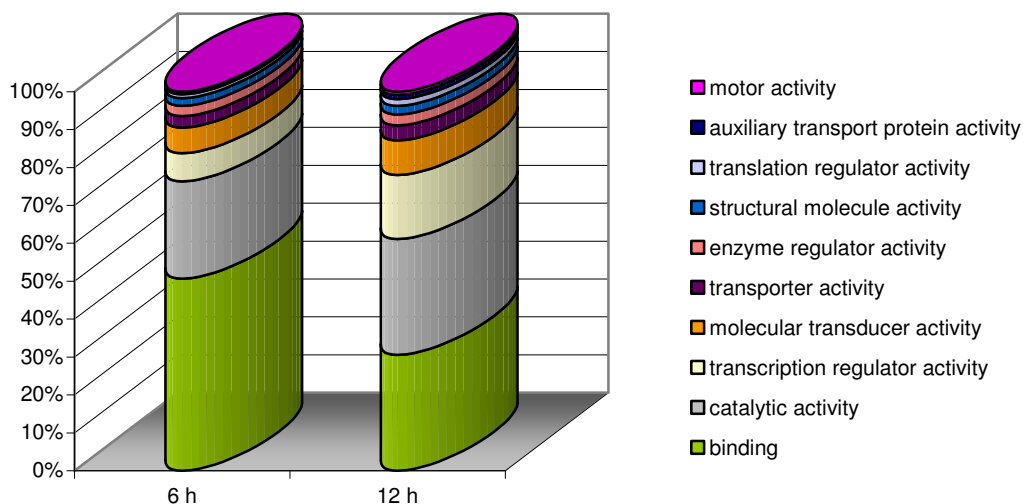
Um zwischen signifikanten Veränderungen und zufälligen Abweichungen zu unterscheiden, interessante Gene zu identifizieren und falsch positive Sequenzen auszuschließen, wurden auf die verbleibenden 31.405 Sequenzen folgende Filter-Parameter bzw. Sicherungsstufen für die

Probe-Set-IDs angewendet: Signalstärke > 400, Fold-Change-Wert < 1,50 und ein p-Wert von > 0,05 bzw. > 0,01 im T-Test. Für eine ausreichende Signalstärke musste das geometrische Mittel der Einzelsignale mindestens für eine Bedingung (Vitamin-D-behandelt/Vitamin-D-unbehandelt) über einer Signalstärke von 400 liegen. Je vier Mikroarrays der unterschiedlichen Behandlungen mit Vitamin D für 6 h und 12 h (Tab. 11) wurden unabhängig voneinander ausgewertet.

Nach Anwendung aller Filterparameter ergaben sich 300 regulierte Gene mit  $p < 0,05$  (Sicherungsstufe I) und 112 regulierte Gene mit  $p < 0,01$  (Sicherungsstufe II) für die 6-stündige Behandlung mit Vitamin D und 177 bzw. 74 regulierte Gene für die 12-stündige Behandlung mit Vitamin D (Abb. 37).

### 3.4.3 Zuordnung der regulierten Gene

Die Zuordnung der regulierten Gene zu molekularen Funktionen ist in Abb. 38 für die 6-h-Behandlung (300 Gene) und für die 12-h-Behandlung (177 Gene) dargestellt (GeneSifter Microarray Analysis Software, Sicherungsstufe I:  $p < 0,05$ , Signal > 400, Fold-Change-Wert > 1,50).

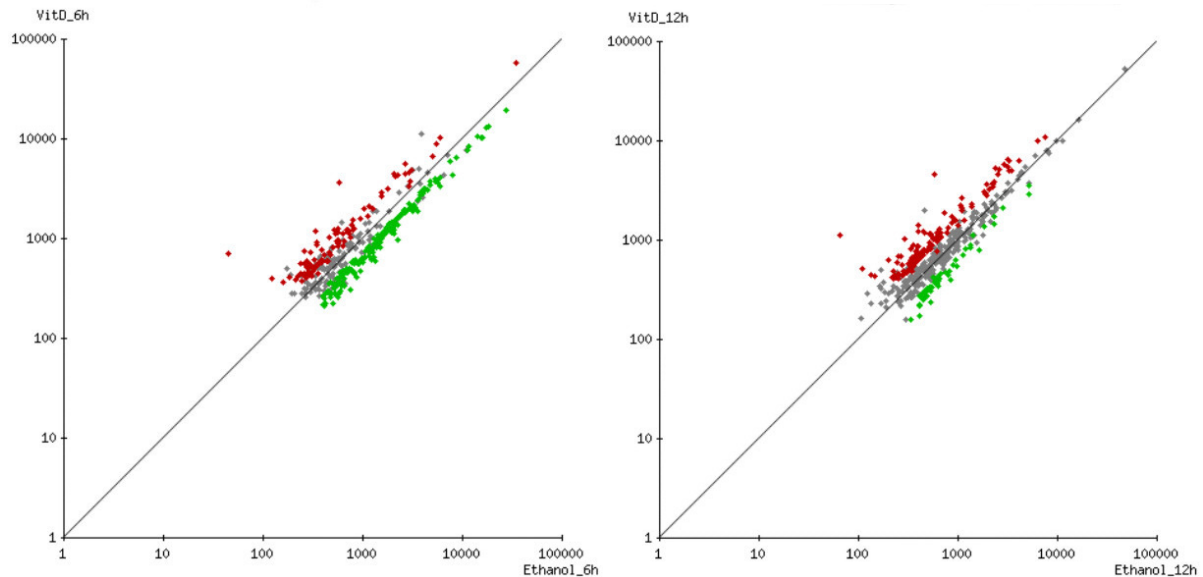


**Abb. 38** Verteilung der nach 6-stündiger und 12-stündiger Vitamin-D-Behandlung regulierten Gene auf molekulare Funktionen (GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0).

### 3.4.4 Scatter-Plot

Die regulierten Gene wurden mit GeneSifter Microarray Analysis Software dargestellt. Die Fold-Change-Werte lagen für die 6-h-Behandlung zwischen 0,057 und 17,613 und für die

12-h-Behandlung zwischen 0,060 und 16,732. Der Scatter-Plot zur Regulation der Gene der Sicherungsstufe I (300 Gene für die 6 h-Behandlung, 177 Gene für die 12 h-Behandlung) ist in Abb. 39 zu sehen. Auffällig sind vor allem einzelne, von der Korrelationsgeraden weit entfernte stark hochregulierte (rot) oder herabregulierte (grün) Probe-Set-IDs bzw. Gene, die im nachfolgenden Kapitel genauer betrachtet werden sollen.



**Abb. 39** Scatter-Plot der regulierten Gene mit erhöhter (rot) und verminderter Expression (grün) nach 6-h-Behandlung (links) und 12-h-Behandlung (rechts) mit Vitamin D (graue Punkte  $p > 0.01$ ). Die Signalstärke von unbehandelten Zellkulturen (x-Achse) ist gegen behandelte Zellkulturen (y-Achse) aufgetragen (GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0, GeneSifter Microarray Analysis Software).

### 3.4.5 Hierarchische Clusteranalyse

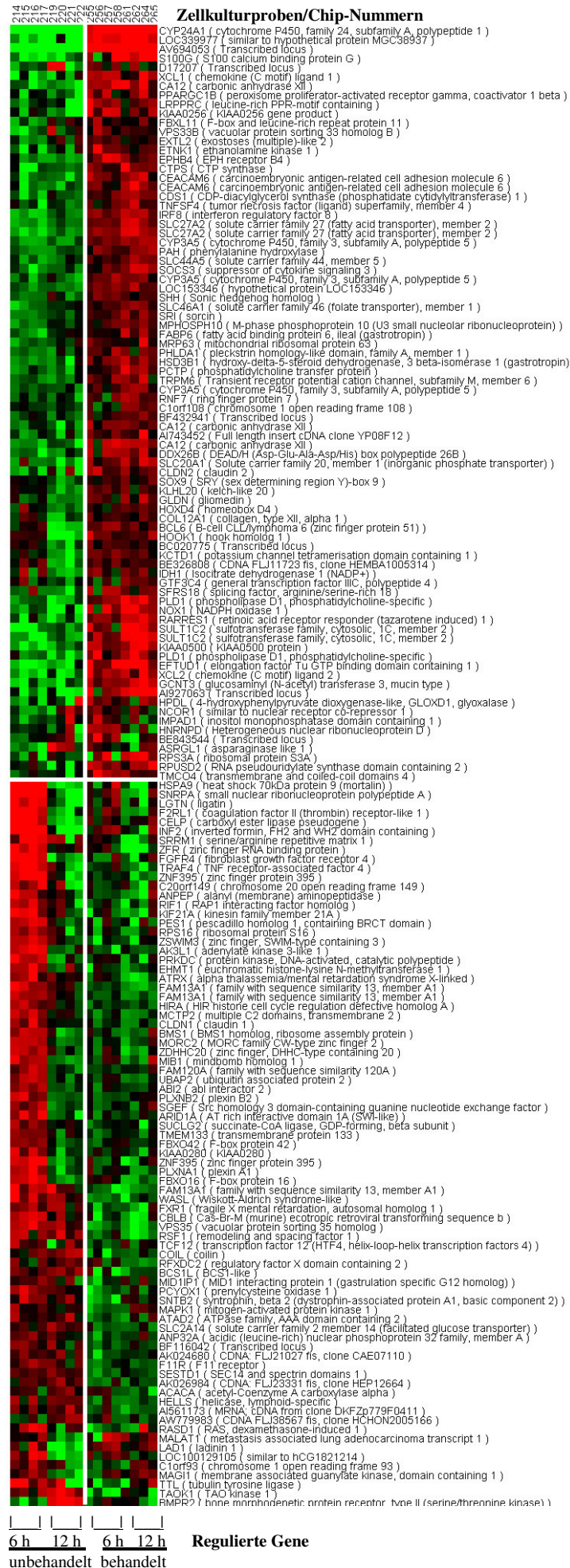
Die Clusteranalyse der Array-Signaldaten (Cluster 3.0) ist in Abb. 40 dargestellt und zeigt die Verteilung der Gene. Die Signale der Gene der Sicherungsstufe II (t-Test,  $p < 0,01$ , 112, 74 Gene) gruppieren sich in 4 Cluster: unbehandelt (links), behandelt (rechts), erhöhte Expression (oben), verminderte Expression (unten).

Besonders auffällig ist der obere Bereich des Clusters. Hier ist ganz deutlich ein Unterschied zwischen den unbehandelten und behandelten Zellkulturen zu erkennen. Die Vitamin-D-Behandlung führt zu einer stark erhöhten Expression zahlreicher Gene.

Außerdem ist der Cluster-Bereich im dritten Viertel auffällig. Hier ist ganz deutlich ein Unterschied zwischen den unbehandelten 6-h- und 12-h-Zellkulturen zu erkennen. Die spontane Differenzierung der Zellen führt zu einer verminderten Expression einiger Gene.



**Abb. 40** Hierarchische Clusteranalyse der Expressionsprofile unbehandelter und Vitamin-D-behandelter *Caco-2*-Zellen. Die untersuchten Zellkultur-Proben und die regulierten Gene sind jeweils nach Ähnlichkeit im Expressionsmuster sortiert. Die kleinen Quadrate geben jeweils die relative Expression eines Gens in einer Probe im Vergleich zum Mittelwert (schwarze Färbung) der logarithmierten Daten wieder, wobei eine rote Färbung eine höhere Expression und eine grüne Färbung eine niedrigere Expression als der Mittelwert anzeigt. Unbehandelte Zellkulturen (214-217, 219-222), Vitamin-D-behandelte Zellkulturen (255-258, 261-265); GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0; Cluster 3.0.



### 3.4.6 Analyse ausgewählter Vitamin-D-regulierter Gene

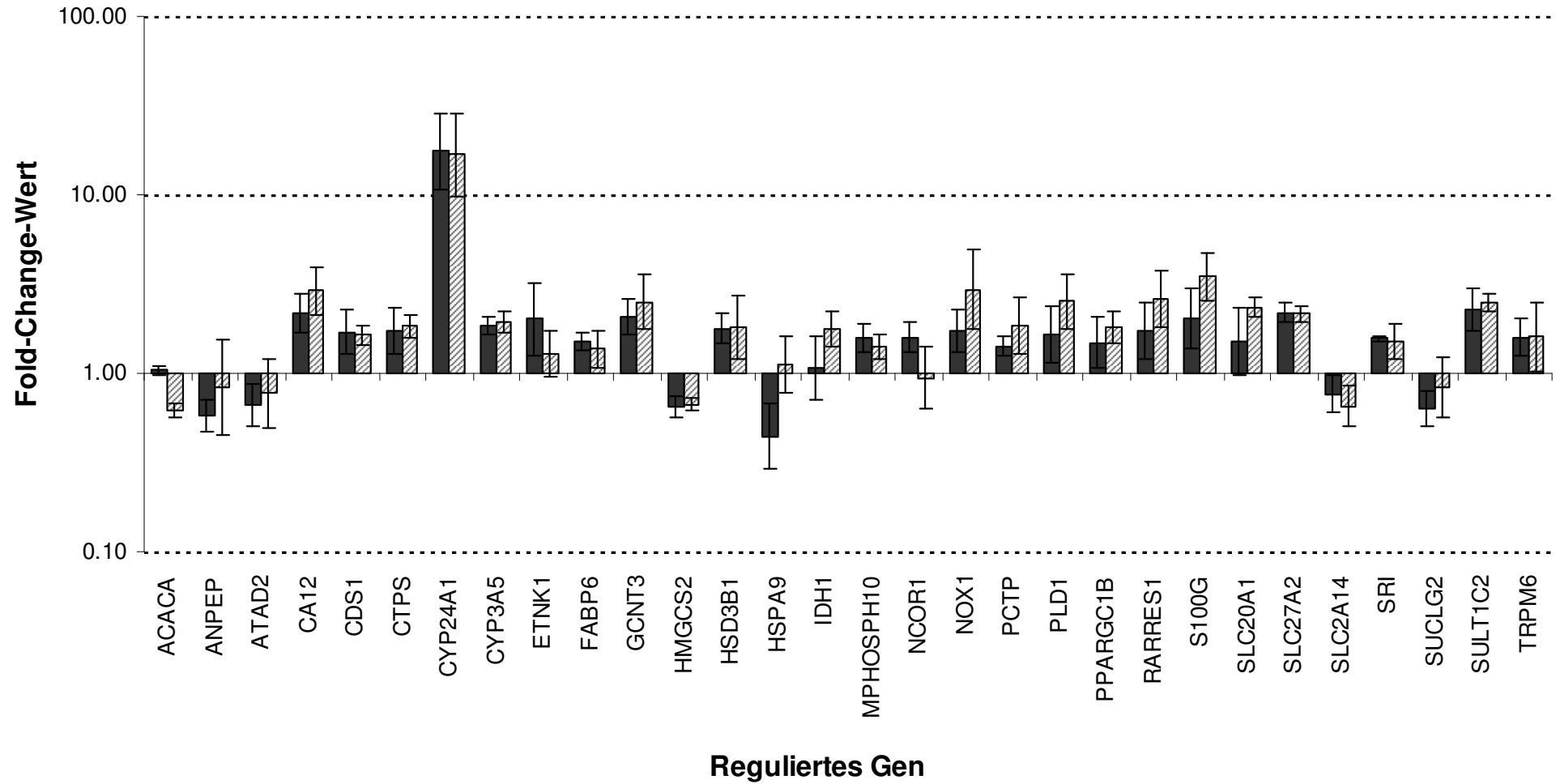
Für die 6-stündige und 12-stündige Vitamin-D-Behandlung ergaben sich mit der Sicherungsstufe II ( $p < 0,01$ , Abb. 37, Abb. 40) 112 und 74 regulierte Gene mit einem Fold-Change-Wert  $> 1,5$  (erhöhte Expression) bzw.  $< 0,67$  (verminderte Expression). Nach detaillierter Betrachtung und Zuordnung dieser Gene zu allgemeinen Stoffwechselwegen konnten einige der regulierten Gene konkret miteinander in Zusammenhang gebracht werden (NetAffx<sup>TM</sup> Analysis Center, GeneCards, PubMed, KEGG).

Diese Auswahl Vitamin-D-regulierter Gene bzw. Probe-Set-IDs ist in Abb. 41 dargestellt. In Tab. 31 sind diese ausgewählten Vitamin-D-regulierten Gene detailliert und nach Kategorien geordnet aufgelistet. Erhöhte und verminderte Expressionen ( $p < 0,01$ , Fold-Change-Wert  $> 1,5$  bzw.  $< 0,67$ ) wurden für Gene des Fremdstoffmetabolismus, der Calciumhomöostase, des Phosphathaushaltes, des Glucosetransportes, des Fettsäure- und Steroid-Stoffwechsels und für regulatorische Gene der NR gefunden.

Es wurden außerdem 12 Gene ( $p < 0,01$ , Signal  $> 400$ , Fold-Change-Wert  $> 2,0$ ) bzw. 52 Gene ( $p < 0,01$ , Signal  $> 400$ , Fold-Change-Wert  $> 1,5$ ) gefunden, die sowohl nach 6 h als auch nach 12 h deutlich reguliert vorlagen. Einige davon sind in Tab. 31 und Abb. 41 gezeigt.

Auf die Erläuterung der einzelnen Gene und den Zusammenhang mit dem Vitamin-D-Stoffwechsel wird erst in der nachfolgenden Diskussion eingegangen.

**Abb. 41** Ausgewählte Vitamin-D-regulierte Gene nach 6-stündiger und 12-stündiger Behandlung in Caco-2-Zellen. Die Fold-Werte (y-Achse) eines Gens (x-Achse) geben jeweils das geometrische Mittel aus 4 Experimenten aus dem Verhältnis von Vitamin-D-behandelten und unbehandelten Caco-2-Zellen wieder, wobei die Fehlergrenzen mit 95% CI angezeigt sind. ( $p < 0,01$ , Signal  $> 400$ , GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0)



**Tab. 31** Ausgewählte Vitamin-D-regulierte Gene nach 6-stündiger und 12-stündiger Behandlung in Caco-2-Zellen. Die regulierten Gene sind verschiedenen Vitamin-D-verbundenen Stoffwechselwegen zugeordnet. Die Fold-Werte geben jeweils das geometrischen Mittel aus dem Verhältnis von Vitamin-D-behandelten und unbehandelten Caco-2-Zellen wieder, wobei die roten Zahlen eine erhöhte, die grünen Zahlen eine verminderte Expression anzeigen. (p<0,01, Signal>400, Fold-Change-Wert >1,5 (erhöhte Expression, rote Zahlen) bzw. <0,67 (verminderte Expression, grüne Zahlen), GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0)

Offizielles Symbol	Offizieller Name	EC-Nr.	Probe-Set-ID	Fold 6 h	CV 6 h	Fold 12 h	CV 12 h	RefSeq
<b>Fremdstoffmetabolismus</b>								
CYP24A1	Cytochrom P450, Familie 24, Subfamilie A, Polypeptid 1	1.14.-.-	206504_at	<b>17,61</b>	63,81	<b>16,73</b>	70,66	NM_000782.1
NOX1	NADPH-Oxidase 1	1.14.13.13	206418_at	<b>1,73</b>	30,68	<b>2,95</b>	68,59	NM_007052.2
CYP3A5	Cytochrom P450, Familie 3, Subfamilie A, Polypeptid 5	1.14.14.1	205765_at	<b>1,84</b>	12,25	<b>1,92</b>	14,55	NM_000777.1
CYP3A5	Cytochrom P450, Familie 3, Subfamilie A, Polypeptid 5	1.14.14.1	214234_s_at	<b>1,35</b>	8,27	<b>1,61</b>	10,81	X90579.1
CYP3A5	Cytochrom P450, Familie 3, Subfamilie A, Polypeptid 5	1.14.14.1	214235_at	<b>1,69</b>	19,33	<b>1,60</b>	21,36	X90579.1
SULT1C2	Cytosolische Sulfotransferase, Familie 1C2	2.8.2.-	205342_s_at	<b>2,12</b>	69,66	<b>2,41</b>	23,10	NM_001056.1
SULT1C2	Cytosolische Sulfotransferase, Familie 1C2	2.8.2.-	211470_s_at	<b>2,28</b>	31,79	<b>2,50</b>	12,12	AF186255.1
<b>Calcium-Homöostase</b>								
CA12	Carboanhydrase XII	4.2.1.1	203963_at	<b>2,19</b>	28,47	<b>2,90</b>	35,78	NM_001218.2
CA12	Carboanhydrase XII	4.2.1.1	214164_x_at	<b>1,97</b>	46,72	<b>2,17</b>	35,60	BF752277
CA12	Carboanhydrase XII	4.2.1.1	215867_x_at	<b>1,56</b>	19,81	<b>1,77</b>	33,07	AL050025.1
S100G	S100 Calcium-bindendes Protein G		207885_at	<b>2,03</b>	48,11	<b>3,47</b>	36,83	NM_004057.1
SRI	Sorcin		208921_s_at	<b>1,57</b>	4,12	<b>1,51</b>	25,65	NM_003130.1
<b>Steroid-Metabolismus</b>								
PPARGC1B	Peroxisomen-Proliferator-Aktivator-Rezeptor Gamma, Coaktivator 1 Beta		1553639_a_at	<b>1,49</b>	39,38	<b>1,80</b>	23,04	NM_133263.1
HSD3B1	Hydroxy-delta-5-steroid-dehydrogenase (Gastrotropin)	1.1.1.145	204515_at	<b>1,79</b>	20,22	<b>1,80</b>	49,88	NM_000862.1
HSPA9	Hitzeschockprotein 9 (70kDa, Mortalin)		200691_s_at	<b>0,44</b>	51,81	<b>1,12</b>	43,11	NM_004134.1
NCOR1	Nukleärer Rezeptor-Corepressor 1		200855_at	<b>1,58</b>	21,29	<b>0,94</b>	49,95	NM_006311.1
RARRES1	Retinolsäure-Rezeptor-Responder 1 (Tazaroten-induziert)		221872_at	<b>1,72</b>	42,88	<b>2,61</b>	42,50	AI669229

### Phosphat-Haushalt

TRPM6	Transient-Rezeptor-Potential-Kationenkanal, Subfamilie M6	2.7.11.1	240389_at	<b>1,59</b>	26,79	<b>1,61</b>	56,20	BF447669
CTPS	CTP-Synthase	6.3.4.2	202613_at	<b>1,73</b>	34,87	<b>1,84</b>	16,27	NM_001905.1
PLD1	Phospholipase D1 (Phosphatidylcholin-spezifisch)	3.1.4.4	205203_at	<b>1,68</b>	5,35	<b>3,03</b>	82,06	NM_002662.1
PLD1	Phospholipase D1 (Phosphatidylcholin-spezifisch)	3.1.4.4	226636_at	<b>1,66</b>	43,27	<b>2,53</b>	43,16	AI378587
CDS1	CDP-Diacylglycerol-synthase 1 (Phosphatidat-cytidylyltransferase)	2.7.7.41	205709_s_at	<b>1,70</b>	32,38	<b>1,64</b>	13,37	NM_001263.1
ETNK1	Ethanolamin-kinase 1	2.7.1.82	224454_at	<b>2,01</b>	59,26	<b>1,29</b>	35,19	BC006111.1
MPHOSPH10	M-phase-phosphoprotein 10		212885_at	<b>1,57</b>	20,47	<b>1,41</b>	17,50	AL545921
ATAD2	ATPase-Familie, AAA-Domain 2		222740_at	<b>0,67</b>	32,36	<b>0,77</b>	57,55	NM_014109.1
SLC20A1	Anorganischer Phosphat-Transporter, Familie 20A1		230494_at	<b>1,50</b>	54,98	<b>2,35</b>	12,77	AI671885
PCTP	Phosphatidylcholin-Transfer-Protein		218676_s_at	<b>1,42</b>	14,26	<b>1,87</b>	44,02	NM_021213.1

### Glucose-Stoffwechsel

GCNT3	Glucosaminyl-N-acetyl-transferase 3 (Mucin-Typ)	2.4.1.-	219508_at	<b>2,07</b>	24,67	<b>2,51</b>	43,15	NM_004751.1
SLC2A14	Glucose-Transporter, Familie 2A14		216236_s_at	<b>0,77</b>	26,55	<b>0,65</b>	29,57	AL110298.1

### Fettsäuresynthese

ANPEP	Alanyl-aminopeptidase, Membran (Aminopeptidase N, M, microsomal)	3.4.11.2	202888_s_at	<b>0,58</b>	21,71	<b>0,83</b>	84,60	NM_001150.1
IDH1	Isocitrat-dehydrogenase 1 (NADP+)	1.1.1.42	242001_at	<b>1,08</b>	51,06	<b>1,78</b>	25,45	AA825652
SUCLG2	Succinat-Coenzym-A-ligase, Beta-Untereinheit	6.2.1.4	214835_s_at	<b>0,64</b>	25,56	<b>0,83</b>	47,47	AF131748.1
ACACA	Acetyl-Coenzym-A-carboxylase Alpha	6.4.1.2	212186_at	<b>1,04</b>	6,20	<b>0,62</b>	8,97	NM_000664.1
HMGCS2	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-synthase 2 (mitochondrial)	4.1.3.5	240110_at	<b>0,65</b>	13,84	<b>0,67</b>	8,04	AI090874
SLC27A2	Fettsäuretransporter, Familie 27A2 (FACVL1, FATP2)	6.2.1.3	205768_s_at	<b>1,90</b>	5,68	<b>1,92</b>	13,52	NM_003645.1
SLC27A2	Fettsäuretransporter, Familie 27A2 (FACVL1, FATP2)	6.2.1.3	205769_at	<b>2,19</b>	13,74	<b>2,15</b>	10,00	NM_003645.1
FABP6	Fettsäure-bindendes Protein 6, Ileum (Gastrotropin)		210445_at	<b>1,51</b>	12,42	<b>1,36</b>	26,35	NM_001445.1

RefSeq, Referenzsequenz; CV, Variationskoeffizient (Berechnung Kap. 2.4.5)

## 4 Diskussion

### 4.1 VDR-Genpolymorphismen

#### 4.1.1 Einfluss von Vitamin-D-Rezeptor-Gen-Polymorphismen auf die Suszeptibilität für das kolorektale Karzinom (Fall-Kontroll-Studie)

##### Allelfrequenzen

Die Allelfrequenzen der untersuchten VDR-Polymorphismen in der kaukasischen Studienpopulation, nämlich 0,34 (CDX-2), 0,41 (FokI), 0,36 (BsmI), 0,11 (Tru9I), 0,48 (ApaI) und 0,36 (TaqI) in den Kontrollen, liegen im Bereich der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Tab. 32). In anderen ethnischen Populationen, z. B. Korea, China, Singapur (Li et al., 2008; Park et al., 2006; Wong et al., 2003; Tab. 32), kommen die Minor-Allele BsmI(A), ApaI(T) und TaqI(C) seltener vor, was den genetischen Unterschied des VDR zwischen ethnischen Gruppen belegt.

**Tab. 32** Allelfrequenzen anderer Assoziationsstudien zu VDR-Polymorphismen und dem Vorkommen von kolorektalen Karzinomen (Kontrollen)

Ethnie - Autor	CDX-2	FokI	BsmI	Tru9I	ApaI	TaqI	PolyA	Land	Kontrollen
<b>Kaukasier</b>									
<b>Eigene Ergebnisse</b>	<b>0,34</b>	<b>0,41</b>	<b>0,36</b>	<b>0,11</b>	<b>0,48</b>	<b>0,36</b>	<b>0,35</b>	<b>Russland</b>	<b>256</b>
<i>HapMap</i>	0,23	0,44	0,44	0,13	0,58	0,44	0,37		
Gong et al. 2005				0,11				USA	220
Grau et al. 2003		0,37				0,33		USA	405
Grünhage et al. 2008		0,32						Deutschland	220
Ingles et al. 2001		0,4	0,37					USA	394
Ochs-Balcom et al. 2008	0,20	0,39				0,37		USA	246
Peters et al. 2001		0,34						USA	314
Peters et al. 2004						0,38		USA	774
Slattery et al. 2001		0,40	0,43			0,43	0,43	USA	364
Slattery et al. 2004b			0,41				0,41	USA	1544
Speer et al. 2001			0,43					Ungarn	112
Sweeney et al. 2006		0,39	0,41				0,41	USA	2503
Theodoratou et al. 2008		0,39	0,41		0,46			England	2793
Yaylim-Eraltan et al. 2007		0,32				0,41		Türkei	52
<b>Asiaten</b>									
<i>HapMap</i>	0,10	0,26	0,13	0,24	0,39	0,12	0,06		
Li et al. 2008		0,48	0,26					China	200
Park et al. 2006		0,42	0,05		0,23	0,04		Korea	318
Wong et al. 2003		0,47						Singapur	890

Die Häufigkeiten der Minor-Allele in den Fällen liegen ebenfalls im Bereich bisheriger Studien zum kolorektalen Karzinom an kaukasischen Populationen (Tab. 33).

**Tab. 33** Allelfrequenzen anderer Assoziationsstudien zu VDR-Polymorphismen und dem Vorkommen von kolorektalen Karzinomen (Fälle)

Ethnie - Author	CDX-2	FokI	BsmI	Tru9I	ApaI	TaqI	PolyA	Land	Fälle
<b>Kaukasier</b>									
<b>Eigene Ergebnisse</b>	<b>0,34</b>	<b>0,45</b>	<b>0,37</b>	<b>0,09</b>	<b>0,47</b>	<b>0,37</b>	<b>0,35</b>	<b>Russland</b>	<b>256</b>
<i>HapMap</i>	0,23	0,44	0,44	0,13	0,58	0,44	0,37		
Gong et al. 2005				0,11				USA	171
Grau et al. 2003		0,36				0,35		USA	398
Grünhage et al. 2008		0,33						Deutschland	192
Holt et al. 2002			0,49					USA	40
Hubner et al. 2008	0,23	0,38	0,40		0,49	0,39		England	546
Ingles et al. 2001		0,39	0,38					USA	373
Ochs-Balcom et al. 2008	0,26	0,42				0,42		USA	250
Peters et al. 2001		0,38						USA	289
Peters et al. 2004						0,39		USA	763
Slattery et al. 2001		0,38	0,39			0,38	0,37	USA	250
Slattery et al. 2004b			0,39				0,38	USA	1346
Speer et al. 2000			0,42					Deutschland	59
Speer et al. 2001			0,42					Ungarn	56
Theodoratou et al. 2008		0,40	0,40		0,48			England	2070
Yaylim-Eraltan et al. 2007		0,21				0,50		Türkei	26
<b>Asiaten</b>									
<i>HapMap</i>	0,10	0,26	0,13	0,24	0,39	0,12	0,06		
Li et al. 2008		0,46	0,16					China	200
Park et al. 2006		0,29	0,07		0,30	0,06		Korea	109
Wong et al. 2003		0,54						Singapur	217

Eine bimodale Verteilung des poly(A)-Mikrosatelliten (Abb. 22) mit einer Lücke, einem Minimum und einem Maximum für bestimmte poly(A)-Wiederholungen der Allele wurde gefunden (Flügge et al. 2008). Die langen und kurzen poly(A) Varianten waren in der Studienpopulation in Fällen und Kontrollen mit den Häufigkeiten 0,65 (L) beziehungsweise 0,35 (S) verteilt (Tab. 17), was bisher beschriebene Frequenzen in der kaukasischen Bevölkerung in Kontrollen und bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen bestätigt (Slattery et al., 2001, 2004a, 2004b, 2004c, 2006a, 2000b; Sweeney et al., 2006; Tab. 32, 33). Das Minor-Allel kommt bei Asiaten deutlich seltener vor (Allelfrequenz 0,06) (HapMap, Tab. 33). Beim Untersuchen der Beziehung zwischen dem VDR-poly(A)-Polymorphismus und der Knochendichte in einer schwedischen Population zeigten Grundberg et al. (2003) erstmals

eine große Streuung von 9 bis 23 A-Repeats. Abweichend von Grundberg et al. (2003) fanden wir in unserer Studienpopulation keine poly(A)-Allele mit weniger als 14 A-Repeats oder mit mehr als 22 A-Repeats (Tab. 17). Außerdem gibt es eine deutliche Lücke zwischen kurzen und langen Allelen; so treten keine 16-A-, 17-A-, und 18-A-Allele in der Population auf (Abb. 22). Abgesehen von diesen Unterschieden entsprechen unsere Ergebnisse denen von Grundberg et al. (2003).

### **Einzelvarianten**

Zwischen den Einzelvarianten des VDR und dem Vorkommen von kolorektalen Karzinomen bei Kaukasiern wurde keine Assoziation gefunden. Zu diesem Ergebnis kamen auch Studien anderer Autoren an kaukasischen Populationen (Grau et al., 2003; Peters et al.; 2001, 2004). Grau et al. (2003) und Peters et al. (2001, 2004) untersuchten FokI und TaqI in 398 Fällen und 405 Kontrollen und in 289 bzw. 763 Fällen und 314 bzw. 774 Kontrollen und fanden keine Assoziationen mit den Einzelvarianten. Deren Stichprobengröße entspricht in etwa unserem Stichprobenumfang.

Park et al. (2006) untersuchte 109 Patienten mit kolorektalen Karzinomen und 318 Kontrollen einer asiatische Population aus Korea und konnte ebenso keine signifikanten Unterschiede für die Einzelvarianten FokI, BsmI, ApaI, und TaqI zeigen.

Widersprüchliche Ergebnisse wurden für den Polymorphismus BsmI beschrieben. Sweeney et al. (2006) und Kadiyska et al. (2006) fanden kürzlich eine Assoziation zwischen BsmI(G) und Kolonkarzinom (OR=2,40; 95% CI 1,43-4,02 und OR=1,80; 95% CI 0,81-4,05), wohingegen Slattery et al. (2001) eine positive Assoziation für BsmI(A) und Kolonkarzinom (OR=0,50; 95% CI 0,30-0,90) in einer kaukasischen Population fanden.

Für den poly(A)-Mikrosatelliten wurde keine signifikant unterschiedliche Verteilung zwischen den beiden Studienpopulationen (Tab. 17) beobachtet. Bislang gab es nur einige Berichte über den VDR-poly(A)-Polymorphismus und eine Prädisposition für kolorektale Karzinome (Slattery et al., 2001, 2004a, 2004b, 2004c, 2006a, 2000b; Sweeney et al., 2006). Entgegen den Ergebnissen von Slattery et al. (2001, 2004c) und Grundberg et al. (2003) konnten wir keine Assoziationen zwischen den Einzelvarianten des poly(A)-Mikrosatelliten und dem Auftreten von Kolonkarzinomen finden.



#### 4.1.2 Einfluss von Kopplungsungleichgewicht, komplexen Genotypen und Haplotypen

##### **Kopplungsungleichgewicht**

Das bisher beschriebene paarweise Kopplungsungleichgewicht zwischen BsmI, ApaI, TaqI und Tru9I (Slattery et al., 2001) konnte mit dieser Studie bestätigt werden (Tab. 15). Die mit dem Kopplungsungleichgewicht übereinstimmenden Haplotypen sind nicht unterschiedlich zwischen den Studiengruppen verteilt. Die hauptsächlichen Haplotypen-Kombinationen sind BsmI(G)#TaqI(T) und BsmI(A)#TaqI(C).

Der VDR-poly(A)-Mikrosatellit weist in unserer Studie ein paarweises Kopplungsungleichgewicht mit den nahegelegenen Loci BsmI, Tru9I, ApaI, TaqI auf, was bereits von Slattery et al. (2001) beschrieben wurde, und konnte somit in dieser Studie bestätigt werden (Tab. 18, 19, Abb. 23).

Ferner konnte das Fehlen einer Kopplung zwischen poly(A) und FokI (Sweeney et al., 2006) bekräftigt werden, was wahrscheinlich auf die größere Distanz zwischen dem poly(A)-Lokus und FokI als auch CDX-2 zurückzuführen ist. Dies bestätigt die von Nejentsev et al. (2004) identifizierte Kopplungsungleichgewicht-Bruchstelle in der Nähe von FokI. Die untersuchten Polymorphismen BsmI, ApaI, TaqI, Tru9I und poly(A) liegen demnach in einem Block, dann folgt eine Kopplungsungleichgewicht-Bruchstelle bei FokI und der Polymorphismus CDX2 liegt in einem anderen Block.

##### **Komplexe Genotypen**

Komplexe Genotypen der VDR-Polymorphismen sowie des VDR-poly(A)-Polymorphismus und ihre Relevanz für das kolorektale Karzinom wurden von Slattery und Mitarbeitern (Slattery et al., 2001, 2004a, 2004b, 2004c, 2006a, 2000b; Sweeney et al., 2006) bei Kolon- und Rektumkarzinom-Patienten der „Kaiser Permanente Medical Care Program of Northern California (KPMCP)“-Studienpopulation untersucht. Sie fanden eine Assoziation zwischen dem Genotyp poly(A)(SS) und erhöhtem Darmkrebsrisiko (Slattery et al., 2001, 2004a, 2004b, 2004c). Der komplexe Genotyp poly(A)(LL)/BsmI(GG) mit einem verminderten Risiko für Rektumkarzinome assoziiert (Slattery et al., 2006a), während poly(A)(SS)/BsmI(AA) mit einem gesteigerten Risiko für Rektumkarzinome verbunden war (Slattery et al., 2006b). Der Haplotyp poly(A)(L)#BsmI(G) war mit einem verringerten Darmkrebsrisiko verknüpft (Sweeney et al., 2006).

Es ist jedoch anzumerken, dass die genannten Polymorphismen in den oben zitierten Studien im Zusammenhang mit diätetischen und anderen Faktoren untersucht wurden. Die Beziehungen zwischen Karzinomrisiko und Genotyp wurden nicht in der gesamten Patientenpopulation, sondern nur in Subgruppen beobachtet, die durch Stratifizierung entsprechend dieser Faktoren gebildet worden waren.

### **Haplotypen**

BsmI(G)#ApaI(G)#TaqI(T) ist ungeachtet der Ethnie der häufigste Haplotyp des VDR-Gens, gefolgt von BsmI(A)#ApaI(G)#TaqI(C) und BsmI(G)#ApaI(T)#TaqI(T) bei Kaukasiern, und BsmI(G)#ApaI(T)#TaqI(T) und BsmI(A)#ApaI(G)#TaqI(T) bei Asiaten (Thakkinstian et al., 2004). Einer der Schutzhaplotypen, BsmI(A)#TaqI(T), kommt häufiger bei Asiaten als bei Kaukasiern vor, was ein Grund für das seltenere Auftreten von kolorektalen Karzinomen in asiatischen Populationen sein könnte.

Während die Arbeitsgruppe um Sweeney et al. (2006) bei Kaukasiern den Haplotyp BsmI(A)#PolyA(L)#FokI(C) in Assoziation zu erhöhtem Risiko für Kolonkarzinom ermittelten, fanden Park et al. (2006) in einer koreanischen Population keine signifikanten Unterschiede für BsmI, ApaI, TaqI und FokI und deren Haplotypen, aber assoziierten den Haplotyp FokI(T)#BsmI(G)#ApaI(G)#TaqI(T) mit einem reduziertem Darmkrebsrisiko.

In der vorliegenden Arbeit konnten die Vitamin-D-Rezeptor-Haplotypen BsmI(G)#TaqI(C) und BsmI(A)#TaqI(T) identifiziert werden, die invers mit dem Vorkommen von kolorektalem Karzinom assoziiert sind ( $p < 0,001$ ). Das relative Risiko für diese Haplotypen ist 0,067 (95% CI, 0,016-0,284) beziehungsweise 0,188 (95% CI, 0,077-0,461), d.h. das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, beträgt für Individuen, die mindestens einen dieser Haplotypen tragen, verglichen mit Nicht-Trägern ca. 7% beziehungsweise 20% (Abb. 20). Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass diese als Schutzhaplotypen einen protektiven Effekt gegenüber kolorektalem Karzinom haben (Flügge et al. 2007).

Meines Wissens sind diese Haplotypen bisher nicht beschrieben worden. Sie sind zwar selten, aber höchst signifikant und nur durch Haplotypenanalyse detektierbar. Das könnte ein Grund sein, warum sie bisher nicht durch andere Arbeitsgruppen gefunden wurden, denn nicht in allen Studien wurde eine Haplotypenanalyse durchgeführt. Varianten von BsmI und TaqI sind als Einzelvarianten oder Genotyp-Kombinationen mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert worden, aber ihr funktioneller Einfluss ist noch nicht aufgeklärt. Die Erkenntnis, dass die

Schutzhaplotypen die sind, die vom Kopplungsungleichgewicht abweichen, unterstützt die Hypothese eines mit diesen Haplotypen verbundenen noch unbekanntem funktionellen Mutationsortes. Keine andere Assoziationsstudie gab einen Hinweis darauf, dass die von mir als schützend identifizierten Haplotypen eine verstärkte Empfindlichkeit für die Krankheit bewirkten.

Nur die Personen, die mindestens ein von der Kopplung abweichendes Allel tragen, nämlich BsmI(G)#TaqI(C) oder BsmI(A)#TaqI(T), weisen einen Schutz vor kolorektalem Karzinom auf (Abb. 20). Diese protektiven Haplotypen kommen weniger häufig vor als die nicht-protektiven. Die Schutzhaplotypen BsmI(G)#TaqI(C) und BsmI(A)#TaqI(T) können nicht entdeckt werden, wenn BsmI (GG oder GA) oder TaqI (CC oder CT) isoliert betrachtet werden, weil die Mehrheit dieser Genotypen den nicht-protektiven Haplotypen angehört, was wiederum den existierenden Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen maskiert (Abb. 20). Die geringeren Freiheitsgrade von Haplotypenanalysen führen zu einer erhöhten statistischen Aussagekraft von Haplotypenanalysen verglichen mit Einzelvarianten-Analysen.

Die molekularen und biochemischen Zusammenhänge sind noch immer nicht vollständig geklärt. Da BsmI in einer nicht-kodierenden Region lokalisiert ist und TaqI eine kodierende, aber stille Mutation ist, gibt es keine offensichtliche biologische Bedeutung dieser Varianten. Zur funktionellen Auswirkung stiller Mutationen gibt es verschiedene Hypothesen. Ein direkter Einfluss auf die Stabilität von mRNA oder VDR-Protein ist relativ unwahrscheinlich, allerdings könnte der Basenwechsel die Effizienz der Translation beeinträchtigen. Außerdem ist vorstellbar, dass die Polymorphismen das Spleißen durch Veränderung der hnRNA-Struktur beeinflussen oder eine Änderung der DNA-Struktur hervorrufen, was sich auf die Transkription, z. B. durch Bildung von Loops, auswirken könnte. Über die Relevanz von stillen oder Intron-lokalisierten Polymorphismen ist bereits berichtet worden, beispielsweise die Bildung zusätzlicher Spleiß-Stellen durch SNPs in einem CYP3A5 Intron (Kuehl et al., 2001) oder die Synthese eines Proteins mit veränderter Struktur und Funktionseigenschaft (Komar et al. 2007).

Eine weitere denkbare Erklärung meiner Ergebnisse könnte eine Verbindung der untersuchten SNPs zu anderen noch nicht identifizierten Mutationen sein. Diese Kopplungshypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass der Schutz von mindestens einem Allel abhängt, das nicht dem Kopplungsungleichgewicht entspricht, was darauf hinweist, dass sich zwei normalerweise getrennte Regionen auf ein und demselben Allel befinden müssen, um den

protektiven Effekt zu erzielen. Die Bedeutung dieser Region für den Karzinom-protektiven Effekt setzt eine Beteiligung von anderen Sequenzen als die von BsmI/TaqI voraus. Wenngleich die Einzelvarianten des VDR keine namhafte funktionelle Bedeutung haben und nicht das verringerte Darmkrebsrisiko begründen, können die Ergebnisse implizieren, dass eine andere Variante des VDR-Gens oder benachbarte Sequenzen mit diesem Mutationsort gelinkt sind.

Die Ergebnisse, die für die russische Fall-Kontroll-Population beobachtet wurden d.h. die gefundenen protektiven VDR-Haplotypen, könnten in der Zusammensetzung des Patientenkollektives begründet sein. Möglicherweise besteht ein spezieller genetischer Hintergrund der getesteten russischen Fall-Kontroll-Population, eine Kopplung mit anderen Merkmalen oder eine nicht-bekanntes Blutsverwandschaft innerhalb dieses Kollektives, was zu einem statistisch signifikanten Sonderfall mit einer stärkeren Abweichung vom Kopplungsungleichgewicht führte. Ein ähnlicher Aspekt könnte auch für die vielen gefundenen Signifikanzen der Studienpopulation des „Kaiser Permanente Medical Care Program of Northern California“ (KPMCP) mit Kolon- und Rektumkarzinom-Patienten der Arbeitsgruppe um Slattery (Slattery et al., 2001, 2004a, 2004b, 2004c, 2006a, 2006b; Sweeney et al., 2006) ursächlich sein, denn an dieser Studie könnte eine Gruppe von Mormonen teilgenommen haben. Auch hier wäre eine spezielle Genetik oder Verwandtschaft innerhalb der Population möglich.

### **poly(A)-Mikrosatellit**

Unsere Untersuchungen konnten keine Assoziation zwischen poly(A)-Einzelvarianten und dem Vorkommen von kolorektalen Karzinomen zeigen (Tab. 17). Dennoch fanden wir eine hohe Signifikanz für eine Assoziation zwischen dem Auftreten von Kolonkarzinomen und dem Paar poly(A)-TaqI als auch dem komplexen Genotyp poly(A)-TaqI-BsmI und eine Tendenz für poly(A)-BsmI (Tab. 18, 19).

Diese Ergebnisse müssen unter Berücksichtigung des höchst signifikanten Effektes des TaqI-BsmI-Paares (Flügge et al., 2007) interpretiert werden. Wie in Tab. 19 ersichtlich, sind nur die nicht-kopplungskonformen Allele unterschiedlich zwischen Fällen und Kontrollen verteilt. Die inverse Assoziation zwischen dem Vorkommen von kolorektalem Karzinom und den Haplotypen poly(A)(S)#TaqI(T), poly(A)(L)#TaqI(C) und poly(A)(S)#BsmI(G) beruht vorwiegend auf dem Beitrag der Haplotypen TaqI(C)#BsmI(G) und TaqI(T)#BsmI(A)

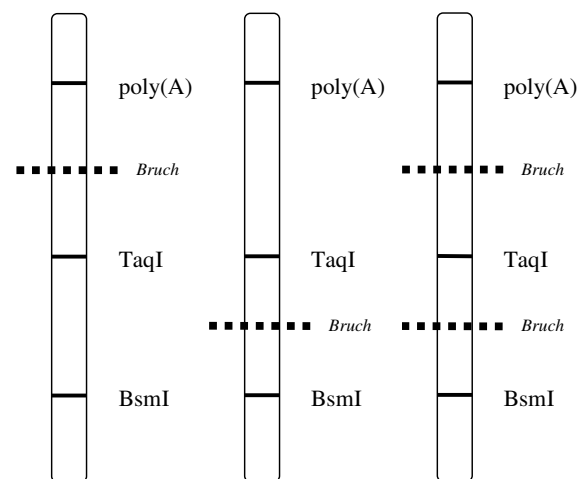
(Flügge et al., 2007). Die Haplotypen poly(A)(S)#TaqI(T)# BsmI(G) und poly(A)(L)#TaqI(C)#BsmI(A) tragen durch die geringe Häufigkeit nur marginal zu dieser Assoziation bei.

Varianten von poly(A), TaqI und BsmI wurden als Einzelvarianten oder Kombinationen von Genotypen mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, aber die funktionelle Bedeutung ist bis jetzt nicht geklärt worden (Uitterlinden et al., 2004). Poly(A) ist in einer nicht-kodierenden Region lokalisiert, eine Beteiligung dieser Region an der Regulation von mRNA-Stabilität wird diskutiert. Derzeitige Daten zur mRNA-Stabilität sind jedoch widersprüchlich (Whitfield et al., 2001; Durrin et al., 1999). Eine Kopplung dieser Loci mit bis jetzt nicht identifizierten funktionellen Polymorphismen könnte die beobachteten Assoziationen erklären.

Diese Hypothese wird durch die frühere Erkenntnis unterstützt, dass die inverse Assoziation zwischen dem Vorkommen von kolorektalem Karzinom und den Haplotypen TaqI(C)#BsmI(G) und TaqI(T)#BsmI(A) von mindestens einem Allel abhängt, das nicht dem Kopplungsungleichgewicht entspricht, was darauf hinweist, dass sich zwei normalerweise getrennte Regionen auf ein und demselben Chromosomenstrang befinden müssen, um den protektiven Effekt zu erzielen (Flügge et al., 2007).

Basierend auf dieser Annahme könnte die zusätzliche Information des poly(A) Locus helfen, den Bereich einzuengen, in dem funktionelle Polymorphismen zu erwarten wären. Vernachlässigt man die Haplotypen poly(A)(S)#TaqI(T)#BsmI(G) und poly(A)(L)#TaqI(C)#BsmI(A) wegen ihrer geringen Häufigkeit, können die verbleibenden Haplotypen, die nicht dem Kopplungsungleichgewicht entsprechen, in zwei Kategorien eingeteilt werden: die, die nur einen Chromosomenstrang-Bruch zwischen TaqI und BsmI aufweisen

(poly(A)(L)#TaqI(T)#BsmI(A) und poly(A)(S)#TaqI(C)#BsmI(G)) und die, die zwei Brüche besitzen, einen zwischen TaqI und BsmI und einen zusätzlichen Bruch zwischen poly(A) und TaqI (Abb. 42), nämlich poly(A)(L)#TaqI(C)#BsmI(G) und poly(A)(S)#TaqI(T)#BsmI(A).



**Abb. 42** Hypothese der Chromosomenstrang-Brüche für die VDR-Polymorphismen BsmI, TaqI und poly(A).

Die letztere Konfiguration würde das normale Kopplungsungleichgewicht wiederherstellen für alle Loci auf diesem Chromosomenstrang, abgesehen von denen zwischen den zwei Bruchstellen. Für den Fall, dass ein relevanter funktioneller Polymorphismus distal zum poly(A) Locus gelegen ist, würden die Haplotypen mit Doppel-Bruch nicht mehr die Kriterien erfüllen, zwei normalerweise getrennte Regionen auf einem Chromosomenstrang zu vereinen, und würden deshalb nicht mehr als protektiv gegen kolorektale Karzinome erwartet werden.

Beim Übertragen dieser Hypothese auf unsere Daten (Tab. 19) wurden nur 4 der 24 Haplotypen poly(A)(L)#TaqI(C)#BsmI(G), die 2 von insgesamt 18 Individuen repräsentieren, und keiner der 19 Haplotypen poly(A)(S)#TaqI(T)#BsmI(A) von insgesamt 16 Individuen in der Gruppe der Darmkrebspatienten gefunden. Folglich unterstützen diese Ergebnisse, obgleich einige Zahlen ziemlich klein sind, die Hypothese eines gekoppelten funktionellen Polymorphismus eher zwischen poly(A) und TaqI als zwischen poly(A) und einem poly(A)-distalen Locus. Allerdings sind weitere Untersuchungen nötig, um die biologischen Grundlagen dieser Assoziationen zu klären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, obwohl die poly(A) Einzelvarianten in der Studienpopulation nicht mit dem Auftreten von Kolonkarzinomen verbunden waren, unterstützt die kombinierte Analyse dieses Mikrosatelliten mit den nahegelegenen SNPs TaqI und BsmI die Hypothese eines bis jetzt nicht identifizierten Polymorphismus, der sich folglich zwischen poly(A) und TaqI befindet.

## **4.2 Polymorphismen von Genen des Vitamin-D-Metabolismus**

Die Genotyp- und Allelfrequenzen der in der Studienpopulation untersuchten Polymorphismen (Tab. 21) stimmen mit bisherigen Studien an kaukasischen Kontrollen (Malecki et al, 2003; McCullough et al. 2007) und Fällen (Holick et al., 2007) überein, entsprechen Referenzfrequenzen (HapMap, PubMed) und bestätigen damit die Aussagekraft unserer Studie. Für alle untersuchten Polymorphismen von Genen des Vitamin-D-Metabolismus konnten weder als Einzelvariante noch als komplexe Genotypen bzw. Haplotypen stetige signifikante Unterschiede gezeigt werden. Dieses Ergebnis lässt sich aufgrund dem Fehlen entsprechender Vergleichstudien an Fällen und Kontrollen zum Thema Darmkrebsrisiko an kaukasischen Populationen nicht ausreichend diskutieren.

Es existiert bisher nur eine Arbeit zum Thema kolorektales Karzinom und CYP24A1-Polymorphismen. Roff und Wilson (2008) untersuchten jedoch nicht die von uns untersuchten Varianten. Die CYP24A1-Einzelvarianten lieferten in unserer Studie nur Trends, aber keine Assoziationen mit dem Vorkommen von kolorektalen Karzinomen. Nur im Zusammenhang mit anderen Krankheiten wurden CYP24A1-Polymorphismen bisher beschrieben.

Zu den von uns untersuchten CYP27B1-Polymorphismen sind bisher keine Arbeiten zum Kolonkarzinomrisiko angefertigt worden. Nur im Zusammenhang mit anderen Krankheiten wurden CYP27B1-Polymorphismen bisher beschrieben. Der in Tab. 22 gefundene Hinweis auf eine unterschiedliche Verteilung der CYP27B1-Genotypen trifft nur für die Gruppenanalyse Rektum-Kolon zu und ist stark durch die Kopplung dieser SNPs in einem Block (Tab. 27, Abb. 27) begründet. Zu den von uns untersuchten CYP27A1-Polymorphismen sind keine Angaben verfügbar.

Das starke blockweise Kopplungsungleichgewicht zwischen den Varianten CYP27B1<sub>+2838</sub>, CYP27B1<sub>-1077</sub> und CYP27B1<sub>-1260</sub> des CYP27B1 Gens (Tab. 27, Abb. 27) entspricht bisher veröffentlichten Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Nejentsev et al., 2004, Fang et al., 2007). Die Haplotypen-Blockstruktur gibt eine sinnvolle Aussage, welche SNPs wahrscheinlich zusammen vererbt werden.

Zwischen den untersuchten Polymorphismen und dem Vorkommen von kolorektalen Karzinomen wurden trotz der ausreichenden Größe der Studienpopulation keine Assoziationen gefunden, was eventuell auf das Studiendesign (Tab. 20) zurückzuführen ist, denn Geschlecht und Alter sind unterschiedlich verteilt zwischen Fällen und Kontrollen (Mann-Whitney-Test,  $p < 0,001$ ). Es lässt sich nicht vollständig ausschließen, dass bei exakt gepaarten Patienten-Kollektiven Signifikanzen auftreten würden, verbergen sich doch in den gegenüber den Fällen viel jüngeren Kontrollen „potentielle“ Darmkrebs-Fälle, was trotz kritischer Betrachtung der Daten und Anwendung einer Adjustierung mittels Alterskorrektur einen grundlegenden Einfluss auf die Studie hat.

### 4.3 Genexpressionsanalyse

#### 4.3.1 Interpretation der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR nach Induktion in Zellkulturen (Differenzierungsmodell)

Differenzierung bezeichnet in der Biologie die Entwicklung von Zellen oder Geweben vom Grundzustand zu einer in Struktur und Funktion spezialisierten Form.

Differenzierung erreicht man entweder durch unkontrolliertes Wachstum von Zellen oder durch die Behandlung mit differenzierenden Reagenzien wie Vitamin D, ATRA oder NaB in nicht-toxischen Konzentrationen (Kruh et al. 1982). Da die erste Methode Kontrollgene wie GAPDH und ACT aufgrund sehr dichter Zellkontakte (cell contact inhibition) stark beeinflusst oder eventuell sogar verändert, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Differenzierung künstlich induziert und ausgewählte Kontroll- und Kandidatengene ausgewertet. Schließlich ließen sich differenzierte, normale und nicht-differenzierte, proliferierte, tumorhafte Zellen und deren Genexpression vergleichen. Weitere bekannte Induktoren, die wie Vitamin D ebenso eine Differenzierung hervorrufen können, sind all-trans-Retinsäure und Natriumbutyrat.

Um nun Differenzierung und Genexpression zu untersuchen, wurde ein In-vitro-Differenzierungsassay mit den Induktoren Vitamin D, NaB und ATRA und Caco-2- und SW480-Zellen mit den Inkubationszeiten 6 h und 12 h durchgeführt (Abb. 32-35). Für alle verwendeten Substanzen konnte eine Differenzierung in den Darmkrebszelllinien hervorgerufen werden und eine gesteigerte Expression von VDR und CDH1 induziert werden. Da Vitamin D die einheitlichsten und ausgeprägtesten Effekte nach 6 h und 12 h zeigte, wurde schließlich Vitamin D aufgrund der signifikanten Ergebnisse für die weiterführende Mikroarray-Genexpressionsanalyse ausgewählt.

#### **Vitamin D (1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>)**

Vitamin D fördert die Differenzierung von humanen Darmkrebszellen, die VDR exprimieren und induziert E-Cadherin-Expression (Palmer et al., 2001). Die durch induzierte Differenzierung hervorgerufene Überexpression von VDR und CDH1 mit Vitamin D (Abb. 32-35) entspricht bisher veröffentlichten Studien in Caco-2- und SW480-Zellen (Palmer et al., 2001, 2003; Fernandez-Garcia et al., 2005).

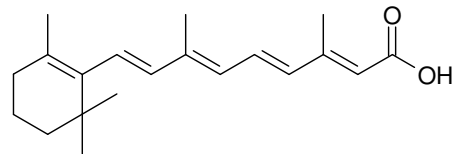
In anderen Studien konnte nach Behandlung mit Vitamin D (HT-29, Zhao und Feldman, 1993) oder Retinoiden (HepG2, Wang et al., 2008; HT-29, Kane et al., 1996) ebenso eine



Hochregulierung des VDR beobachtet werden. Eine erhöhte CDH1-Expression nach Behandlung mit Vitamin D (HT-29, Schröder et al., 1998) und NaB (MDA-MB-231, Brustkrebszelllinie, Wang et al., 2001) konnte auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden.

### **All-trans-Retinsäure (ATRA, all-trans retinoic acid, RA, atRA, Tretinoin)**

Retinoide wie ATRA spielen im menschlichen Körper eine essentielle Rolle bei der Zellproliferation sowie bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen. Sie regulieren das zelluläre Wachstum, Differenzierung, Entwicklung und Apoptose (De Luca et al., 1994;

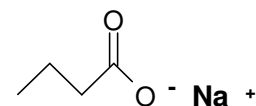


Kojima et al., 2004). ATRA ist ein starkes Zell-differenzierendes Agens (Gudas et al., 1994). Reynolds et al. (1998) identifizierten ATRA als die effektivste chemische Verbindung zur Induktion von Differenzierung identifiziert. ATRA inhibiert ebenso die Proliferation, ist proapoptotisch, fördert die Differenzierung in intestinalen Zelllinien. Baltes et al. (2004) konnten ATRA als potenten Induktor von epithelialer Differenzierung für die Darmkrebszelllinie Caco-2 bestätigen.

Die Ergebnisse des durchgeführten Differenzierungsassays mit der Darmkrebszelllinie Caco-2 zeigten ähnliche Effekte auf den VDR durch den potentiellen Induktor ATRA wie bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Wang et al., 2008; Kane et al., 1996). Übereinstimmend mit Baltes et al. (2004) konnte nach der Behandlung von Caco-2-Zellen mit all-trans-Retinsäure eine Differenzierung hervorgerufen werden. Ein Einfluss auf die Permeabilität der Caco-2-Monolayer durch Retinsäure wurde von dieser Arbeitsgruppe untersucht, ein Mechanismus konnte aber nicht geklärt werden.

### **Natriumbutyrat (NaB)**

Butyrate und andere kurzkettige Fettsäuren sind häufige Bestandteile des Darmlumens in millimolaren Konzentrationen und werden im Kolon in großen Mengen durch bakterielle Fermentation von nicht-



absorbierten komplexen Kohlenhydraten des Verdauungstraktes gebildet. Sie spielen eine Rolle bei der Homöostase der Darmmukosa, indem sie Zellreifung, Zellteilung, Zellwachstum

und Proliferation unterdrücken und Differenzierung und Apoptose induzieren (Heerdt et al., 1994, 1997; Reynolds et al., 1998).

Für die Induktion mit NaB in Caco-2-Zellen konnte in Übereinstimmung mit Daniel et al. (2004) ein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen gefunden werden, der eine VDR-Überexpression aufwies (Abb. 32). Verstärkte Expressionen durch NaB wurden in vielen Zelllinien beobachtet, aber Strategien und Ergebnisse variieren. So beobachteten bereits Herz und Halwer (1982) eine Induktion der Aktivität der Alkalische Phosphatase (AP) als Marker für Zelldifferenzierung durch NaB in HT-29 Zellen. Die untersuchte Induktion mit NaB war für CDH1 uneinheitlich (Abb. 33), die beschriebene gesteigerte CDH1-Expression kann folglich nicht bestätigt werden.

#### **4.3.2 Technische Probleme und Übertragbarkeit**

Wie auf der rechten Seite der Abb. 14 zu erkennen, traten bei der Etablierung des VDR (hier mit unterschiedlichen Primerpaaren) erhebliche Probleme auf, ein spezifisches Produkt mit einem Schmelzpunkt zu erhalten. Die dadurch entstehenden heterogenen Daten und schlechten Ergebnisse der PCR könnten durch eine veränderte Tertiärstruktur des VDR-Gens, alternativ gespaltete Artefakte oder die Hybridisierung ähnlicher Sequenzen eines anderen Gens verursacht sein. Die schlechte Reproduktion genauer Werte könnte auch durch die Ernte der Zellen in unterschiedlichen Stadien im Zellzyklus begründet sein. Möglich wäre auch, dass der VDR mutiert, nicht oder unzureichend exprimiert ist. Derartige Probleme bei der Amplifikation des VDR und geeigneten Primerpaar-Findung traten bereits in anderen Arbeitsgruppen auf.

Die stärkeren Effekte der Induktoren auf die SW480-Zellen (Abb. 34, 35) sind vermutlich durch die rundlichere Zellstruktur begründet, was zu einer größeren Kontaktfläche führt, aber auch schneller toxische Effekte mit stärker konzentrierten Lösungen hervorruft. Es lässt sich sagen, dass sich die stärksten Effekte nach 6 h Behandlung zeigten.

Das Referenzgen GAPDH besitzt zwar mehr Stabilität als das Referenzgen ACTB – auch gegen toxische Einflüsse – ist allein aber trotzdem kein idealer interner Standard, da er oft reguliert wird durch die Beteiligung am Kohlenhydratstoffwechsel. Sobald Zellen differenzieren, kann ACTB als Strukturprotein durch Zell-Kontakt-Inhibition leicht beeinflusst sein. Gewöhnlich haben beide Normalisierungskontrollen kaum eine Auswirkung auf die Expression, aber sie können trotzdem beide beeinflusst sein. Wie in den Abb. 32-35

dargestellt, zeigt die Normalisierung auf GAPDH keine auffälligen Unterschiede zur Normalisierung auf ACTB.

Da es sich um unabhängige Experimente handelte, traten hohe Standardabweichungen auf. Dies kann durch die doch sehr subjektive Einschätzung der Konfluenz verursacht sein, wengleich die Experimente intensiv und stetig optimiert wurden und die Induktion mit Zeitabständen und gemeinsamer Ernte wesentlich bessere und weniger variable Ergebnisse brachten als die gemeinsame Induktion und Ernte mit Zeitabständen.

Die vorgenommenen Vitamin-D-Induktionen fanden unter künstlichen Bedingungen mit Zellen in Monokulturen und unter Verwendung künstlicher, hochreiner und konzentrierter Substanzen statt. Diese Gegebenheiten spiegeln natürliche Bedingungen nicht vollständig wider. Deshalb besteht sicher eine beschränkte Übertragbarkeit der durchgeführten In-vitro-Experimente und entwickelten Modelle auf komplexe In-vivo-Situationen.

### **4.3.3 Wahl der Referenz- und Kandidatengene**

Als Referenzgene bzw. Normalisierungskontrollen werden häufig Gene verwendet, die in allen Geweben des Körpers exprimiert werden, idealerweise eine zu jedem Zeitpunkt gleichbleibende Expression haben (jeweils spezifisch für das entsprechende Gewebe) und deren Expression nur wenig von äußeren Bedingungen abhängt (Übersichtsartikel von Suzuki et al., 2000). Sie werden im Gegensatz zu gewebs- oder zellspezifischen, stark regulierten Genen auch als Haushaltsgene („Housekeeping Genes“) bezeichnet. Da zahlreiche Untersuchungen ergaben, dass kein Gen als universell einsetzbares Referenzgen geeignet ist (Krusekopf et al., 2005; Dydensborg et al., 2006), die herkömmliche Verwendung von nur einem einzigen Gen für die Normalisierung zu relativ starken Fehlern führt (Vandesompele et al., 2002) und um biologische Variationen bei der Ergebnisinterpretation berücksichtigen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kombination aus zwei gebräuchlichen internen Standards als Normalisierungskontrolle verwendet.

Die Wahl fiel auf GAPDH und ACTB als am häufigsten verwendete Referenzgene zur Normalisierung in Caco-2-Zellen (Piana et al., 2008). GAPDH, verantwortlich für Energie-Stoffwechsel, Metabolismus und katalytische Aktivität, ist im Zytoplasma und Zellkern lokalisiert und enzymatisch als Oxidoreduktase an der Glykolyse und Gluconeogenese beteiligt. ACTB, verantwortlich für Zellstruktur, Stabilität, Zellbeweglichkeit und

intrazellulären Transport, ist eines der 5 häufigsten Proteine in Eukaryoten und als Strukturprotein des Zytoskellets an Zellkontakt und -anheftung beteiligt.

Als Marker für Differenzierung wurden die Kandidatengene VDR und CDH1 ausgewählt (Murillo und Mehta 2005). VDR bildet nach Ligand-Aktivierung durch Vitamin D Heterodimere mit anderen nukleären Rezeptoren wie RXR (Abb. 6), welche durch Bindung an spezifische Vitamin-D-responsive Elemente (VDREs) in Zielgenen die Genexpression hemmen, um deren Expression zu aktivieren oder zu unterdrücken und als Transkriptionsfaktor aktiv vielfältige Gene zu regulieren.

CDH1 fungiert als Kontrollgen für Vitamin-D-Aktivität und ist für die epitheliale Homophilie d.h. Bindung gleicher Zelladhäsionsmoleküle verantwortlich. CDH1 ist ein transmembranes Linkerprotein der interzellulären Zonulae adhaerentes (Desmosomen), welches eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung des adhesiven und polarisierten Phänotyps der Epithelzellen (Takeichi, 1995) besitzt. Ein Mangel des Tumorsuppressor-Gens CDH1 ist eine übliche Erscheinung beim Übergang von Adenom zu Karzinom (Birchmeier und Behrens, 1994; Perl et al., 1998; Christofori und Semb, 1999).

#### **4.3.4 Qualitätskontrolle und Datenanalyse der Mikroarray-Ergebnisse**

Das Clusterverhalten der Chips weist eine Variabilität innerhalb der Gruppen auf, die Chips clustern nicht absolut eindeutig (Abb. 36). Dieses heterogene Verhalten von eigentlichen Parallelproben könnte durch die Expression von Stressgenen verursacht sein und stellt ein Problem in Zellkulturmodellen dar, denn die Expression ist stark von der Dichte der Zellen abhängig. Bei der Anwendung von verschiedenen Filter-Kriterien (Signifikanzlevel  $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ) ist ein Fehler 2. Art, also falsch negative Ergebnisse, natürlich möglich. Diese Gene werden nicht detektiert bzw. identifiziert.

#### **4.3.5 VDR- und CDH1-Expression nach Mikroarrayanalyse**

Die Kandidatengene aus der Genexpressionsanalyse mit RT-PCR wurden auch näher betrachtet. Die Fold-Change-Werte für CDH1 und VDR fallen wesentlich geringer im Array-Experiment als im RT-PCR-Experiment aus.

Die Affymetrix-Probe-Sets von CDH1 lieferten bei der BLAST-Analyse viele andere homologe Zielstrukturen. Die Überprüfung auf Sequenzhomologien ergab folgendes: Andere Cadherine (3, 4, 11) wurden teilweise mit  $>90\%$  Übereinstimmung bei maximal zwei

Mismatches gefunden, was darauf hinweist, dass die Sequenzen der Probe Sets nicht wirklich spezifisch für CDH1 sind. Das Gleiche gilt für die VDR Probe Sets. Hier wurden teilweise andere Gene für die Bereiche, in denen das Probe Set bindet, gefunden z.B. TXNDC10 (Thioredoxin Domäne 10), WDR7 (Abconnectin-3-beta Isoform 2) und NRP2 (Neuropilin 2 Isoform 6) mit 95% Homologie.

Die Signale und Fold-Change-Werte der vier VDR Probe Sets unterschieden sich. Außerdem waren einige Probe Set IDs von VDR und CDH1 durch die schwache Signalstärke nicht auswertbar und daher keine Induktion nachweisbar, was eventuell auf eine nicht optimale Auswahl der Oligonukleotide des Mikroarrays oder auf eine zu geringe Expression zurückzuführen wäre. Die Fold-Change-Werte der Probe Sets IDs der Kontrollgene GAPDH und ACTB wiesen eine gute Signalqualität auf und schwankten zwischen 0,835 und 1,197.

Vergleichend lässt sich für die Vitamin-D-Behandlung sagen, dass die mittels RT-PCR gemessene Expression von VDR und CDH1 ansteigt, während die CDH1-Expression im Mikroarray-Modell unverändert ist und VDR eine verminderte Expression nach 6 h Behandlung zeigt. Das RT-PCR-Ergebnis kann hiermit nur teilweise bestätigt werden.

#### **4.3.6 Interpretation der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mit GeneChip-Mikroarray**

Erhöhte oder verminderte Expressionen mit  $p < 0,01$ , einer Signalstärke  $> 400$  und einem Fold-Change-Wert  $> 1,50$  wurden für Gene des Fremdstoffmetabolismus, der Calciumhomöostase, des Phosphathaushaltes, des Glucosetransportes, der Fettsäuresynthese und des Steroid-Stoffwechsels gefunden (Tab. 31, Abb. 40, 41).

##### **Fremdstoffmetabolismus**

Es ist bekannt, dass Vitamin D die Transkription von CYP3A5 induziert. Erhöhte Fold-Change-Werte wurden für CYP3A5 gefunden, was andere Arbeiten bestätigt (Schmiedlin-Ren et al., 1997; Engman et al., 2001), aber auch von anderen Autoren nicht gezeigt werden konnte (Siest et al., 2008). Über CYP3A5 und CYP3A4 werden u.a. Xenobiotika wie Irinotecan und Tamoxifen, Toxine und andere Steroide abgebaut. Dabei veranlasst z.B. CYP3A4 die 23- und 24-Hydroxylierung von  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (Xu et al., 2006). Der Metabolismus von Medikamenten findet hauptsächlich über das Cytochrom P450-System statt. Zu dessen wichtigsten Enzymen gehört das CYP3A5, das in Niere, Darm und Leber

lokalisiert ist und strukturell stark homolog zu CYP3A4, CYP3A7 und CYP3A43 ist. Individuelle genetische Variationen der P450-Enzyme können für unterschiedliche Metabolisierungsmuster verantwortlich sein – so untersuchten Kuehl et al. (2001) CYP3A5-Polymorphismen und Ingelman-Sundberg und Rodriguez-Antona (2005) die Stoffwechsel-Aktivität und CYP3A5-Haplotypen.

CYP3A5 ist mit drei Probe Sets auf dem Array vertreten – alle drei Probe Sets wiesen die gleiche erhöhte Regulation auf. Kreuzhybridisierung der CYP3A5 Probe Sets mit den hochhomologen 3A4, 3A7 und 3A43 wurde durch BLAST-Alignment ausgeschlossen. Alle Probe Infos jeder Probe Set ID von CYP3A5 wurden mit Sequenzen des Genoms verglichen. Es handelt sich definitiv um CYP3A5.

Die starke Überexpression von CYP24A1 ist auf den metabolischen Vitamin-D-Abbau zu Calcitriol zurückzuführen und dient zur Kontrolle des regelrechten Vitamin-D-Abbaus nach Verabreichung der Substanz im Zellkultur-Modell. CYP24A besitzt in der Promotor-Region Zielsequenzen für den VDR (VDRE) und ist somit Zielgen für das VDR/RXR-Heterodimer. Chen und DeLuca (1995) untersuchten die CYP24A1-Promotor-Region genauer und fanden 2 Vitamin-D-responsive-Elemente (VDREs). Die funktionelle Charakterisierung dieser VDREs wies darauf hin, dass beide zur optimalen Induktion der CYP24A1-Expression durch 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> notwendig sind. Liu et al. (2006) konnten mittels Real-time-PCR zeigen, dass Vitamin-D-behandelte Monozyten eine verstärkte CYP24A1-Expression aufwiesen. Väisänen et al. (2005) zeigten, dass diese CYP24 Gen-Promotor-Aktivierung über 5 h anhält.

Ein Mangel an Vitamin D und Vorstufen ist mit einem erhöhten Darmkrebsrisiko assoziiert, denn Vorkommen und Sterberate stehen in direktem Zusammenhang mit den 25-Hydroxyvitamin-D-Blutspiegeln (Garland et al., 1999). Durch Senkung der CYP24A1-Enzymaktivität könnte das Darmkrebsrisiko vermindert werden, denn der Entzug an aktivem Metabolit hat einen direkten Effekt auf den Vitamin-D-Rezeptor (Abb. 3).

Die NADPH-Oxidase 1 (NOX1) wurde als erhöht reguliert identifiziert. Die Umwandlung von Calcidiol in Calcitriol wird durch NOX1 katalysiert.

Die cytosolische Sulfotransferase SULT1C2 wird durch Vitamin-D-Gabe in ihrer Expression erhöht. Bisher ist nur über eine induzierte Expression der cytosolischen SULT2A1 berichtet worden (Song et al., 2006; Chatterjee et al., 2005). SULT1C2 katalysiert die Sulfat-Konjugation vieler Hormone und Xenobiotika. Durch den Transfer von Sulfat-Resten von

3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) auf eine Phenol-haltige Akzeptor-Gruppe eines Substrates wird die Aktivität von Toxinen, Arzneimitteln und Steroiden moduliert (Dombrowski et al., 2006). Diese Induktion lässt eine Sulfatierung von Calcidiol bzw. Calcitroinsäure annehmen, die zu Hydrophilie und Ausscheidung über die Niere führt.

### **Glykolyse und Glucosetransport**

Deutlich hochreguliert mit einem Fold-Change-Wert von 2,067 war GCNT3 (Glucosaminyln-acetyl-transferase 3, Mucin-Typ). Dieses Enzym ist in der Schleimhaut lokalisiert und katalysiert die O-Glycan-Kohlenhydrat-Synthese. Verringert exprimiert mit einem Fold-Change-Wert von 0,651 liegt der Glucose-Transporter SLC2A14 (Glucose-Transporter, Familie 2A14) vor. Dieses Membran-ständige Protein transportiert Hexosen wie Glucose und Fructose in alle Zellen.

Durch die Induktion mit Vitamin D ist ein Einfluss auf die Glykolyse zu beobachten.

### **Calciumhomöostase**

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  spielt eine wichtige Rolle für die Kontrolle des Serumcalciumspiegels. Folgende Calcium-bindende Gene zeigten eine gesteigerte oder verminderte Expression: SRI (Sorcin), CA12 (Carboanhydrase XII) und S100G (S100 Calcium-bindendes Protein G).

S100G bzw. CaBP1 codiert für das Vitamin-D-abhängige Calcium-bindende Protein Calbindin D9K, welches eine VDRE für VDR/RXR-Heterodimere besitzt. Die Expression dieses cytosolischen intestinalen Proteins korreliert mit der Calcium-Transport-Aktivität. Es ist in der Lage die Calciumabsorption durch Calcium-Pufferung im Zytoplasma zu erhöhen und steigert den ATP-abhängigen Calciumtransport in duodenalen basolateralen Membranvesikeln.

Das Calcium-bindende Protein SRI (Sorcin) wurde auch überexprimiert, was mit anderen Arbeiten in human Darmkrebszelllinien übereinstimmt (Wood et al., 2004).

Alle drei Probe Sets der CA12 weisen eine Hochregulation auf. CA12 ist ein Zink-Metallo-Enzym, das die reversible Hydratation von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{H}_2\text{CO}_3$  katalysiert. Es partizipiert in zahlreichen biologischen Prozessen wie Respiration, Säure-Base-Haushalt, Digestion, Knochenresorption und Kalzifikation. CA12 ist stark exprimiert in normalen Geweben, wie Niere, Kolon, Pankreas. Es ist außerdem für die pH-Regulation verantwortlich, was bedeutend für das Überleben von hypoxischen Krebszellen ist.

### **Phosphathaushalt**

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kommt bei der Calcium- und Phosphat-Aufnahme, der Knochenbildung und der Aufrechterhaltung der Calcium- und Phosphat-Homöostase eine physiologische Bedeutung zu (Reichel und Norman, 1989).

Es gibt eine deutliche Anreicherung von regulierten Genen, die am Phosphat-Haushalt beteiligt sind, mit einer erhöhten Expression von TRPM6 (Transient-Rezeptor-Potential-Kationenkanal, Subfamilie M6), CTPS (CTP-Synthase), PLD1 (Phospholipase D1, Phosphatidylcholin-spezifisch), CDS1 (CDP-Diacylglycerol-synthase 1, Phosphatidat-cytidylyl-transferase), ETNK1 (Ethanolamin-kinase 1), MPHOSPH10 (M-Phase-Phosphoprotein 10), SLC20A1 (Anorganischer Phosphat-Transporter, Familie 20A1), PCTP (Phosphatidylcholin-Transfer-Protein) und einer verminderten Expression von ATAD2 (ATPase-Familie, AAA-Domäne 2).

TRPM6 ist ein spannungsabhängiger, membranständiger Kationen-Kanal, der zu Hypomagnesiämie und Hypocalcämie führt. Er bildet Heterodimere mit TRPM7, besitzt Serin-Threonin-Kinase-Aktivität und überträgt als Phosphotransferase Phosphatgruppen.

VDR ist ein Phosphoprotein. Seine Funktion ist durch primär phosphorylierte Serin-Reste in der Liganden- und DNA-bindenden-Domäne reguliert (Haussler et al., 1988) und er ist Substrat für 4 Proteinkinasen. Die Bindung von Calcitriol an den VDR bewirkt eine Rezeptor-Phosphorylierung, wobei Liganden-gebundene phosphorylierte Rezeptoren die Transkription stimulieren (Weigel, 1996; Weigel und Moore, 2007).

### **Fettsäuresynthese**

Neben den Rezeptoren für Steroide gehören auch die für Retinoide, Schilddrüsenhormone, Prostaglandine, Orphane, Gallensäuren und Fettsäuren zu der großen Familie der nukleären Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren in zahlreichen Geweben fungieren, was sich in der Regulation verschiedener Gene der Fettsäuresynthese widerspiegelt.

Die Enzyme ANPEP (Alanyl-Amino-peptidase, Amino-peptidase N, M, microsomal), SUCLG2 (Succinat-Coenzyme-A-ligase, Beta-Untereinheit) und ACACA (Acetyl-Coenzyme-A-carboxylase Alpha) waren vermindert und die IDH1 (Isocitrat-dehydrogenase 1) verstärkt exprimiert. Alle vier sind an der Fettsäuresynthese und dem Citratzyklus beteiligt und führen zusammen zu einer verstärkten Bildung von Acetyl-CoA, welches entweder zur



Energiegewinnung im Rahmen der Glykolyse oder zur Energiespeicherung im Rahmen der beta-Oxidation verwendet wird.

Eine Herunterregulierung der mitochondrialen HMGCS2 (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-synthase 2, mitochondrial) der Synthese und Degradation von Keton-Körpern ist zu beobachten, was zu einer höheren Verfügbarkeit von Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA für den Fettsäure-Metabolismus und die Steroidbiosynthese führt.

FABP6 (Fettsäure-bindendes Protein 6, Ileum, Gastrotropin) und SLC27A2 (Fettsäuretransporter, Familie 27A2, FACVL1, FATP2) sind beide überexprimiert nach Vitamin-D-Behandlung. FABP6 ist in der Leber lokalisiert und codiert für ein Protein im Cytoplasma, das durch Bindung von Gallensäuren und Fettsäuren in Aufnahme, Transport und Metabolismus involviert ist. SLC27A2 ist auch in der Leber lokalisiert und spielt eine Schlüsselrolle in der Degradation von Fettsäuren.

### **Cholesterol- und Steroid-Stoffwechsel**

Auffällig sind deutliche Regulationen von Zielgenen der NR-Steroid-Heterodimere (Tab. 31, Abb. 40, 41). Da der RXR den nukleären Import von ungebundenem VDR reguliert und umgekehrt, sind sowohl Zielgene des VDR als auch des RXR von der durch Vitamin-D-Behandlung hervorgerufenen Genregulation betroffen.

Das Tumorsuppressor-Gen RARRES1 (Retinolsäure-Rezeptor-Responder 1, Tazaroten-induziert) wird auch TIG1 (Tazaroten-induziertes Gen 1) genannt. Es wird durch das RXR-Heterodimer reguliert und ist stark überexprimiert. RARRES1 wird normalerweise durch das Retinoid Tazaroten (Vitamin A-Abkömmling) induziert (Wang et al., 2001). Dass Tazaroten eine differenzierende Wirkung hat, stimmt mit der These überein, dass Vitamin D auch differenzierend wirkt und RARRES1 induziert.

Die induzierte Differenzierung rief außerdem eine verminderte Expression von HSPA9 (Hitzeschockprotein 9, Mortalin) hervor. HSPA9 codiert für das Hitzeschockprotein des VDBP. Da das VDBP und das VDR/RXR-Heterodimer stark durch die Vitamin-D-Induktion aktiviert wurden, werden weniger inaktivierende Hitzeschockproteine benötigt, was die verminderte Expression erklärt.

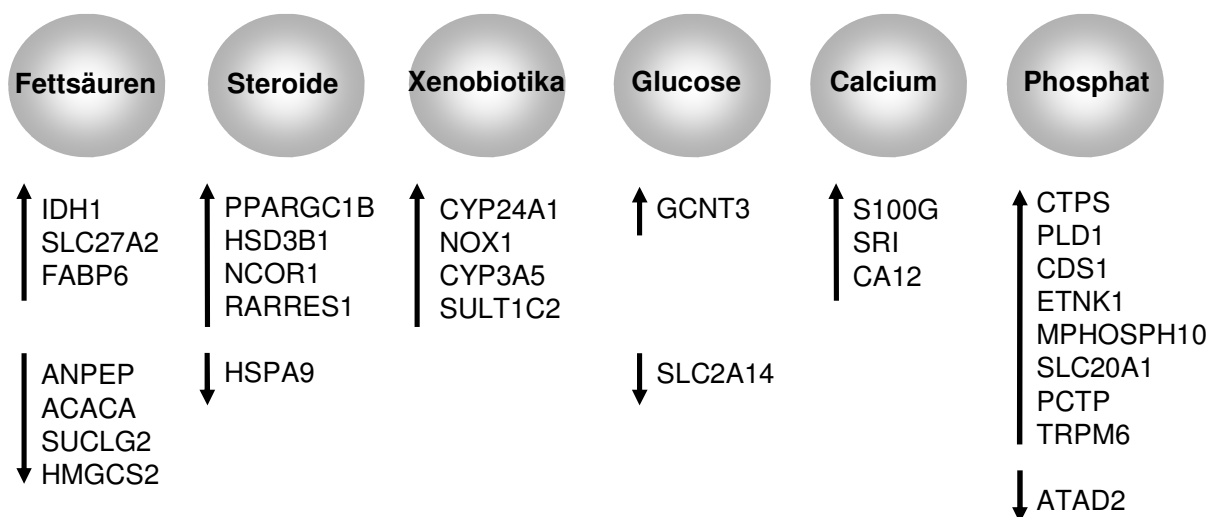
NCOR1 (Nukleärer Rezeptor-Corepressor 1) vermittelt die Ligand-abhängige Repression der Transkription von Thyroid- und Retinsäure-Rezeptoren und zeigt eine erhöhte Expression nach Vitamin-D-Behandlung.

HSD3B1 (Hydroxy-delta-5-steroid-dehydrogenase, Gastrotropin) ist durch das vermehrte Vorhandensein von Cholesterol-Derivaten in Form von Vitamin D und den dadurch verstärkten Abbau deutlich aktiviert.

Der Estrogen-Rezeptor-Coaktivator PPARGC1B (Peroxisomen-Proliferator-Aktivator-Rezeptor Gamma, Coaktivator 1 Beta), auch PGC-1beta genannt, ist am oxidativen Metabolismus in zahlreichen Geweben z.B. der Fettsäuren beteiligt. Die Untersuchungen von Staiger et al. (2005) konnten daher bestätigt werden – durch den erhöhten Fettsäure-Haushalt kommt es zu einer erhöhten Expression von PPARGC1B.

#### 4.3.7 Modell der Genregulation durch Vitamin D

Zur Interpretation der regulierten Gene im Kontext der Vitamin-D-Behandlung lässt sich das in Abb. 43 dargestellte Regulationsmodell entwickeln.



**Abb. 43** Ausgewählte Effekte von Vitamin D durch seinen Rezeptor und seine Co-Regulatoren auf die Genexpression (↑ Induktion, ↓ Repression).

Die regulierten Gene lassen sich in 6 Gruppen einteilen, die der Fettsäuresynthese mit Induktion von IDH1, SLC27A2 und FABP6 und Repression von ANPEP, ACACA, SUCLG2 und HMGCS2, dem Steroid-Stoffwechsel mit Induktion von PPARGC1B, HSD3B1, NCOR1 und RARRES1 und Repression von HSPA9, dem Fremdstoffmetabolismus mit Induktion von CYP24A1, NOX1, CYP3A5 und SULT1C2, dem Glucosetransport mit Induktion von GCNT3 und Repression von SLC2A14, der Calciumhomöostase mit Induktion von S100G,

---

SRI und CA12 und dem Phosphathaushalt mit Induktion von CTPS, PLD1, CDS1, ETNK1, MPHOSPH10, SLC20A1, PCTP und TRPM6 und Repression von ATAD2 zugeordnet werden können.

#### 4.4 Ausblick und Perspektiven

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine bedeutende Assoziation beim Untersuchen von Vitamin-D-Rezeptor-Polymorphismen im Zusammenhang mit dem Vorkommen von kolorektalen Karzinomen bei Kaukasiern gefunden. Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Vitamin-D-Rezeptor-Haplotypen BsmI(G)#TaqI(C) und BsmI(A)#TaqI(T) einen protektiven Effekt gegenüber kolorektalen Karzinomen haben. Diese ermittelten Schutzfaktoren lassen auf eine tatsächliche Bedeutung des Vitamin-D-Rezeptor-Gens für das Darmkrebsrisiko schließen.

Sowohl bei familiär vererbten als auch bei spontan auftretenden kolorektalen Karzinomen spielen Genmutationen eine wesentliche Rolle, wobei an der Entstehung des nicht-erblichen Kolonkarzinoms zahlreiche Gene mit geringer Penetranz beteiligt sind. Für die erblichen Kolonkarzinome gibt es bereits genauere Vorstellungen, welche Gene man analysieren sollte (Davidson, 2007). Analog dazu lassen sich eventuell zukünftig die hier identifizierten Suszeptibilitätsfaktoren für das Kolonkarzinom zusammen mit einer Vielzahl als relevant erkannter genetischer Varianten zur Verbesserung der Prophylaxe (Screening, Entwicklung genetischer Tests) nutzen, um Menschen mit erhöhtem Risiko zu identifizieren.

Für nachfolgende Arbeiten erscheint es überaus sinnvoll, das Vitamin-D-Rezeptor-Gen vollständig in kaukasischen Fall-Kontroll-Kollektiven zu sequenzieren – mit Focus auf den 3'-nicht-translatierten Bereich, die Exons und Exon-Intron-Grenzen sowie den 5'-Promotorbereich – um die gefundenen protektiven Haplotypen und einen eventuell nahegelegenen gelinkten Locus zu bestimmen.

Das in dieser Arbeit entwickelte Regulationsmodell einer Vitamin-D-Behandlung liefert eine ausgezeichnete Grundlage, um den Abbau von Vitamin D weiter zu untersuchen. Einige der ermittelten regulierten Gene, allen voran SULT1C2, CYP24A1 und CYP3A5, besitzen das Potential den Vitamin-D-Haushalt zu beeinflussen. Relevante Polymorphismen dieser Gene sollten genauer untersucht werden, ob auch sie direkt mit dem Vorkommen von kolorektalen Karzinomen assoziiert und für den Vitamin-D-Metabolismus von Bedeutung sind.

## 5 Zusammenfassung

Die Assoziation von Vitamin-D-Rezeptor-Polymorphismen mit dem Vorkommen von kolorektalen Karzinomen wurde in einer kaukasischen Population untersucht. Die Häufigkeit der Vitamin-D-Rezeptor Polymorphismen 23005G>A (CDX-2), 27823C>T (FokI), 60890G>A (BsmI), 61050G>A (Tru9I), 61888G>T (ApaI) und 61968T>C (TaqI) wurde für 256 Darmkrebspatienten und 256 Patienten ohne maligne Erkrankungen (Fall-Kontroll-Studie) mittels PCR/RFLP-Genotypisierung bestimmt. Haplotypenanalyse wurde auf der Grundlage von 6 genetischen Loci auf die erhaltenen Genotypen angewendet. Das paarweise Kopplungsungleichgewicht zwischen BsmI, ApaI, TaqI und Tru9I konnte bestätigt werden ( $p < 0,001$ ). Die Allelfrequenzen zwischen den Gruppen unterschieden sich nicht. Dennoch waren die Haplotypen BsmI(G)#TaqI(C) und BsmI(A)#TaqI(T) invers assoziiert mit dem Vorkommen von kolorektalem Karzinom ( $p < 0,001$ ), die Chance ist 15 mal (OR 0,067; 95% CI, 0,016-0,284) beziehungsweise 5,3 mal kleiner (OR 0,188; 95% CI, 0,077-0,461), verglichen mit Nicht-Trägern. Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Vitamin-D-Rezeptor-Haplotypen BsmI(G)#TaqI(C) und BsmI(A)#TaqI(T) einen protektiven Effekt gegenüber kolorektalen Karzinomen haben.

Ein weiteres Ziel dieser Studie war, Varianten des Vitamin-D-Rezeptor Mikrosatelliten poly(A) auf ihre Assoziation zum Vorkommen von kolorektalem Karzinom zu untersuchen. Der poly(A) Polymorphismus wurde mit einer Kombination aus GeneScan®- und Sequenzierungs-Analyse bestimmt. Eine deutliche Trennung zwischen langen und kurzen Allelen (bimodale Verteilung) war vorhanden. Es wurden 19, 20, 21 und 22 A-Wiederholungen für die lange Variante und 14 und 15 A-Wiederholungen für die kurze Variante gefunden. Weder die Häufigkeiten der langen und kurzen Allele noch die der Einzelvarianten unterschied sich zwischen Fällen und Kontrollen. Der poly(A) Mikrosatellit befindet sich in starkem Kopplungsungleichgewicht mit den nahegelegenen Loci BsmI, Tru9I, ApaI und TaqI, aber nicht mit den weiter entfernten Loci CDX-2 und FokI. Das Genotyp-Paar poly(A)-TaqI und der komplexe Genotyp poly(A)-TaqI-BsmI waren zwischen Darmkrebspatienten und Kontrollen unterschiedlich verteilt. Die Haplotypenanalyse aller poly(A)-TaqI-BsmI-Kombinationen ergab eine Unterrepräsentation von Darmkrebspatienten in der Gruppe der Individuen mit nicht-kopplungs-konformen Allelen.

An der Bildung von Vitamin D ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , Calcitriol) sind die Hydroxylasen CYP24A1, CYP27A1 und CYP27B1 beteiligt. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Vitamin D,

Vitamin-D-Stoffwechsel und dem Vitamin-D-Rezeptor und dem Vorkommen und der Entstehung von kolorektalen Karzinomen. Ausgewählte Polymorphismen der Gene CYP24A1, CYP27A1 und CYP27B1 wurden mittels SNPlex<sup>TM</sup>-Technologie und Sequenzierung an 928 gesunden Kontrollen und Patienten mit kolorektalem Karzinom einer kaukasischen Population aus Deutschland bestimmt. Die Häufigkeiten der Genpolymorphismen des Minor-Allels entsprechen bisherigen Studien an kaukasischen Populationen. Die Allelfrequenzen ergaben keine charakteristischen Unterschiede bezogen auf die Fall-Kontroll-Klassifikation. Keine Variante zeigte signifikante Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Haplotypenanalyse und Assoziationstests zwischen komplexen Genotypen und Variantenpaaren ergaben keine signifikanten Unterschiede mit dem Auftreten von kolorektalen Karzinomen. Es besteht ein starkes paarweises Kopplungsungleichgewicht zwischen den Varianten des CYP27B1 Gens ( $p < 0,001$ ).

Der Einfluss von Natriumbutyrat, all-trans-Retinsäure und Vitamin D auf die Expression verschiedener Zielgene wurde in zwei Darmkrebszelllinien untersucht. Die humanen Darmkrebszelllinien Caco-2 und SW480 wurden mit Natriumbutyrat, all-trans-Retinsäure und Vitamin D und unterschiedlichen Inkubationszeiten induziert. Nach Isolierung der RNA wurden Real-Time-PCRs für die Gene des Vitamin-D-Rezeptors und E-Cadherin durchgeführt. Der Vitamin-D-Rezeptor und E-Cadherin waren deutlich erhöht nach 6 h, 12 h und 24 h. Vitamin D als physiologischer Induktor zeigte den stärksten Effekt im Caco-2 Zellkultur-Modell.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse und zur Klärung der Regulation weiterer Kandidatengene wurde eine GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Mikroarray-Analyse durchgeführt. Erhöhte oder verminderte Expressionen ( $p < 0,01$ , Fold-Change-Wert  $> 1,5$  bzw.  $< 0,67$ ) wurden für mehrere Gene des Fremdstoffmetabolismus z.B. SULT1C2, CYP3A5, CYP24A1, der Calciumhomöostase, des Phosphathaushaltes, des Glucosetransportes und für den Fettsäure- und Steroid-Stoffwechsel z.B. HSPA9, PPARGC1B gefunden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Varianten von Vitamin-D-regulierten Genen mit der Inzidenz von kolorektalem Karzinom assoziiert werden konnten und nach Vitamin-D-Behandlung die Expression mittels Zellkulturmodell, RT-PCR und Mikroarray-Analyse unterschiedliche Zielgene des Vitamin-D-Metabolismus reguliert wurden.

## Abstract

The association of vitamin D receptor polymorphisms and colorectal cancer incidence has been investigated in a Caucasian population. The frequencies of the vitamin D receptor gene polymorphisms 23005G>A (CDX-2), 27823C>T (FokI), 60890G>A (BsmI), 61050G>A (Tru9I), 61888G>T (ApaI) and 61968T>C (TaqI) were determined in a series of 256 colorectal cancer patients and 256 patients without malignant disease (case-control study) using polymerase chain reaction- and restriction fragment length polymorphism genotyping assays (PCR/RFLP). Haplotype analysis based on the 6 genetic loci was applied to the received genotypes. The pairwise linkage disequilibrium between BsmI, ApaI, TaqI and Tru9I was confirmed ( $p < 0,001$ ). Allele frequencies did not differ between the groups. However, the haplotypes BsmI(G)#TaqI(C) and BsmI(A)#TaqI(T) were inversely associated with colorectal cancer incidence ( $p < 0,001$ ), the odds being 15,0 times smaller (odds ratio, 0,067; 95% confidence interval, 0,016-0,284) and 5,3 times smaller (odds ratio, 0,188; 95% confidence interval, 0,077-0,461), respectively, compared to non-carriers. Our findings suggest that the vitamin D receptor haplotypes BsmI(G)#TaqI(C) and BsmI(A)#TaqI(T) have a protective effect against colorectal cancer in Caucasians.

This study was aimed to investigate whether variants of the vitamin D receptor poly(A) microsatellite are associated with colorectal cancer incidence. The poly(A) polymorphism was analyzed by a combination of GeneScan® and sequencing. There was a distinct separation between long and short alleles. We found 19, 20, 21 and 22 A-repeats for the long variant and 14 and 15 A-repeats for the short variant. Frequencies of long and short alleles did not differ between cases and controls, nor did frequencies of any single variant. The poly(A) microsatellite was in strong linkage disequilibrium with the nearby loci BsmI, Tru9I, ApaI and TaqI, but not with the more distant loci CDX-2 and FokI. The genotype pair poly(A)-TaqI and the complex genotype poly(A)-TaqI-BsmI were differently distributed between colorectal cancer patients and controls. Haplotype analysis of all poly(A)-TaqI-BsmI combinations revealed an underrepresentation of colorectal cancer patients among individuals with non linkage-conform alleles.

The production of vitamin D ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , calcitriol) is affected by hydroxylases CYP24A1, CYP27A1 and CYP27B1. There is a coherence between Vitamin D, Vitamin D pathway and Vitamin D receptor and incidence and origin of colorectal cancer. Selected polymorphisms of CYP24A1, CYP27A1 and CYP27B1 gene were determined in a series of

928 caucasian subjects (healthy controls and colorectal cancer patients) from Germany using SNPlex™ technology and sequencing. SNP frequencies of the VDR gene polymorphisms for the minor alleles correspond to previous studies in Caucasian populations. Allele frequencies were without any characteristic variations regarding to the case-control-classification. No variant showed any significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium. Haplotype analysis and association tests between complex genotypes and pairs of variants revealed no significant association with the incidence of colorectal cancer. We found a strong pairwise linkage disequilibrium between the CYP27B1 variants ( $p < 0,001$ ).

The influence of sodium butyrate, all-trans retinoic acid and vitamin D on the expression of certain target genes in two colorectal cancer cell lines has been investigated. The human colorectal cancer cell lines Caco-2 and SW480 were induced with sodium butyrate, all-trans retinoic acid and vitamin D for different incubation times. After isolation of RNA, Real Time RT-PCRs was performed on vitamin D receptor and E-cadherin. Vitamin D receptor and E-cadherin were markedly increased after 6 h, 12 h and 24 h. Vitamin D as physiological inductor showed the strongest effects in the Caco-2 cell line model.

A GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 microarray analysis was conducted to verify these results and to clarify the regulation of further candidate genes. Upregulated or downregulated expression ( $p < 0,01$ , fold-change-value  $> 1,5$  respectively  $< 0,67$ ) was found for several genes of the xenobiotic metabolism e.g. SULT1C2, CYP3A5, CYP24A1, for calcium homeostasis, phosphate balance, glucose transport and for fatty acid and steroid metabolism e.g. HSPA9, PPARGC1B.

In summary, within this study various variants of vitamin D-regulated genes have been associated with incidence of colorectal cancer and after vitamin D-treatment the expression for different target genes of the vitamin D-metabolism were found regulated by cell line models with RT-PCR and microarray analysis.

## 6 Literaturverzeichnis

Agarwal AK, Giacchetti G, Lavery G, Nikkila H, Palermo M, Ricketts M, McTernan C, Bianchi G, Manunta P, Strazzullo P, Mantero F, White PC, Stewart PM. CA-Repeat polymorphism in intron 1 of HSD11B2: effects on gene expression and salt sensitivity. *Hypertension* 2000; 36: 187-194.

Akhter J, Chen X, Bowrey P, Bolton EJ, Morris DL. Vitamin D3 analog, EB1089, inhibits growth of subcutaneous xenographs of the human colon cancer cell line, LoVo, in nude mouse model. *Dis Colon Rec* 1997; 40: 317–321.

Albrechtsson E, Jonsson T, Moller S, Hoglund M, Ohlsson B, Axelson J. Vitamin D receptor is expressed in pancreatic cancer cells and a vitamin D3 analogue decreases cell number. *Pancreatology* 2003; 3: 41-46.

American Cancer Society. *Global Cancer Facts and Figures 2001, 2007*. Atlanta, GA, USA.

Amor-Gu ret M. Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis. *Cancer Lett* 2006; 236: 1-12.

Arbeitsgruppe zur Koordination Klinischer Krebsregister (AKKK), Zentrale Auswertung der onkologischen Daten aus klinischen Krebsregistern in Deutschland, 1996, Justus-Liebig-Universität Gie en, Fachbereich Humanmedizin, Institut für Medizinische Informatik

Bailey R, Cooper JD, Zeitels L, Smyth DJ, Yang JH, Walker NM, Hyppönen E, Dunger DB, Ramos-Lopez E, Badenhoop K, Nejentsev S, Todd JA. Association of the vitamin D metabolism gene CYP27B1 with type 1 diabetes. *Diabetes* 2007; 56: 2616-2621.

Baltes S, Nau H, Lampen A. All-trans retinoic acid enhances differentiation and influences permeability of intestinal Caco-2 cells under serum-free conditions. *Dev Growth Differ* 2004; 46: 503-514.

Ban Y, Taniyama M. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with Graves' disease in the Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4639-4643.

Behne M. Bexaroten, Retinoide und nukleäre Hormon-Rezeptoren. *Apothekenmagazin* 2003; 9: 8-10.

Benecke M. HER-2 Expression bei kolorektalen Tumoren: Korrelation der Expression des membrangebundenen HER-2 mit der Serumkonzentration des löslichen Antigens und patienten- bzw. tumorspezifischen Parametern. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin. 2005, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1198: 11–26.



- Carling T, Rastad J, Akerstrom G, Westin G. Vitamin D receptor (VDR) and parathyroid hormone messenger ribonucleic acid levels correspond to polymorphic VDR alleles in human parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2255-2259.
- Chatterjee B, Echchgadda I, Song CS. Vitamin D receptor regulation of the steroid/bile acid sulfotransferase *SULT2A1*. *Methods Enzymol* 2005; 400: 165-191.
- Chen KS, DeLuca HF. Cloning of the human 1-alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1263: 1-9.
- Christakos S, Raval-Pandya M, Wernyj RP, Yang W. Genomic mechanisms involved in the pleiotropic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochem J* 1996; 316: 361-371.
- Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 73-76.
- Correa P, Akerstrom G, Westin G. Exclusive underexpression of vitamin D receptor exon 1f transcripts in tumors of primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 671-675.
- Correa-Cerro L, Berthon P, Häussler J, Bochum S, Drelon E, Mangin P, Fournier G, Paiss T, Cussenot O, Vogel W. Vitamin D receptor polymorphisms as markers in prostate cancer. *Hum Genet* 1999; 105: 281-287.
- Cross HS, Kállay E, Lechner D, Gerdenitsch W, Adlercreutz H, Armbrecht HJ. Phytoestrogens and vitamin D metabolism: a new concept for the prevention and therapy of colorectal, prostate, and mammary carcinomas. *J Nutr* 2004; 134: 1207-1212.
- Daniel C, Schröder O, Zahn N, Gaschott T, Stein J. p38 MAPK signaling pathway is involved in butyrate-induced vitamin D receptor expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 1220-1226.
- Darwish HM, DeLuca HF. Analysis of binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor to positive and negative vitamin D response elements. *Arch Biochem Biophys* 1996; 334: 223-234.
- Davidson NO. Genetic testing in colorectal cancer: who, when, how and why. *Keio J Med* 2007; 56: 14-20.
- Davis CD. Vitamin D and cancer: current dilemmas and future research needs. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 565-569.
- De Luca HF, Schnoes HK. Vitamin D: recent advances. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 411-439.
- De Luca LM. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J* 1991; 5: 2924-2933.

Dombrowski L, Dong A, Bochkarev A, Plotnikov AN. Crystal structures of human sulfotransferases SULT1B1 and SULT1C1 complexed with the cofactor product adenosine-3'-5'-diphosphate (PAP). *Proteins* 2006; 64: 1091-1094.

Douroudis K, Tarassi K, Ioannidis G, Giannakopoulos F, Moutsatsou P, Thalassinos N, Papasteriades C. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women of Hellenic origin. *Maturitas* 2003 ; 45: 191-197.

Drocourt L, Ourlin JC, Pascussi JM, Maurel P, Vilarem MJ. Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes. *J Biol Chem* 2002; 277: 25125-25132.

Durrin LK, Haile RW, Ingles SA, Coetzee GA. Vitamin D receptor 3'-untranslated region polymorphisms: lack of effect on mRNA stability. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1453: 311-320.

Dydensborg AB, Herring E, Auclair J, Tremblay E, Beaulieu JF. Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: 1067-1074.

Engman HA, Lennernäs H, Taipalensuu J, Otter C, Leidvik B, Artursson P. CYP3A4, CYP3A5, and MDR1 in human small and large intestinal cell lines suitable for drug transport studies. *J Pharm Sci* 2001; 90: 1736-1751.

Evans SR, Nolla J, Hanfelt J, Shabahang M, Nauta RJ, Shchepotin IB. Vitamin D receptor expression as a predictive marker of biological behavior in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1591-1595.

Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* 2005; 29: 21-30.

Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A, Jhamai M, Zhao H, Rivadeneira F, Hofman A, van Leeuwen JP, Jehan F, Pols HA, Uitterlinden AG. Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the rotterdam study. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 807-823.

Fang Y, van Meurs JB, Rivadeneira F, van Schoor NM, van Leeuwen JP, Lips P, Pols HA, Uitterlinden AG. Vitamin D receptor gene haplotype is associated with body height and bone size. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1491-1501.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.

Fernandez-Garcia NI, Palmer HG, Garcia M, Gonzalez-Martin A, del Rio M, Baretino D, Volpert O, Muñoz A, Jimenez B. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of Id1 and Id2 genes and the angiogenic phenotype of human colon carcinoma cells. *Oncogene* 2005; 24: 6533-6544.

Flügge J, Krusekopf S, Goldammer M, Osswald E, Terhalle W, Malzahn U, Roots I. Vitamin D receptor haplotypes protect against development of colorectal cancer. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63: 997-1005.

Flügge J, Laschinski G, Roots I, Krusekopf S. The vitamin D receptor poly(A) microsatellite and colorectal cancer risk in Caucasians. *Int J Colorectal Dis* 2008; accepted, DOI: 10.1007/s00384-008-0617-7.

Fraga C, Blanco M, Vigo E, Segura C, Garcia-Caballero T, Perez-Fernandez R. Ontogenesis of the vitamin D receptor in rat heart. *Histochem Cell Biol* 2002; 117: 547-550.

Friedrich M, Rafi L, Tilgen W, Schmidt W, Reichrath J. Expression of 1,25-dihydroxy vitamin D3 receptor in breast carcinoma. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 1335-1337.

Garland CF, Garland FC, Gorham ED. Calcium and vitamin D. Their potential roles in colon and breast cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 889: 107-119.

Garland CF, Garland FC, Gorham ED. Can colon cancer incidence and death rates be reduced with calcium and vitamin D? *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 193-201.

Garland CF, Garland FC, Shaw EK, Comstock GW, Helsing KJ, Gorham ED. Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: eight-year prospective study. *Lancet* 1989; 2: 1176-1178.

Garland CF, Garland FC. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol* 1980; 9: 227-231.

Gesellschaften der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Statistisches Bundesamt Wiesbaden, Robert Koch Institut Berlin. Gesundheitsberichterstattung: Krebs in Deutschland – 2003-2004 – Häufigkeiten und Trends. 2008; 6. überarbeitete Auflage.

Giuliano AR, Franceschi RT, Wood RJ. Characterization of the vitamin D receptor from the Caco-2 human colon carcinoma cell line: effect of cellular differentiation. *Arch Biochem Biophys* 1991; 285: 261-269.

Grau MV, Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Beach ML, Church TR, Heber D. Vitamin D, calcium supplementation, and colorectal adenomas: results of a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1765-1771.

Grundberg E, Brandstrom H, Ribom EL, Ljunggren O, Kindmark A, Mallmin H. A poly adenosine repeat in the human vitamin D receptor gene is associated with bone mineral density in young Swedish women. *Calcif Tissue Int* 2003; 73: 455-462.

Grundberg E, Brandstrom H, Ribom EL, Ljunggren O, Mallmin H, Kindmark A. Genetic variation in the human vitamin D receptor is associated with muscle strength, fat mass and body weight in Swedish women. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 323-328.

Grünhage F, Jungck M, Lamberti C, Berg C, Becker U, Schulte-Witte H, Plassmann D, Rahner N, Aretz S, Friedrichs N, Buettner R, Sauerbruch T, Lammert F. Association of familial colorectal cancer with variants in the E-cadherin (CDH1) and cyclin D1 (CCND1) genes. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23:147-154.

Gudas LJ, Sporn MB, Roberts AB. Cellular Biology and Biochemistry of Retinoids. In: *The Retinoids: Biology, Biochemistry and Medicine*. New York Raven Press 1994; 443-520.

Gudas LJ. Retinoids, retinoid-responsive genes, cell differentiation, and cancer. *Cell Growth Differ* 1992; 3: 655-662.

Gulliford T, English J, Colston KW, Menday P, Moller S, Coombes RC. A phase I study of the vitamin D analogue EB1089 in patients with advanced breast and colorectal cancer. *British J Cancer* 1998; 78: 6–13.

Guy M, Lowe LC, Bretherton-Watt D, Mansi JL, Colston KW. Approaches to evaluating the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with breast cancer risk. *Recent Results Cancer Res* 2003; 164: 43-54.

Gyorffy B, Vasarhelyi B, Krikovszky D, Madacsy L, Tordai A, Tulassay T, Szabo A. Gender-specific association of vitamin D receptor polymorphism combinations with type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 803-808.

Halsall JA, Osborne JE, Pringle JH, Hutchinson PE. Vitamin D receptor gene polymorphisms, particularly the novel A-1012G promoter polymorphism, are associated with vitamin D3 responsiveness and non-familial susceptibility in psoriasis. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 349-355.

Haussler MR, Mangelsdorf DJ, Komm BS, Terpening CM, Yamaoka K, Allegretto EA, Baker AR, Shine J, McDonnell DP, Hughes M, et al. Molecular biology of the vitamin D hormone. *Recent Prog Horm Res* 1988; 44: 263-305.

Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1994; 54: 3288-3293.

Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function. *Cell Growth Differ* 1997; 8: 523-532.

Herz F, Halwer M. Synergistic induction of alkaline phosphatase in colonic carcinoma cells by sodium butyrate and hyperosmolality. *Biochim Biophys Acta* 1982; 718: 220-223.

Higashimoto Y, Ohata M, Nishio K, Iwamoto Y, Fujimoto H, Uetani K, Suruda T, Nakamura Y, Funasako M, Saijo N. 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and all-trans-retinoic acid inhibit the growth of a lung cancer cell line. *Anticancer Res* 1996; 16: 2653-2659.

Holick CN, Stanford JL, Kwon EM, Ostrander EA, Nejentsev S, Peters U. Comprehensive association analysis of the vitamin D pathway genes, VDR, CYP27B1, and CYP24A1, in prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1990-1999.

Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 362-371.

Huang SP, Chou YH, Wayne Chang WS, Wu MT, Chen YY, Yu CC, Wu TT, Lee YH, Huang JK, Wu WJ, Huang CH. Association between vitamin D receptor polymorphisms and prostate cancer risk in a Taiwanese population. *Cancer Lett* 2004; 207: 69-77.

Hubner RA, Muir KR, Liu JF, Logan RF, Grainge MJ, Houlston RS; Members of UKCAP Consortium. Dairy products, polymorphisms in the vitamin D receptor gene and colorectal adenoma recurrence. *Int J Cancer* 2008; 123: 586-593.

Ingelman-Sundberg M, Rodriguez-Antona C. Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005; 360: 1563-1570.

Ingles SA, Garcia DG, Wang W, Nieters A, Henderson BE, Kolonel LN, Haile RW, Coetzee GA. Vitamin D receptor genotype and breast cancer in Latinas (United States). *Cancer Causes Control* 2000; 11: 25-30.

Ingles SA, Ross RK, Yu MC, Irvine RA, La Pera G, Haile RW, Coetzee GA. Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 166-170.

Ingles SA, Wang J, Coetzee GA, Lee ER, Frankl HD, Haile RW. Vitamin D receptor polymorphisms and risk of colorectal adenomas (United States). *Cancer Causes Control* 2001; 12: 607-614.

International Agency for Research on Cancer. Globocan 2002. Descriptive Epidemiology Group, Frankreich.

Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R. Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in rat reproductive tissues. *Histochem Cell Biol* 1996; 105: 7-15.

Kadiyska T, Yakulov T, Kaneva R, Nedin D, Alexandrova A, Gegova A, Savov A, Mitev V, Kremensky I. Vitamin D and estrogen receptor gene polymorphisms and the risk of colorectal cancer in Bulgaria. *Int J Colorectal Dis* 2006; 22: 395-400.

Kane KF, Langman MJS, Williams GR. Antiproliferative responses of two human colon cancer cell lines to vitamin D<sub>3</sub> are differentially modified by 9-cis-retinoic acid. *Cancer Res* 1996; 56: 623-632.

Kane KF, Langman MJS, Williams GR. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and retinoid X receptor expression in human colorectal neoplasms. *Gut* 1995; 36: 255-258.

Kim JG, Kwon JH, Kim SH, Choi YM, Moon SY, Lee JY. Association between vitamin D receptor gene haplotypes and bone mass in postmenopausal Korean women. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 1234-1240.

Kojima S, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Friedman SL, Moriwaki H. Acyclic retinoid in the chemoprevention of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2004; 24: 797-805.

Komar AA. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 1075-1080.

Kruglyak L. The road to genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 314-318.

Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet* 2001; 27: 234-236.

Kruh J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem* 1982; 42: 65-82.

Krusekopf S, Roots I. St. John's wort and its constituent hyperforin concordantly regulate expression of genes encoding enzymes involved in basic cellular pathways. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 817-829.

Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; 27: 383-391.

Labuda M, Fujiwara TM, Ross MV, Morgan K, Garcia-Heras J, Ledbetter DH, Hughes MR, Glorieux FH. Two hereditary defects related to vitamin D metabolism map to the same region of human chromosome 12q13-14. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 1447-1453.

Lamprecht SA, Lipkin M. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 601-614.

Langdahl BL, Gravholt CH, Brixen K, Eriksen EF. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 608-617.

Launonen V. Mutations in the human LKB1/STK11 gene. *Hum Mutat* 2005; 26: 291-297.

Lee GS, Choi KC, Park SM, An BS, Cho MC, Jeung EB. Expression of human Calbindin-D(9k) correlated with age, vitamin D receptor and blood calcium level in the gastrointestinal tissues. *Clin Biochem* 2003; 36: 255-261.

Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 1976; 36: 4562-4569.

- Li C, Li Y, Gao LB, Wang YY, Zhou B, Lv ML, Lu HM, Zhang L. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and the Risk of Colorectal Cancer in a Chinese Population. *Dig Dis Sci* 2008; Jul 11; Epub ahead of print.
- Liu PY, Zhang YY, Lu Y, Long JR, Shen H, Zhao LJ, Xu FH, Xiao P, Xiong DH, Liu YJ, Recker RR, Deng HW. A survey of haplotype variants at several disease candidate genes: the importance of rare variants for complex diseases. *J Med Genet* 2005; 42: 221-227.
- Lopez ER, Regulla K, Pani MA, Krause M, Usadel KH, Badenhoop K. CYP27B1 polymorphisms variants are associated with type 1 diabetes mellitus in Germans. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 90:155-157.
- Lopez ER, Zwermann O, Segni M, Meyer G, Reincke M, Seissler J, Herwig J, Usadel KH, Badenhoop K. A promoter polymorphism of the CYP27B1 gene is associated with Addison's disease, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease and type 1 diabetes mellitus in Germans. *Eur J Endocrinol* 2004; 151: 193-197.
- Mackay J, Jemal A, Lee NC, Parkin DM. *The Cancer Atlas*. American Cancer Society, Atlanta, 2006.
- Malecki MT, Klupa T, Wolkow P, Bochenski J, Wanic K, Sieradzki J. Association study of the vitamin D: 1alpha-hydroxylase (CYP1alpha) gene and type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diabetes Metab* 2003; 29: 119-124.
- Malecki, MT, Frey, J, Moczulski, D, Klupa, T, Kozek, E, Sieradzki, J. Vitamin D receptor gene polymorphisms and association with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003; 111: 505-509.
- Mangelsdorf DJ, Borgmeyer U, Heyman RA, Zhou JY, Ong ES, Oro AE, Kakizuka A, Evans RM. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes Dev* 1992; 6: 329-344.
- Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA & Evans RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 1990; 345: 224-229.
- Mangelsdorf DJ, Umesono K, Kliewer SA, Borgmeyer U, Ong ES, Evans RM. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 1991; 66: 555-561.
- McCullough ML, Stevens VL, Diver WR, Feigelson HS, Rodriguez C, Bostick RM, Thun MJ, Calle EE. Vitamin D pathway gene polymorphisms, diet, and risk of postmenopausal breast cancer: a nested case-control study. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R9.
- McDonald PN, Kraichely DM, Brown AJ. The vitamin D receptor. In *Nuclear Receptors and Genetic Disease*. Academic Press Inc., Orlando, 2001; FL. 197-243.

- Milde P, Hauser U, Simon T, Mall G, Ernst V, Haussler MR, Frosch P, Rauterberg EW. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors in normal and psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 230-239.
- Morin JP, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of  $\beta$ -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in  $\beta$ -catenin or APC. *Science* 1997; 275: 1787-1790.
- Mostafa G, Matthews BD, Norton HJ, Kercher KW, Sing RF, Heniford BT. Influence of demographics on colorectal cancer. *Am Surg* 2004; 70: 259-264.
- Murillo G, Mehta RG. Chemoprevention of chemically-induced mammary and colon carcinogenesis by 1 $\alpha$ -hydroxyvitamin D<sub>5</sub>. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 129-136.
- Nejentsev S, Godfrey L, Snook H, Rance H, Nutland S, Walker NM, Lam AC, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Undlien DE, Rønningen KS, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Newport MJ, Clayton DG, Todd JA. Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D receptor gene. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1633-1639.
- Newmark HL, Lipkin M. Calcium, vitamin D, and colon cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 2067-2070.
- Nieto G, Barber Y, Rubio MC, Rubio M, Fibla J. Association between AIDS disease progression rates and the Fok-I polymorphism of the VDR gene in a cohort of HIV-1 seropositive patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 90: 199-207.
- Ochs-Balcom HM, Cicek MS, Thompson CL, Tucker TC, Elston RC, J Plummer S, Casey G, Li L. Association of vitamin D receptor gene variants, adiposity and colon cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1788-1793.
- Oh JY, Barrett-Connor E. Association between vitamin D receptor polymorphism and type 2 diabetes or metabolic syndrome in community-dwelling older adults: the Rancho Bernardo Study. *Metabolism* 2002; 51: 356-359.
- Pacini S, Nicastro L, Aterini S, Stefani P, Ruggiero M. The determination of BB genotype of vitamin D receptors identifies patients at risk for osteoporosis. *Radiol Med* 1996; 92: 520-524.
- Pálmer HG, González-Sancho JM, Espada J, Berciano MT, Puig I, Baulida J, Quintanilla M, Cano A, de Herreros AG, Lafarga M, Muñoz A. Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol* 2001; 154: 369-387.
- Pálmer HG, Larriba MJ, García JM, Ordóñez-Morán P, Peña C, Peiró S, Puig I, Rodríguez R, de la Fuente R, Bernad A, Pollán M, Bonilla F, Gamallo C, de Herreros AG, Muñoz A. The



transcription factor SNAIL represses vitamin D receptor expression and responsiveness in human colon cancer. *Nat Med* 2004; 10: 917-919.

Pálmer HG, Sánchez-Carbayo M, Ordóñez-Morán P, Larriba MJ, Cordón-Cardó C, Muñoz A. Genetic signatures of differentiation induced by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in human colon cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 7799-7806.

Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH, Badenhoop K. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* 2000; 49: 504-507.

Pani MA, Regulla K, Segni M, Krause M, Hofmann S, Hufner M, Herwig J, Pasquino AM, Usadel KH, Badenhoop K. Vitamin D 1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP1 $\alpha$ ) polymorphism in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2002; 146: 777-781.

Park BS, Park JS, Lee DY, Youn JI, Kim IG. Vitamin D receptor polymorphism is associated with psoriasis. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 113-116.

Park K, Woo M, Nam J, Kim JC. Start codon polymorphisms in the vitamin D receptor and colorectal cancer risk. *Cancer Lett* 2006; 237: 199-206.

Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998; 392: 190-193.

Peters U, McGlynn KA, Chatterjee N, Gunter E, Garcia-Closas M, Rothman N, Sinha R. Vitamin D, calcium, and vitamin D receptor polymorphism in colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1267-1274.

Petkovich M, Brand NJ, Krust A & Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 1987; 330: 444-450.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: e45.

Piana C, Wirth M, Gerbes S, Viernstein H, Gabor F, Toegel S. Validation of reference genes for qPCR studies on Caco-2 cell differentiation. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 69: 1187-1192.

Reichel H, Norman AW. Systemic effects of vitamin D<sub>3</sub>. *Ann Rev Med* 1989; 40: 71-78.

Reichrath J, Kamradt J, Zhu XH, Kong XF, Tilgen W, Holick MF. Analysis of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors (VDR) in basal cell carcinomas. *Am J Pathol* 1999; 155: 583-589.

Reichrath J, Rafi L, Muller SM, Mink D, Reitnauer K, Tilgen W, Schmidt W, Friedrich M. Immunohistochemical analysis of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in cervical carcinoma. *Histochem J* 1998; 30: 561-567.

- Reynolds S, Rajagopal S, Chakrabarty S. Differentiation-inducing effect of retinoic acid, difluoromethylornithine, sodium butyrate and sodium suramin in human colon cancer cells. *Cancer Lett* 1998; 134: 53-60.
- Roff A, Wilson RT. A novel SNP in a vitamin D response element of the CYP24A1 promoter reduces protein binding, transactivation, and gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; Sep 6; Epub ahead of print.
- Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 1986; 68: 1035-1040.
- Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev* 2007; 21: 2525-2538.
- Saito S, Iida A, Sekine A, Ogawa C, Kawauchi S, Higuchi S, Ohno M, Nakamura Y. 906 variations among 27 genes encoding cytochrome P450 (CYP) enzymes and aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in the Japanese population. *J Hum Genet* 2002; 47: 419-444.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Schmiedlin-Ren P, Thummel KE, Fisher JM, Paine MF, Lown KS, Watkins PB. Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Mol Pharmacol* 1997; 51: 741-754.
- Schröder C, Eckert K, Maurer HR. Tributyrin induces growth inhibitory and differentiating effects on HT-29 colon cancer cells in vitro. *Int J Oncol* 1998; 13: 1335-1340.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006; 7: 3.
- Siest G, Jeannesson E, Marteau JB, Samara A, Marie B, Pfister M, Visvikis-Siest S. Transcription factor and drug-metabolizing enzyme gene expression in lymphocytes from healthy human subjects. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 182-189.
- Sillanpaa P, Hirvonen A, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Uusitupa M, Vainio H, Mitrunen K. Vitamin D receptor gene polymorphism as an important modifier of positive family history related breast cancer risk. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 239-245.
- Skrabic V, Zemunik T, Situm M, Terzic J. Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in the Dalmatian population. *Diabetes Res Clin Pract* 2003; 59: 31-35.
- Slattery ML, Curtin K, Wolff R, Ma KN, Sweeney C, Murtaugh M, Potter JD, Levin TR, Samowitz W. PPAR $\gamma$  and colon and rectal cancer: associations with specific tumor mutations, aspirin, ibuprofen and insulin-related genes (United States). *Cancer Causes Control* 2006b; 17: 239-249.

Slattery ML, Murtaugh M, Caan B, Ma KN, Wolff R, Samowitz W. Associations between BMI, energy intake, energy expenditure, VDR genotype and colon and rectal cancers (United States). *Cancer Causes Control* 2004a; 15: 863-872.

Slattery ML, Neuhausen SL, Hoffman M, Caan B, Curtin K, Ma KN, Samowitz W. Dietary calcium, vitamin D, VDR genotypes and colorectal cancer. *Int J Cancer* 2004c; 111: 750-756.

Slattery ML, Samowitz W, Hoffman M, Ma KN, Levin TR, Neuhausen S. Aspirin, NSAIDs, and colorectal cancer: possible involvement in an insulin-related pathway. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004b; 13: 538-545.

Slattery ML, Sweeney C, Murtaugh M, Ma KN, Caan BJ, Potter JD, Wolff R. Associations between vitamin D, vitamin D receptor gene and the androgen receptor gene with colon and rectal cancer. *Int J Cancer* 2006a; 118: 3140-3146.

Slattery ML, Yakumo K, Hoffman M, Neuhausen S. Variants of the VDR gene and risk of colon cancer (United States). *Cancer Causes Control* 2001; 12: 359-364.

Song CS, Echchgadda I, Seo YK, Oh T, Kim S, Kim SA, Cho S, Shi L, Chatterjee B. An essential role of the CAAT/enhancer binding protein-alpha in the vitamin D-induced expression of the human steroid/bile acid-sulfotransferase (SULT2A1). *Mol Endocrinol* 2006; 20: 795-808.

Staiger H, Staiger K, Haas C, Weisser M, Machicao F, Häring HU. Fatty acid-induced differential regulation of the genes encoding peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha and -1beta in human skeletal muscle cells that have been differentiated in vitro. *Diabetologia* 2005; 48: 2115-2118.

Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 978-989.

Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 2000; 29: 332-337.

Sweeney C, Curtin K, Murtaugh MA, Caan BJ, Potter JD, Slattery ML. Haplotype analysis of common vitamin D receptor variants and colon and rectal cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 744-749.

Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 619-627.

Taylor JA, Hirvonen A, Watson M, Pittman G, Mohler JL, Bell DA. Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Res* 1996;56:4108-10.

Thakkinstian A, D'Este C, Attia J. Haplotype analysis of VDR gene polymorphisms: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2004; 15: 729-734.

The International SNP Map Working Group. *Nature* 2001; 409: 928-933.

- Theodoratou E, Farrington SM, Tenesa A, McNeill G, Cetnarskyj R, Barnetson RA, Porteous ME, Dunlop MG, Campbell H. Modification of the inverse association between dietary vitamin D intake and colorectal cancer risk by a FokI variant supports a chemoprotective action of Vitamin D intake mediated through VDR binding. *Int J Cancer* 2008; 123: 2170-2179.
- Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004; 338: 143-156.
- Uitterlinden AG, Weel AE, Burger H, Fang Y, van Duijn CM, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA. Interaction between the vitamin D receptor gene and collagen type I $\alpha$ 1 gene in susceptibility for fracture. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 379-385.
- Väisänen S, Dunlop TW, Sinkkonen L, Frank C, Carlberg C. Spatio-temporal activation of chromatin on the human CYP24 gene promoter in the presence of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *J Mol Biol* 2005; 350: 65-77.
- Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta* 2006; 371: 1-12.
- Van Weelden K, Flanagan L, Binderup L, Tenniswood M, Welsh J. Apoptotic regression of MCF-7 xenografts in nude mice treated with the vitamin D<sub>3</sub> analog, EB1089. *Endocrinology* 1998; 139: 2102-2110.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: 34.
- Vandewalle B, Adenis A, Hornez L, Revillion F, Lefebvre J. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors in normal and malignant human colorectal tissues. *Cancer Lett* 1994; 86: 67-73.
- Villena-Heinsen C, Meyberg R, Axt-Fliedner R, Reitnauer K, Reichrath J, Friedrich M. Immunohistochemical analysis of 1,25-dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-receptors, estrogen and progesterone receptors and Ki-67 in ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 2002; 22: 2261-2267.
- Wagner KD, Wagner N, Sukhatme VP, Scholz H. Activation of vitamin D receptor by the Wilms' tumor gene product mediates apoptosis of renal cells. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1188-1196.
- Wang K, Chen S, Xie W, Wan YJ. Retinoids induce cytochrome P450 3A4 through RXR/VDR-mediated pathway. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 2204-2213.
- Wang Q, Lee D, Sysounthone V, Chandraratna RAS, Christakos S, Korah R, Wieder R. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and retinoic acid analogues induce differentiation in breast cancer cells with function- and cell-specific additive effects. *Breast Cancer Res Treat* 2001; 67: 157-168.
- Weigel NL. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 1996; 319: 657-667.

- Weigel NL, Moore NL. Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2311-2319.
- Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, Zitzer H, Oza AK, Dang HT, Haussler CA, Galligan MA, Thatcher ML, Encinas Dominguez C, Haussler MR. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 177: 145-159.
- Wjst M, Altmüller J, Faus-Kessler T, Braig C, Bahnweg M, André E. Asthma families show transmission disequilibrium of gene variants in the vitamin D metabolism and signalling pathway. *Respir Res* 2006; 7: 60.
- Wong HL, Seow A, Arakawa K, Lee HP, Yu MC, Ingles SA. Vitamin D receptor start codon polymorphism and colorectal cancer risk: effect modification by dietary calcium and fat in Singapore Chinese. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1091-1095.
- Wood RJ, Tchack L, Angelo G, Pratt RE, Sonna LA. DNA microarray analysis of vitamin D-induced gene expression in a human colon carcinoma cell line. *Physiol Genomics* 2004; 17: 122-129.
- Xi Z, Feldman D. Regulation of vitamin D receptor abundance and responsiveness during differentiation of HT-29 colon cancer cells. *Endocrinology* 1993; 132: 1808–1814.
- Xu Y, Hashizume T, Shuhart MC, Davis CL, Nelson WL, Sakaki T, Kalhorn TF, Watkins PB, Schuetz EG, Thummel KE. Intestinal and hepatic CYP3A4 catalyze hydroxylation of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3): implications for drug-induced osteomalacia. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 56-65.
- Yang CX, Takezaki T, Hirose K, Inoue M, Huang XE, Tajima K. Fish consumption and colorectal cancer: a case-reference study in Japan. *Eur J Cancer Prev* 2003; 12: 109-115.
- Yaylim-Eraltan I, Arzu Ergen H, Arikan S, Okay E, Oztürk O, Bayrak S, Isbir T. Investigation of the VDR gene polymorphisms association with susceptibility to colorectal cancer. *Cell Biochem Funct* 2007; 25: 731-737.
- Yu VC, Delsert C, Andersen B, Holloway JM, Devary OV, Näär AM, Kim SY, Boutin JM, Glass CK, Rosenfeld MG. RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 1991; 67: 1251-1266.
- Zhang YY, Long JR, Liu PY, Liu YJ, Shen H, Zhao LJ, Deng HW. Estrogen receptor alpha and vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density: association study of healthy pre- and postmenopausal Chinese women. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 777-783.
- Zhao X, Feldman D. Regulation of vitamin D receptor abundance and responsiveness during differentiation of HT-29 human colon cancer cells. *Endocrinology* 1993; 132: 1808-1814.

## 7 Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten

Flügge J, Krusekopf S, Goldammer M, Osswald E, Terhalle W, Malzahn U, Roots I (2007) Vitamin D receptor haplotypes protect against development of colorectal cancer. *Eur J Clin Pharmacol* 63(11):997-1005

Knoll B, Goldammer M, Wojewoda A, Flügge J, Johne A, Mrozkiewicz PM, Roots I, Köpke K (2008) An Anomalous Haplotype Distribution of the Arrestin Domain-Containing 4 Gene (ARRDC4) Haplotypes in Caucasians. *Genet Test* 12(1):147-152

Flügge J, Laschinski G, Roots I, Krusekopf S (2008) The vitamin D receptor poly(A) microsatellite and colorectal cancer risk in Caucasians. *Int J Colorectal Dis*, zur Publikation angenommen, 10.1007/s00384-008-0617-7

### Poster

Flügge J, Krusekopf S, Goldammer M, Malzahn U, Roots I. Vitamin D receptor polymorphisms and colorectal cancer. Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft – Landesgruppe Berlin – Der wissenschaftliche Nachwuchs stellt sich vor, Juli 2006, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin, P35

Flügge J, Krusekopf S, Goldammer M, Malzahn U, Roots I. Association between vitamin D receptor polymorphisms and colorectal cancer. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Oktober 2006, Marburg, P027

Flügge J, Krusekopf S, Goldammer M, Klare S, Malzahn U, Roots I. Multi-Plex analysis of Vitamin D receptor- and related metabolism gene polymorphisms. 9. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, November 2007, Kiel (Abstract in “Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology”, Volume 101), G-3

Flügge J, Krusekopf S, Goldammer M, Klare S, Malzahn U, Roots I. Association between Polymorphisms of Vitamin D Metabolizing Enzymes and Colorectal Cancer Incidence. 2nd World Conference on Magic Bullets (Ehrlich II), Oktober 2008, Nürnberg, # 1542

Flügge J, Roots I, Krusekopf S. Regulation of vitamin D metabolism-related genes by vitamin D treatment in human colon cancer cells using microarray analysis. 10. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, November 2008, Berlin, P67

Flügge J, Roots I, Krusekopf S. Gene expression analysis of spontaneous differentiation in the human colon cancer cell line Caco-2. 10. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, November 2008, Berlin, P68

Krause R, Müller E, Felsenberg D, Hopfenmüller W, Neumayer HH, Stange R, Flügge J, Bolbrinker J, Roots I. Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphism BsmI Influences Blood Pressure. 10. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, November 2008, Berlin, P82

### **Vorträge/Abstracts**

Flügge J. Vitamin D receptor and colorectal cancer. Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft-Doktorandentagung, September 2006, Nürnberg-Heroldsberg, V1.18

Flügge J. Regulation of VDR and CDH1 in colorectal cancer cell lines by differentiating agents. 3rd Pharmaceutical Science World Congress 2007, Pre-Satellite Meeting, Target Discovery and Molecular Pharmacology, April 2007, Amsterdam, Niederlande, SA-TD-14

Flügge J., Goldammer M. Individuelle Risikofaktoren für Kolonkarzinom unter Berücksichtigung polymorpher Gene“, Finale Projektpräsentation, ProFIT, IBB (Förderkennzeichen 1013 3117), November 2007, Berlin, V1

Krause R, Müller E, Felsenberg D, Neumayer HH, Stange R, Flügge J, Bolbrinker J, Roots I. Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphism BsmI Influences Blood Pressure. IXth World Conference of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Juli 2008, Québec, Canada

## **Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen ist der Lebenslauf nicht abgebildet.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, November 2008

Jana Flügge