



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Proteins of the Family of “Organic Anion Transporters (OATP)” and their Potential Role in Liver and Ovarian Cancer Therapy “

Verfasserin

Susanna Zakaria

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 441

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Genetik- Mikrobiologie

Betreuerin / Betreuer:

Univ.- Prof. Mag. Dr. Erwin Heberle- Bors

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Univ.-Prof. Mag. Dr. Erwin Heberle-Bors (Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Genetik, Universität Wien) bedanken, da er mich, während der vergangenen Monate meiner Diplomarbeit betreut und umfangreich unterstützt hat.

Mein herzlicher Dank gilt auch Ao. Univ.-Prof. Dr. Theresia Thalhammer (Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung, Medizinische Universität Wien), die mir einen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht hat und stets als Ansprechpartnerin zur Verfügung stand. Sie hat durch die ausgezeichnete Betreuung und fachliche Unterstützung sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Besonderer Dank gilt ebenfalls Dr. Martin Svoboda für seine Hilfe bei der Real-Time PCR, die freundliche Unterstützung, seine Geduld und ständige Hilfsbereitschaft.

Großer Dank gilt auch Dr. V. Buxhofer-Ausch aus dem Donauespital Wien als Leiterin eines durch den Bürgermeisterfonds unterstützten Projektes P110016, die durch ihre Unterstützung auch zur Durchführung dieser Studie beigetragen hat.

Ich möchte auch alle meine anderen Kollegen für ihr konstantes Interesse an meiner Arbeit und Unterstützung danken. Besonderer Dank gilt meiner Kollegin Silvia Zaussinger für ihre Hilfsbereitschaft in allen Aspekten des Lebens und ihre treue Freundschaft.

Schließlich möchte ich meine tiefe Dankbarkeit an meine ganze Familie, für ihre kontinuierliche Unterstützung und Herzlichkeit aussprechen.

Kurzfassung

Primärer Leberkrebs ist eine der häufigsten malignen Erkrankungen in Regionen, wie Zentralasien oder Teilen von Afrika, während in Österreich Lebermetastasen anderer Tumore (z.B. Kolonkarzinom) häufig sind und auch oft zum Tod der Patienten führen. Bei Frauen ist das Ovarialkarzinom, das meist erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt wird, mit einer besonders schlechten Prognose, was das Überleben betrifft, behaftet. Es stellt mit jährlich rund 800 Neuerkrankungen in Österreich an 5. Stelle der Häufigkeit bösartiger gynäkologischer Tumore. Bei beiden Tumoren trägt das schlechte Ansprechen auf eine zytostatische Therapie zu der erhöhten Mortalität bei. Um die medikamentöse Therapie dieser Tumore zu verbessern, ist es wichtig, Mechanismen zu erforschen, die die Effizienz von zytostatisch wirksamen Arzneimitteln beeinflussen. Dazu gehören Transportproteine, durch die Arzneimittel in die Tumorzellen aufgenommen werden und die zur Erreichung einer kritischen Konzentration in den Tumorzellen wichtig sind. Dazu zählt die Familie der „*Organic Anion Transporting Polypeptides* (OATP)“. Sie können eine große Anzahl an endogenen und exogenen Substanzen mit zytostatischer Wirksamkeit in verschiedene Zellen des Körpers transportieren. In der Leber spielen OATPs eine wichtige Rolle in der Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung von Arzneistoffen. Im Ovar können diese Membrantransporter die Aufnahme von Hormone, Prostaglandinen, Stoffwechselprodukten und diverse Medikamenten in die Zelle bewirken. Elf humane OATPs, die in sechs Familien unterteilt werden, wurden bis heute identifiziert. Allerdings wurde die Verteilung und Expression in malignen und gesunden Geweben bis heute hauptsächlich für OATPs der Familie 1 bestimmt, während die Expression und Funktion der OATPs der Familien 3,4,5 und 6 noch weitgehend unerforscht ist. Daher war es das Ziel meiner Arbeit, die mRNA Expression aller elf OATPs in gesunden und malignen Leber- und Ovarialproben mittels Real Time PCR zu ermitteln.

In malignen Leberproben konnte gezeigt werden, dass es zu einer erhöhten mRNA Expression von OATP2A1, OATP3A1, OATP4A1 und OATP5A1 und einer reduzierten mRNA Expression der "Leber-spezifischen" OATPs (OATP1B1 und OATP1B3) sowie von OATP1A2, OATP2B1 und OATP4C1 kommt. In den Ovarialproben zeigte es sich, dass OATP3A1, OATP4A1 und OATP5A1 stark

exprimiert waren, während OATP6A1 weder in Proben von malignen noch von benignen Gewebe nachweisbar war.

Die Expression von OATP3A1 mRNA war aber in Ovarialkarzinomen epithelialen Ursprungs geringer als in benignen Tumoren und dies war vor allem bei der Gruppe der über 55-jährigen Patientinnen und bei Patientinnen mit FIGO Stage 2 und 3 ausgeprägt. Dies lässt den Schluss zu, dass dieses Transportprotein, das Hormone, Prostaglandine und zahlreicher Substanzen aus dem Stoffwechsel in die Zellen transportieren kann, für das Wachstum der Tumorzellen nicht mehr von Bedeutung ist. Durch die dadurch bedingte verminderte Aufnahme von zytostatisch wirksamen Verbindungen könnte die verminderte Expression dieses Transportes auch zur Arzneistoffresistenz beitragen.

Das in dieser Studie gezeigte differenzierte Expressionsmuster verschiedener OATPs im malignen Gewebe stellt auch eine Grundlage für weitere Untersuchungen zur Therapie und Diagnose dieser Tumore dar.

Abstract

Primary liver cancer is one of the most common malignant diseases in regions such as Central Asia and parts of Africa, while in Austria liver metastases of other tumors (eg colon cancer) are common and often lead to death. Similarly, ovarian cancer, which is usually discovered at an advanced stage, is associated with a poor prognosis in terms of survival. In both tumors, the poor response to a cytostatic therapy contributes to the increased mortality. The incidence of ovarian cancer is about 800 new cases per year in Austria. This makes ovarian cancer the fifth most cancer of all malignant gynecological tumors.

To improve the outcome of a given chemotherapy, analysis of the transporter expression capable of transporting anticancer drugs into cells thereby influencing cancer treatment could be important. In future this may lead to a better prognosis of these cancers. This includes investigations on transport proteins, which mediate drug uptake into tumor cells and are important to achieve a critical concentration in the cells. In this point of view, "**Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP)**" are important, because they mediate the uptake of endobiotics including hormones, prostaglandins, peptides, as well as anticancer drugs. For some members, it has been shown that their expression changes during cancer progression. In the liver, OATPs have an important role in the absorption, distribution, metabolism and excretion of drugs. In the ovary, these membrane transporters may also mediate the uptake of hormones, prostaglandins, metabolites, and various drugs in epithelial cells lining the ovarian surface. Until now, 11 human OATPs, which are divided into six families, have been described. To date, distribution and expression in malignant and non-malignant tissues was mainly assessed for OATPs of family 1, while the expression and function of other OATPs (families 3, 4, 5 and 6) are largely unexplored. Therefore, it was the aim of this thesis to determine mRNA expression of all eleven OATPs in samples from liver and ovary using normal and malignant tissues from tumors. Studies were done using real-time RT-PCR.

In malignant samples, these OATP shows a distinct expression pattern. In liver upregulation of OATP2A1, OATP3A1, and OATP4A1 OATP5A1 and downregulation of "liver-specific" OATPs, namely OATP1B1 and OATP1B3 as well as OATP1A2, OATP2B1 and OATP4C1 were observed. This might indicate that grow of liver

cancer cells is not dependent anymore on transport of specific compounds by liver-specific transporters.

In ovarian cancer, OATP3A1, OATP4A1 und OATP5A1 are the OATPs with the highest expression rate. Therefore, one of these OATPs, namely OATP3A1 was further studied and its expression was compared with that in benign tumors. It was down-regulated in malignant tumors, especially, in the group of >55-year-old patients and in patients with FIGO Stage 2 and 3 ($P=0.05$). Therefore, reduction of this transport protein in malignant tumors may explain reduced accumulation of anticancer drugs in ovarian cancer cells thereby contributing to drug resistance.

The distinct pattern of OATPs found in malignant liver and ovarian cancer shown in this study could provide the basis for further studies on the treatment and diagnosis of these tumors.

INHALTSVERZEICHNIS

1. PROBLEMSTELLUNG	1
2. EINLEITUNG.....	2
2.1. DIE MENSCHLICHE LEBER	4
2.1.1. Anatomie und Physiologie	4
2.1.2. Leberkrebs	5
2.1.2.1. Klassifizierung des Tumors	6
2.1.2.2. Ursachen und Risikofaktoren	7
2.1.2.3. Behandlungsmöglichkeiten.....	9
2.1.2.3.1. Kurative Therapie.....	9
2.1.2.3.2. Palliative Therapie.....	10
2.2. DER WEIBLICHE GENITALTRAKT-DAS OVAR.....	11
2.2.1. Anatomie und Physiologie	11
2.2.2. Das Ovarialkarzinom: Epidemiologie und Ätiologie	12
2.2.3. Einteilung der Tumore	13
2.2.3.1. Klassifizierung des Tumors	14
2.2.3.2. Diagnostik.....	15
2.2.3.3. Behandlungsmöglichkeiten.....	17
2.2.3.3.1. Operative Therapie	17
2.2.3.3.2. Chemotherapie.....	17
2.3. DIE TRANSPORTERFAMILIE OATP.....	19
2.3.1. Klassifizierung und Nomenklatur	19
2.3.2. Struktur.....	20
2.3.3. OATP Familienmitglieder und deren Funktionalität	21
2.3.4. Physiologische Bedeutung	25
2.3.5. Substrate	26
2.3.6. OATPs und Krebs.....	27
3. MATERIAL UND METHODEN.....	29
3.1.1. Maligne und nicht maligne Proben	29
3.1.2. Isolierung von RNA mittels PEQ Gold Trifast	30
3.1.3. Reverse Transkription mittels High Captivity cDNA Kit.....	33
3.1.4. TaqMan®Real- Time RT-PCR.....	36
3.2. EXPRESSION VON OATP 3A1 V1/V2 IN GESUNDEN UND MALIGNEN OVARIALGEWEBEN	40
3.2.1. Reverse Transkription mittels High Captivity cDNA Kit.....	41
3.2.2. TaqMan®Real- Time RT-PCR.....	42

3.3.	EXPRESSION VON SLCO 1B1 IN ZR 57-1 BRUSTKREBSZELLEN.....	43
3.3.1.	Zellkultivierung.....	44
3.3.2.	Auftauen der Zellen	45
3.3.3.	Einfrieren der Zellen	45
3.3.4.	Splitten der Zellen.....	45
3.3.5.	Expression von SLCO 1B1	46
3.3.6.	Auswertung	48
4.	ERGEBNISSE.....	50
4.1.	ANALYSE DES OATP EXPRESSIONSMUSTERS IN LEBERTUMOREN.....	50
4.1.1.	Analyse der OATP- Expression in Gruppen von primären und sekundären Lebertumoren	52
4.2.	EXPRESSION VON OATP 3A1V1/V2 MRNA IN BENIGNEN UND MALIGNEN OVARIALTUMOREN	54
4.3.	NACHWEIS VON OATP 3A1 MITTELS IMMUNFLUORESZENT MIKROSKOPIE UND IMMUNHISTOCHEMIE	62
4.3.1.	Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OATP 3A1 in Ovarialkarzinomen	63
5.	DISKUSSION.....	69
6.	ZUSAMMENFASSUNG	73
7.	SUMMARY.....	75
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	77
9.	TABELLENVERZEICHNIS.....	79
10.	LITERATURVERZEICHNIS	80
11.	CURRICULUM VITAE.....	90

1. PROBLEMSTELLUNG

Die Behandlung von Krebserkrankungen stellt bis heute ein großes Problem dar. Trotz modernster Operationstechniken und adjuvanten Einsatz von neuesten Zytostatika sind die meisten Karzinome in fortgeschrittenem Stadium noch immer nicht kurativ behandelbar. Ein Grund für das Therapieversagen stellt die sogenannte Vielfachresistenz oder „Multidrug Resistance“ (MDR) genannt, dar.

Dies bedeutet, dass viele Tumore zunächst gut auf die Chemotherapie ansprechen, aber nach mehreren Zyklen die Sensibilität gegenüber der zytostatisch wirksamen Therapie verlieren. Zellen sind dann nicht nur gegen das verwendete Zytostatikum resistent, sondern sprechen auch auf strukturell und funktionell andere Verbindungen nicht mehr an.

Ursache dafür ist in vielen Fällen eine Überexpression von Membranproteinen, die das Medikament zu schnell aus der Zelle exportieren. Dadurch wird die Konzentration des Zytostatikums in den Zellen zu gering und es kommt nicht zum angestrebten Zelltod. Die Karzinomzellen überleben und sind so im Stande eine Chemoresistenz zu entwickeln. Ob eine verminderte Expression von Membrantransportern, die für die Aufnahme der zytotoxischen Verbindungen verantwortlich sind ebenfalls zur MDR beiträgt, ist nicht bekannt. Zu den membranständigen Transportproteinen für die Aufnahme von Pharmaka verantwortlich sind, gehören Transporter aus der Gruppe der „*Organic Anion Transport Polypeptides*“ (OATP). Sie sind für die zelluläre Aufnahme von verschiedenen organischen Verbindungen und auch zytotoxischen Arzneistoffen verantwortlich.

Deshalb soll in dieser Arbeit die Expression der OATPs in der Leber und im Ovar untersucht werden. Dafür wurden 43 Proben von Patienten mit primären Lebertumoren und Tumormetastasen von extrahepatischen Tumoren mittels Real-Time RT-PCR untersucht. Ebenfalls wurde die OATP3A1 Expression bei 191 Ovarialkarzinomproben und 21 Proben von benignen Ovarialtumoren mittels Real-Time RT-PCR und Immunfluoreszenzstadien- und Immunhistochemiestadien untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse könnten dazu beitragen, eine verbesserte Anwendung der Chemotherapie zu ermöglichen. Dabei sollte die Vielfach-Resistenz der Tumore gegenüber Zytostatika überwunden werden.

2. Einleitung

Leberkrebs ist eine der Tumorerkrankungen, die eine besonders schlechte Prognose haben. Eine entscheidende Rolle bei der Entstehung dieser Erkrankung spielen vorangegangene Schädigungen der Leber. Oft folgt dem Leberzellenkarzinom eine Leberzirrhose. Dies kann aufgrund häufig auftretender Infektionen mit den Hepatitisviren B und C oder durch Leberschäden, die durch Toxine und Karzinogene (Aflatoxine) verursacht werden, auftreten. Bei fortgeschrittenem Krankheitszustand ist eine kurative Therapie (Entfernung des Tumors mit oder ohne Transplantation) nicht mehr möglich. Durchgesetzt hat sich die palliative Therapie, da diese eine verbesserte Lebensqualität ermöglicht. Chemotherapien mit verschiedenen Medikamenten, die in der Therapie anderer Tumore erfolgversprechend waren, haben sich bislang als wenig effektiv erwiesen. Oft ist die Resistenz durch eine ungenügende Akkumulation der Zytostatika in den Krebszellen zu erklären. Um den Therapieerfolg zu verbessern, ist es daher essentiell, den Aufnahmemechanismus von Medikamenten in die Leberzelle und ihre Exkretion in Blut und Galle zu erforschen [KIM 2003; MIKKAICHI et al. 2004].

Maligne Erkrankungen der Eierstöcke werden als Ovarialkarzinom bezeichnet. Es ist nach dem Muttermundkrebs die zweithäufigste gynäkologische Krebserkrankung und hat eine besonders schlechte Prognose, da es meist erst sehr spät diagnostiziert wird. Die Behandlung und Heilung von Krebs in einem fortgeschrittenen Stadium stellt trotz ständiger Fortschritte im Bereich der Diagnose und Therapie immer noch ein großes Problem dar. Beim Ovarialkarzinom kommt noch erschwerend hinzu, dass es ein schnelles Wachstum zeigt und rasch Metastasen bildet. Nach der Behandlung mit Zytostatika kommt es meist recht schnell zu der Entwicklung einer „Multidrug Resistance“ (MDR). Das heißt, dass die Tumoren zu Beginn gut auf die Chemotherapien ansprechen, doch mit der Zeit geht die Sensibilität gegenüber Zytostatika verloren [Svoboda 2010]. Eine der Ursachen dafür ist, dass während dieser Therapien, nur Zellen, die mehr Transporter exprimieren, welche die Zytostatika wieder aus der Zelle exportieren, während die Transporter für die Aufnahme vermindert exprimiert werden, überleben, da die für die zytostatische

Wirkung notwendige intrazelluläre Konzentration an dem Zytostatikum nicht erreicht werden. Die Proliferation dieser Tumorzellen kann das resistente Karzinom bilden.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Membrantransportproteinen identifiziert. Die „*Organic Anion Transporting Polypeptides*“ (OATPs) umfassen eine Gruppe von Natrium-unabhängigen Transportproteinen, die eine zelluläre Aufnahme vieler amphiphatischer, endogener und exogener Substanzen, einschließlich Arzneistoffe und Zytostatika, vermitteln [Hagenbuch und Gui 2008]. Sie spielen eine große Rolle bei der Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Arzneistoffen und können somit für den Transport von Zytostatika in die Tumorzellen von großer Bedeutung sein und sind in vielen Geweben und Organen exprimiert.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Expression aller 11 OATPs in malignem und gesundem Lebergewebe zu untersuchen. Dabei sollen auch Unterschiede in der Expression in verschiedenen Lebert- (hepatozelluläres und cholangiozelluläres Karzinom, Lebermetastasen) und Ovarialtumoren bestimmt werden. Die dabei gewonnenen Resultate sollen dazu beitragen, neue Erkenntnisse über die Aufnahme von Zytostatika zu gewinnen. Dies ist für den Therapieerfolg von großer Bedeutung. Die Studien zur Expression der OATP mRNA sollen mittels quantitativer RT-PCR an Proben von PatientInnen mit Leberkrebs und Ovarialkarzinompatientinnen durchgeführt werden.

2.1. Die menschliche Leber

2.1.1. Anatomie und Physiologie

Im Erwachsenenorganismus macht die Leber etwa 2,5 % des Körpergewichts aus [Arias et al. 1988]. Sie wiegt beim Mann durchschnittlich 1,4-1,8 kg, bei der Frau 1,2-1,4 kg [Denk et al. 1999] und ist somit das schwerste Organ und die größte exokrine Drüse des menschlichen Körpers [Dancygier et al. 2003].

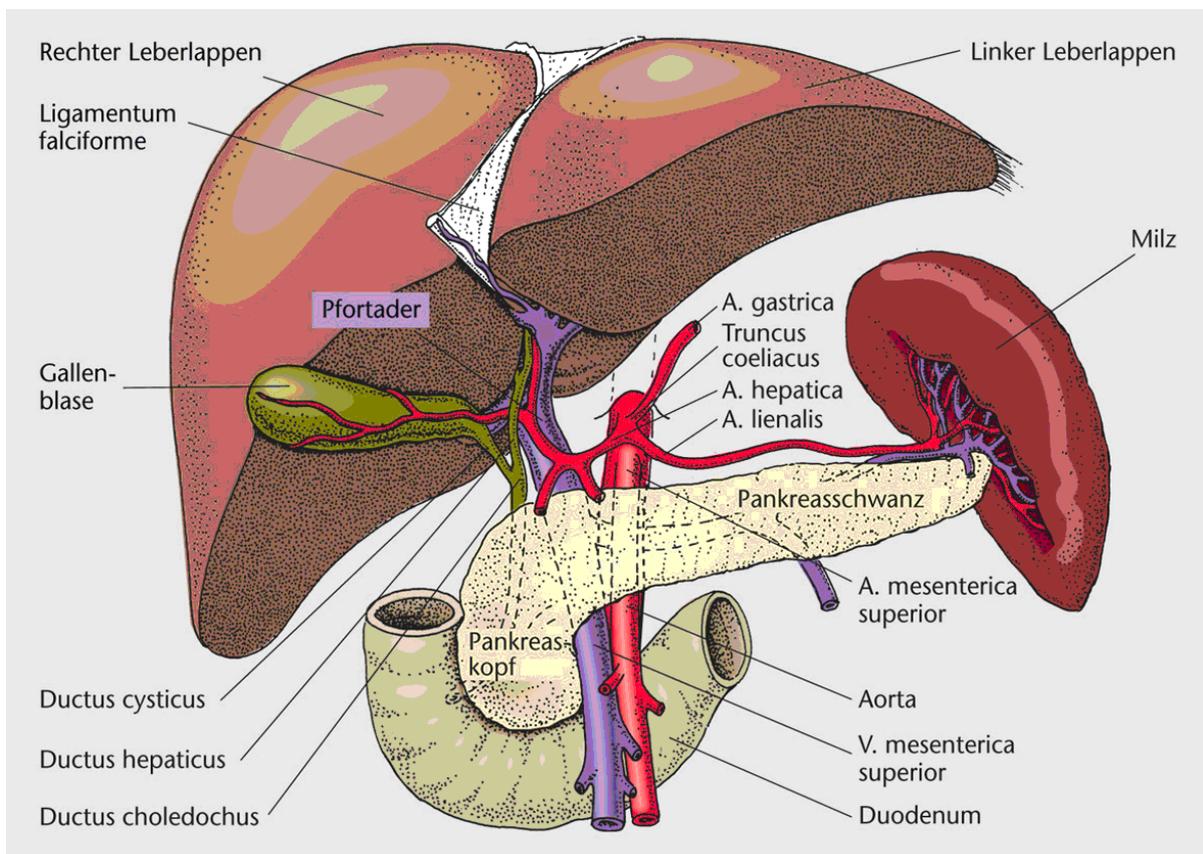


Abb. 1: Die menschliche Leber. nach Menche 2004: Biologie, Anatomie und Physiologie; Elsevier, Urban & Fischer; 5. Auflage p.302

Die Leber, ein weiches, gleichmäßig strukturiertes Organ, das sich größtenteils im rechten Oberbauch befindet, lässt sich in zwei große Leberlappen unterteilen. Der rechte Leberlappen (Lobus dexter) liegt unter dem Zwerchfell und ist mit diesem teilweise verwachsen. Er ist größer als der linke Leberlappen (Lobus sinister), der bis in den linken Oberbauch reicht. Außerdem gibt es zwei weitere, kleinere Leberlappen: den quadratischen Lappen (Lobus quadratus) und den „geschwänzten“ Lappen (Lobus caudatus) [Thews et al. 1999].

Weiters lassen sich die Leberlappen in 8 Segmente bzw. Subsegmente unterteilen [Denk et al. 1999]. Die Leber ist zwischen Pfortader und Leberarterie in den Blutkreislauf eingeschaltet. Während die Leberarterie sauerstoffreiches Blut zur Versorgung der Leberparenchymzellen (Hepatozyten) liefert, werden durch die Vena portae (Pfortader) alle Substanzen, die mit der Nahrung aufgenommen werden in den Blutkreislauf transportiert. Das heißt alle Nähr- und Giftstoffe, sowie Abbauprodukte aus dem Stoffwechsel anderer Organe und Hormone kommen über diesen Weg in die Leberzellen [Dancygier et al. 2003].

Als zentrales Stoffwechselorgan des Körpers erfüllt die Leber wichtige Aufgaben. So ist sie in die Steuerung des Glukose-, Fett- und Eiweißstoffwechsels eingebunden, spielt als Entgiftungszentrale eine wichtige Rolle bei dem Abbau von Schadstoffen, Alkohol, Medikamenten und körpereigenen Stoffen, bildet Ausgangsprodukte für Sexualhormone, reguliert den Vitamin- und Spurenelement-Stoffwechsel etc. Zudem besitzt die Leber eine ausgeprägte Fähigkeit zur Regeneration und kann als einziges Organ nach Verletzungen oder Operationen neues Gewebe nachbilden [Löffler und Petrides 2003].

2.1.2. Leberkrebs

Unter dem Begriff Leberkrebs werden alle bösartigen Neubildungen und Geschwulsterkrankungen der Leber zusammengefasst.

Mit über 90 Prozent ist das Leberzellkarzinom (hepatozelluläres Karzinom, HCC) die häufigste primäre (von den Leberparenchymzellen ausgehende) bösartige Neubildung der Leber, bei der es zur Entartung der Hepatozyten kommt [Ishak et al. 1994; Ishak et al. 1999]. Das hepatozelluläre Karzinom hat die Tendenz entlang der Blutgefäße zu wachsen und in diese einzudringen [Ishak et al. 1994]. Die häufigsten Sekundärkarzinome (nicht von dem Lebergewebe ausgehende bösartige Neubildungen) bilden Tochtergeschwülste (Metastasen) von anderen malignen Tumoren (z. B. Darm-, Brust-, Lungenkrebs). Selten ist eine andere Tumorart (10-20 % der Fälle), das intrahepatische cholangiozelluläre Karzinom, bei dem die Krebserkrankung von den Zellen der Gallengänge ausgeht [Ishak et al. 1994, Ishak et al. 1999].

Leberkrebs wird oft nur im Rahmen einer Routineuntersuchung gefunden, da er zu Beginn seines Wachstums nur selten Beschwerden verursacht. Diese treten zumeist erst im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit auf (Druckschmerz, Schwellung,

Appetitlosigkeit, Übelkeit, Schwäche, rasche Gewichtsabnahme, Ikterus mit Gelbfärbung von Haut und Augen etc.) [Dixon 2003].

2.1.2.1. Klassifizierung der Tumore

Eine genaue Bestimmung von Tumoren (Stadieneinteilung) ist für eine individuelle Therapieplanung essenziell. Die weltweit gebräuchlichste Methode ist die TNM-Klassifikation. Sie wurde von dem Franzosen Pierre Denoix in den Jahren 1943–1952 entwickelt und wird seit 1950 von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) weitergeführt [Denoix 1946]. Weiterentwickelt wurde die TNM Klassifikation zunächst vom American Joint Committee on Cancer (AJCC), aber auch von der International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO). 1987 wurden die von der UICC and der AJCC geschaffenen Einteilungssysteme zu einem einheitlichen Klassifikationssystem zusammengeführt, sodass die am häufigsten vorkommenden Tumore nach einer speziellen TNM-Klassifikation eingeteilt werden [UICC 2009]. Die Klassifikation wird auch von nationalen und internationalen Krebsregistern herangezogen. Diese basieren auf statistischen Analysen, die Prognosen über das Verhalten von Tumorerkrankungen aufstellen. Die Einteilung einer Tumorerkrankung nach Tumorgöße, Anzahl der befallenen Lymphknoten und Nachweis von Tochterabsiedlungen (Metastasen), erlaubt daher eine prognostische Aussage und bestimmt die angewendete Therapie [Böcker et al.2008].

Tab. 1: TNM-Klassifikation. nach Böcker et al. 2008: Leber und intrahepatische Gallenwege in Pathologie. 4. Auflage, Elsevier, Urban & Fischer: p. 814.	
TNM	Kriterien
T-Primärtumor	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
TX	Kein Hinweis auf Primärtumor
T0	Einzelner Tumor < 2 cm, ohne Einbruch in die Gefäße
T1	Einzelner Tumor < 2 cm, mit Einbruch in die Gefäße oder mehrere Tumore in einem Lappen < 2 cm ohne Gefäßbefall oder einzelner Tumor > 2 cm ohne Befall der Gefäße
T2	Einzelner Tumor > 2 cm mit Befall der Gefäße oder mehrere Tumore in einem Lappen < 2 cm mit Gefäßbefall oder mehrere Tumore in einem Lappen mit mind. 1 Tumor > 2 cm mit oder ohne Gefäßbefall
T3	Mehrere Tumore in mehr als einem Lappen oder Tumor hat ein großes Gefäß befallen
T4	Ausbreitung auf andere Beckengewebe
N-regionale Lymphknoten	
NX	Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in den Lymphknoten nachweisbar (bis 2 cm)
M-Metastasen	

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen nachweisbar

Weiters ist es wichtig, die histologische Differenzierung des Krebsgewebes zu bestimmen (Grade 1: gut differenziert bis Grade 3: schlecht differenziert). Damit kann auf die Aggressivität des Tumors geschlossen werden.

Liegt der Verdacht einer Tumorerkrankung vor, so werden bei den entsprechenden Untersuchungen Gewebeproben entnommen. Nach entsprechender Aufarbeitung des Gewebes wird ein histologischer Befund erstellt. Diese Untersuchungen ermöglichen eine genaue Planung der Behandlungsstrategien und –schritte [Pfeifer et al. 2006].

2.1.2.2. Ursachen und Risikofaktoren

Die molekularen Faktoren, die zur Entwicklung eines Leberkrebses führen, sind nicht genau bekannt. Leberzelltumore werden durch viele Faktoren begünstigt. Häufig entwickeln sich maligne Lebertumore auf der Unterseite einer Leberzirrhose. Leberzirrhosen entstehen, wenn gesundes Lebergewebe zerstört und von Bindegewebe ersetzt wird [Nguyen et al.2011]. Fortlaufende Schädigungen der Leber führen zunächst zur Verhärtung und dann zur Verkleinerung. Alkoholmissbrauch, Leberentzündungen (Hepatitis B oder C), Stoffwechselerkrankungen (Eisenspeicherkrankheit) erhöhen die Gefahr einer Lebererkrankung. Das Toxin (Aflatoxin B1) des Schimmelpilzes „*Aspergillus flavus*“ begünstigt ebenfalls die Entstehung von Leberkrebs in unterentwickelten Ländern. Dieser wächst auf Getreide, manchen Hülsenfrüchten und anderen Lebensmitteln bei feuchtem Klima. Die Wirkung anderer Toxine auf die Entstehung von Leberkarzinomen ist nicht bewiesen. So auch, die Wirkung oraler Zytostatika (Anti-Baby-Pille) gegen Androgenesierungen (vermehrte männliche Geschlechtshormone) oder Röntgenkontrastmitteln, welche Leberkarzinome begünstigen sollen.

Hepatitisviren (HBV und HCV)

Wichtig sind dabei Infektionen mit Hepatitisviren HBV und HCV, die unbehandelt, häufig chronisch verlaufen und zur Leberzirrhose führen. Während HCV eher in den industrialisierten Ländern wie USA, Europa und Japan vorkommt, ist HBV in Entwicklungs- und Schwellenländern in Afrika und Asien nach wie vor verbreitet.

Chronische HBV und HCV Infektionen können bei ca. 75% aller HCC Erkrankungen nachgewiesen werden [Pisani et al. 1990]. Der Zeitraum für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms in Patienten, die mit HCV infiziert sind, ist relativ lang (20-30 Jahre) und beinhaltet alle Stufen von milder chronischer Hepatitis bis zu schwerer chronischer Hepatitis, wobei sich über die Leberzirrhose hin ein HCC entwickelt [Montalto et al. 2002]. Epidemiologische Studien zeigen außerdem einen Zusammenhang von chronischen HBV-Erkrankungen und der Entwicklung eines HCCs [Kinlen 2004].

Toxine

Ein weiterer Faktor für die Entwicklung eines HCCs ist die Aufnahme von Aflatoxin B1. Dieses Toxin wird in großem Ausmaß von dem Pilz *Aspergillus*, der in großen Teilen Asiens und Afrikas vorkommt, wo er aufgrund von Klima (Hitze und Humidität) und den suboptimalen Lagertechniken auf Nahrungsmitteln (Korn, Erdnüsse, Leguminosen, etc.) optimale Wachstumsbedingungen findet [Montalto et al. 2002].

Alkohol

Ein weiterer Risikofaktor ist Alkoholmissbrauch. Bis jetzt konnte experimentell noch nicht gezeigt werden, dass Alkohol mutagen ist und somit direkt für neoplastische Degeneration verantwortlich ist. Trotzdem kann er als Ursache für die Entwicklung eines HCC angesehen werden, da Alkohol einen Einfluss auf die Entstehung von Leberzirrhose hat und somit die HCC Bildung sehr begünstigt [Montalto et al. 2002]. Die Anhäufung genetischer Veränderungen, die Zellen in einer zirrhotischen Leber entartet lässt, ist ein Prozess, der ausgehend von Stammzellen und reifen Hepatozyten über viele Stufen abläuft. Wie von Vogelstein (2004) beschrieben, entwickeln sich feste Tumore nach Unterbrechung mindestens dreier intrazellulärer Signalwege. Diese Unterbrechung ist das Ergebnis onkogener Aktivierung, die durch Punktmutationen, Veränderungen in der Genkopiezahl und/oder epigenetische Veränderungen bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen entsteht. Verlust der Heterozygotität (LOH, Loss of Heterozygosity), Punktmutationen, epigenetisches Silencing oder eine veränderte Transkription dominant-negativer Gene spielen eine Rolle [Vogelstein et al. 2004]. Diese Veränderungen in der Zelle können als potentielle therapeutische Ziele in Betracht gezogen werden [Bruix et al. 2004].

Weiters wurde in Studien gezeigt, dass HCC auch in manchen Familien gehäuft vorkommt. Bislang konnte aber noch kein spezifisches Gen identifiziert werden, die mit einer Prädisposition für diese Tumoren assoziiert sind [Chiang et al. 2008; Lee et al. 2004].

2.1.2.3. Behandlungsmöglichkeiten

Das Leberzellkarzinom stellt ein weltweites Gesundheitsproblem dar [Bruix und Sherman 2005]. Für mehr als 40 % der Patienten der westlichen Länder kommt eine kurative Behandlung, wie Resektion, Transplantation oder lokale Ablation infrage. 20 % der Tumore sind für eine Chemoembolisation geeignet [Bruix et al. 2005].

2.1.2.3.1. Kurative Therapie

Operation/Lebertransplantation

Die operative Entfernung des Tumors ist die Therapie der Wahl, sofern die Organfunktion aufrechterhalten werden kann. Dies ist allerdings nur in 10-20 % der Fälle möglich. Eine Genesung ist bei sehr weit fortgeschrittenem Stadium nicht mehr möglich. Bei einem operativen Eingriff soll das Karzinomgewebe völlig entfernt werden, dabei wird bis ins gesunde Gewebe operiert. Bei der Leberteilresektion wird nur der maligne Leberlappen entfernt, sofern dieser gut abgegrenzt ist vom gesunden Gewebe. Bei der Hepatektomie wird die gesamte Leber entfernt, wobei dies das beste Ergebnis erzielt. Anschließend ist eine Lebertransplantation erforderlich.

Wenn von einer Transplantation abgesehen wird, dann werden palliative Therapiemöglichkeiten eingesetzt, um die Entwicklung des Tumors zu stoppen, Nebenwirkungen einzugrenzen und eine verbesserte Lebensqualität zu gewährleisten [Dixon 2003].

2.1.2.3.2. Palliative Therapien

Bei einer sehr weit fortgeschrittenen Erkrankung ist der kurative Heilprozess nicht mehr möglich. So stehen noch andere Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung:

- Perkutane Alkoholinjektion (PEI): Mittels Ultraschall wird der Tumorstandort genau ermittelt. Dann wird unter Ultraschallkontrolle Alkohol in den Tumor injiziert. Nach mehrmaligem Wiederholen stirbt das Tumorgewebe ab [Dixon 2003].

- Radiofrequenz-Thermoablation (RFTA): Dient ebenfalls der Standorterkennung des Karzinoms mittels Ultraschall. Unter Ultraschallkontrolle wird eine Nadelelektrode in den Tumor eingeführt. Die Elektrodenspitze strahlt Radiofrequenzwellen aus, die das betroffene Gewebe auf ungefähr 100 Grad erhitzen. Dies verursacht das Zerstören des Gewebes. Hier liegt der Vorteil darin, dass diese Technik nur einmal durchgeführt werden muss [Dixon 2003].
- Kryotherapie: Unter Ultraschallkontrolle wird eine Kältesonde in den Bauch eingeführt, die durch flüssigen Stickstoff die Tumorzellen abtöten [Dixon 2003].
- Transarterielle Chemoembolisation (TACE): Hierbei wird ein Katheter durch eine Beinarterie bis zur betroffenen Leberarterie vorgeschoben. Ein Zytostatikum (Zellgift) wird über diesen Katheter ins Tumorgewebe eingeführt, wodurch die Tumorzellen zerstört werden [Dixon 2003].
- Chemotherapie: Zytostatika beeinflussen Prozesse, die nicht nur in Krebszellen sondern auch in gesunden Zellen ablaufen. Zytostatika, die die Zellteilung beeinflussen, wirken an sich bei rasch teilenden Zellen am Besten. Daher werden in den Tumoren vor allem die rasch teilenden Zellen abgetötet, während eine kleine Population von Tumorzellen, die sich nicht teilen, auch überleben. Diese resistenten Zellen entwickeln sich dann zu neuen, rasch wachsenden Tumoren. Daher haben medikamentöse Therapien bislang nur einen begrenzten Erfolg. [Dixon 2003].

2.2. Der weibliche Genitaltrakt- Das Ovar

2.2.1. Anatomie und Physiologie

Der paarig angelegte Eierstock (Ovar gehört zu den primären, weiblichen Geschlechtsorganen und ist der Produktionsort der Eizellen und der weiblichen Geschlechtshormone (Östrogene, Gestagene). Das Ovar stellt befruchtungsfähige Eizellen bereit und hat dadurch eine wichtige reproduktive und endokrine Funktion [Thews et al. 1999].

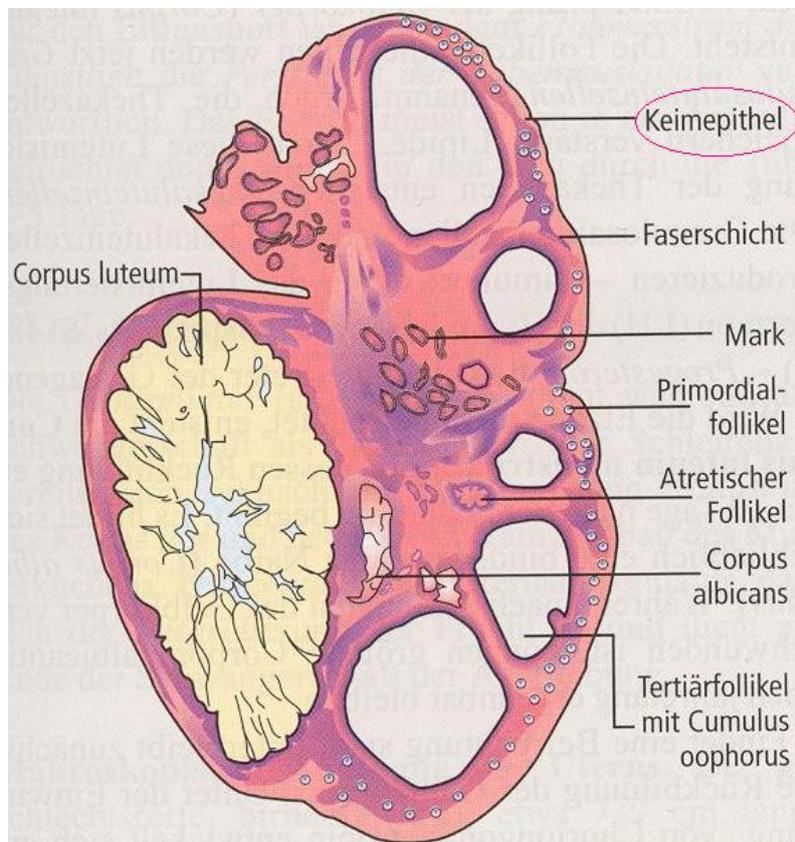


Abb. 2: Querschnitt durch das Ovar. nach Thews et al. 1999: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen; 5. Auflage p. 148

Das Ovar ist vom Epithelium superficiale (einschichtiges Epithel) umgeben, das einen direkten Übergang in die darunter liegende Tunica albuginea (weiße Bindegewebshülle) aufweist. Das Eierstockgewebe wird aus der äußeren Rinde und dem inneren Mark gebildet (siehe Abb.2).

In der Cortex ovarii oder auch Zona parenchymatosa (Eierstockrinde) genannt, befinden sich die Eizellen und Follikel. In der Rindensubstanz befinden sich die verschiedenen Reifestadien der Ovarialfollikel sowie die aus den Tertiärfollikeln

hervorgegangenen Gelbkörper (Corpora lutea). In Säugern steht die Eizellmenge schon vor der Geburt fest. So haben Weibchen ungefähr ein bis zwei Millionen Eizellen, die sich aber während der Pubertät auf etwa 300.000 bis 500.000 reduzieren. Im Laufe des Lebens kommen per Eizellsprung cirka 300 bis 500 Eier in den Eileiter. Viele in den Eizellen liegenden Follikel sterben ohne Eisprung ab (Follikelatresie) [Hartmann et al. 2009].

Medulla ovarii oder auch Zona vasculosa (Eierstockmark) genannt, enthält die Lymphgefäße, die Blutgefäße, das Bindegewebe und die Nervenfasern des Plexus ovaricus [Welsch et al. 2006].

Das weibliche Ovar befindet sich an der Teilungsstelle der Arteria iliaca communism im kleinen Becken. Daran angrenzend sind:

- Nervus obturatorius (Entzündungen im Eierstock und Zysten können mit Oberschenkelschmerzen einhergehen)
- Harnleiter
- Blinddarm (Appendix vermiformis) zum rechten Eierstock

2.2.2. Das Ovarialkarzinom: Epidemiologie und Ätiologie

In Europa machen bösartige Ovarialtumore etwa 20- 30% aller Genitalmalignome der Frau aus. Der Altersgipfel der meisten malignen Eierstocktumore liegt um das 60. Lebensjahr [Breitenecker et al. 1995]. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Ovarialtumor bösartig ist, beträgt für Patientinnen unter 45 Jahren etwa 7% (1:15) und steigt mit dem Alter auf etwa 30% (1:3) an [Thomas 1996]. Mit zunehmendem Lebensalter steigt die Häufigkeit maligner Tumore an [Pfisterer 2002]. Die höchsten Ovarialkarzinomraten sind in den industrialisierten Staaten zu finden, geringeres Vorkommen ist dabei in unterentwickelteren Ländern zu beobachten, was wahrscheinlich mit der höheren Geburtsrate in Verbindung steht. Eine Ausnahme ist Japan, das mit einer Rate von 3 / 100.000 Frauen pro Jahr die niedrigste Inzidenz von Ovarialkarzinomen aufweist [Pfleiderer et al. 1991].

Prognostisch ist das Ovarialkarzinom das ungünstigste Genitalkarzinom, das die Haupttodesursache unter den gynäkologischen Tumoren darstellt. Dies ist dadurch bedingt, dass es einen symptomlosen, beziehungsweise symptomarmen Verlauf hat und erst im fortgeschrittenen Stadium (III und IV) Beschwerden bereitet und dann erst

diagnostiziert wird [Schmidt- Matthiesen et al. 1995; Gubbles et al. 2010]. Eine Früherkennung ist meist nicht möglich. Es gibt bisher keine effektive Screeningmaßnahme zur Früherkennung. Spätsymptome wie Stuhlunregelmäßigkeiten, Durchfälle, Obstipation, Meteorismus, Zunahme des Bauchumfangs sowie Kachexie sind im Wesentlichen durch Aszites und Ausbreitung des Tumors im kleinen Becken und in den Darm bedingt. Mit Ausnahme des vererbaren Ovarialtumors und des fortgeschrittenen Alters der Frau konnten bisher keine eindeutigen Risikofaktoren für die Erkrankung gefunden werden. Allerdings scheinen die Einnahme von Ovulationshemmern sowie Anovulation einen protektiven Effekt zu haben [Bühling et al. 2009; Kiechle 2007]. Solche Umstände, die mit einer Verhinderung des Eisprungs einhergehen, sind Schwangerschaften und Geburten, Stillzeiten, späte Menarche und frühere Menopause sowie der Einsatz von Kontrazeptiva. Je mehr Familienmitglieder an einem Ovarialkarzinom leiden, desto höher ist die Chance zu erkranken. Die beiden Gene BRCA1 und BRCA2 spielen dabei eine Rolle (wie beim Brustkrebs). Bei unbelasteter Anamnese liegt das persönliche Erkrankungsrisiko bei etwa 1 %, während es bei Personen mit zwei oder mehr Verwandten 1.Grades, auf 40 % ansteigt [Bühling et al. 2009; Breckwoldt 2001]. Kinderlose und Spätgebärende haben ein 2,5-fach erhöhtes Risiko daran zu erkranken. Epidemiologischen Analysen zufolge besteht ein Zusammenhang zwischen der Zahl der Ovulationszyklen und der Entstehung eines Ovarialtumors. Man nimmt an, dass es nach jeder Ovulation zur Verlagerung von Oberflächenepithel in das Ovarinnere kommt. Die Epithelzellen sind dann einer für sie unüblichen Umgebung von Wachstumsfaktoren ausgesetzt, in der sie demzufolge malign entarten können [Baltzer et al. 1994; Auersperg 2001]. Eventuell steigert der aus Sonnenlichtentzug resultierende Vitamin-D-Mangel das Risiko an Eierstockkrebs zu erkranken [Benninghoff et al. 2003].

2.2.3. Einteilung der Tumore

Die malignen Ovarialtumore zeichnen sich durch histopathologische Heterogenität aus [Hiddemann et al. 2004].

Nach WHO-Klassifikation unterscheidet man drei Hauptgruppen von Tumoren, nämlich epitheliale Tumore, Keimstrang-, Stroma und Keimzelltumoren. Etwa 90 % aller bösartigen Ovarialkarzinome entstehen aus dem Epithel, das die Oberfläche

des Ovars bildet, während die restlichen 10 % auf Keimstrangstromatumoren (6%) und Keimzelltumoren (4%) entfallen [Baltzer et al. 1994; Gubbles et al. 2010].

2.2.3.1. Klassifizierung des Tumors

1) Epitheliale Tumoren (vom Oberflächenepithel ausgehend):

Die gutartigen epithelialen Tumoren werden als Zystadenome (Kystome), die bösartigen als Ovarialkarzinome bezeichnet, während die Borderline-Tumoren eine Sonderform eines kaum-bösartigen Ovarkarzinoms darstellen. In der Entstehung epithelialer Tumoren spielen Verletzungen des Oberflächenepithels während des Eisprungs mit Bildung von Zysten und Proliferationsvorgänge eine wichtige Rolle [Hiddemann et al. 2004]

- Seröse Tumoren
- Muzinöse Tumoren
- Endometroide Tumoren
- Klarzellige Tumoren
- Brenner Tumoren
- Undifferenzierte epitheliale Tumoren
- Undifferenzierte Karzinome

2) Keimzelltumoren (ausgehend von der Eizelle)

Keimzelltumoren entstehen in den Keimzellen und sind die zweithäufigste Gruppe nach den epithelialen Ovarialtumoren und sind meist gutartige, zystische Teratome. Etwa 5 % aller Ovarialkarzinome sind maligne Keimzelltumoren. Ihr Altersgipfel liegt im Kindes- und Jugendalter. Am häufigsten anzutreffen sind das Dysgerminom, das Teratom und der Dottersacktumor. Keimzelltumoren sprechen sehr gut auf eine cisplatinhaltige, hochdosierte Chemotherapie an [Gilks et al. 2009].

- Dysgerminom
- Dottersacktumor
- Teratom
- Chorionkarzinom
- Embryonales Karzinom

- Polyembryom

3) Keimstrang-Stroma-Tumoren (meist hormonproduzierend)

Diese Tumoren entstehen aus den Keimsträngen und aus dem Mesenchym der embryonalen Gonaden. Viele Keimstrang-Stroma-Tumoren bilden Steroidhormone und können einen Hyperöstrogenismus beziehungsweise einen Hyperandrogenismus mit Virilisierungserscheinungen hervorrufen. Granulosazelltumoren und Thekome sind östrogenproduzierende Tumoren, während Sertoli-Leydig-Zell-Tumoren vermehrt Androgene bilden [Kiechle 2007; Huber et al. 2001].

- Granulosa- und Thekazelltumoren
- Sertoli-Leydig-Zell-Tumoren, Androblastome
- Gynandroblastome

Daneben kommen auch noch einigen seltene Tumortypen und durch Metastasen extraovarielle Tumoren vor [Böcker et al. 2008].

4) Lipidzelltumoren

5) Gonadoblastome

6) Bindegewebige Tumoren

7) Unklassifizierte Tumoren

8) Metastasen (Mammakarzinom, Krukenberg-Tumor bei Magenkarzinom,...)

9) Tumorähnliche Follikelzysten (benigne Tumore)

2.2.3.2. Diagnostik

Neben der Erkennung eines Ovarialkarzinoms ist auch die Unterscheidung zwischen einer Ovarialzyste und einer echten Ovarialneoplasie sowie deren Dignität wichtig für die am besten geeignete Behandlungsmethode der Patientin. Die Symptome sind oft unspezifisch, wie z.B. gastrointestinale Beschwerden, Leistungsminderung oder Blutungsstörungen, sodass die Tumore vergleichsweise spät erkannt werden. In 25 % der Fälle wird über genitale Blutungen berichtet [Wallwiener et al. 2004].

Um den Ovarialtumor genauer zu charakterisieren, wird er in unterschiedliche Stadien unterteilt. Die Klassifizierung erfolgt nach bestimmten Kriterien, wobei hauptsächlich drei Gesichtspunkte maßgebend sind, die in der FIGO-Stadieneinteilung berücksichtigt werden. Tumorgröße (T), Anteil an Lymphknoten (N...nodus für Lymphknotenbefall) und das Vorhandensein von Metastasen (M) [Bühling et al. 2009; Hricak et al. 2007].

Tab.2 : FIGO-Stadieneinteilung für das Ovarialkarzinom. Schmidt-Matthiesen et al. 1995; Breckwoldt et al. 2001; Kiechle 2007; Huber et al. 2001	
Stadium I	Tumor beschränkt auf Ovarien
IA	auf ein Ovar begrenzt, Kapsel intakt, kein Aszites
IB	auf beide Ovarien begrenzt, Kapsel intakt, kein Aszites
IC	auf beide Ovarien begrenzt mit Kapselruptur; Oberflächentumor oder bösartige Tumorzellen im Aszites oder bei Peritonealspülung
Stadium II	Tumor an einem oder beiden Ovarien mit Ausdehnung auf das kleine Becken
IIA	Ausbreitung oder Metastasen auf oder in den Uterus oder die Tuben
IIB	Ausbreitung auf andere Gewebe des Beckens
IIC	Ausbreitung im Becken, zusätzlich maligne Zellen im Aszites oder mit einer positiven Peritonealzytologie nach Peritonealspülung
Stadium III	Befall eines oder beider Ovarien mit Peritonealmetastasen außerhalb des Beckens oder regionären Lymphknotenmetastasen
IIIA	Mikroskopische Peritonealmetastasen, inkl. Metastasen auf Leberkapsel, Lymphknoten sind negativ
IIIB	Makroskopische Peritonealmetastasen (<2cm), Metastasen auf Leberkapsel, Lymphknoten sind negativ
IIIC	Makroskopische Peritonealmetastasen (>2cm) und positive regionäre Lymphknoten
Stadium IV	Fernmetastasen (zB: Leberparenchym, Lunge), maligner Pleuraerguss

Als diagnostische Untersuchungsverfahren dienen die Ultraschalluntersuchung, die Computertomographie, die NMR und die transvaginale Sonographie. Die klinische Untersuchung beginnt mit einer bimanuellen Palpation (mit der einen Hand tastet man von außen die Bauchdecke, mit der anderen Hand tastet man von vaginal),

hierbei können größere Tumoren erkannt werden [Bühling et al. 2009; Breckwoldt et al. 2001; Baltzer et al. 1994]. Die Transvaginalsonographie dient nicht nur der Erkennung des Tumors, sondern auch zur Dignitätseinschätzung. Zu beachten ist, dass jede neu aufgetretene Ovarialzyste in der Postmenopause verdächtig auf ein Ovarialkarzinom ist und abgeklärt werden muss [Bühling et al. 2009; Schmidt-Matthiesen et al. 1995; Kiechle 2007].

2.2.3.3. Behandlungsmethoden

Die Therapie der Ovarialkarzinome variiert entsprechend der pathologischen Heterogenität der Tumore.

2.2.3.3.1. Operative Therapie

Nach Diagnosestellung wird zunächst eine möglichst komplette Tumoresektion (< 1cm) durchgeführt. Bei der Staging-Operation wird der komplette Bauchraum während der Operation auf Tumoransiedlungen abgesucht. Beim operativen Eingriff in die Bauchhöhle werden beide Eileiter, der Uterus, das große Netz sowie beide Lymphknoten herausgenommen [Bühling 2009; Gubbles et al. 2010; Kiechle 2007; Huber et al. 2001]. Es werden Biopsien an allen auffälligen Stellen und aus dem Peritoneum entnommen und es wird eine Spülzytologie zum Nachweis von Tumorzellen im Aszites gemacht. Zweck ist es, alle sichtbaren Tumorgewebe zu beseitigen und eine möglichst genaue Einstufung des Karzinoms zu gewährleisten, die über eine adjuvante Chemotherapie (z.B. Cisplatin/Paclitaxel oder Carboplatin/Cyclophosphamid) entscheidet. Außer bei Stadium Ia, wo die Kapsel intakt ist, erfolgt keine anschließende Chemotherapie. Eine Strahlentherapie wird eher selten angewendet [Bühling 2009; Gubbles et al. 2010; Kiechle 2007; Huber et al. 2001].

2.2.3.3.2. Chemotherapie

Da die meisten Patientinnen bei Operationen schon ein fortgeschrittenes Stadium mit Tumorausbreitung aufweisen, ist die Gesamtprognose des Karzinoms ungünstig. Somit kommt nach der chirurgischen Diagnostik der Zytostatikatherapie eine zentrale Rolle zur Behandlung des Ovarialkarzinoms zu [Bühling 2009; Gubbles et al. 2010; Kiechle 2007; Huber et al. 2001]. Standardtherapie ist heutzutage eine auf 6 Zyklen angesetzte Kombinationstherapie von Paclitaxel mit Carboplatin, wobei ein Zyklus einer Gabe entspricht und in einem Intervall von 3 Wochen erfolgt [Bühling 2009;

Kiechle 2007; Huber et al. 2001]. Diese moderne Chemotherapie hat sich im Vergleich zu früheren Behandlungsschemen durchgesetzt und gilt heute als beste Behandlung, da sie höchste Wirksamkeit (75% Remissionen) mit vergleichsweise erträglichen Nebenwirkungen verbindet. Bis vor einigen Jahren wurde Cisplatin in Mono- und Kombinationschemotherapie bevorzugt eingesetzt. Wegen seiner erheblichen Nebenwirkungen, wie Nephro-, Neuro- und Ototoxizität sowie Übelkeit, wurde Cisplatin jedoch durch sein Analogon Carboplatin ersetzt [Breckwoldt et al. 2001; Huber et al. 2001]. Paclitaxel gehört zur Gruppe der Taxane, die von verschiedenen Eibenarten gebildet werden. Der Wirkstoff kommt vor allem in der pazifischen Eibe vor. Seine Wirkung beruht darauf, dass es an β -Tubulin bindet und nachfolgend eine Stabilisierung der Mikrotubuli eintritt. Dadurch wird der Abbau von Mikrotubuli gehemmt; Paclitaxel fungiert also als ein Mitosehemmer. Wirksam sind aber auch alkylierende Substanzen wie Cyclophosphamid, die bis vor Einführung des Cisplatin als Standard in der zytostatischen Behandlung von Patientinnen galten. Weiters werden auch Doxorubicin und Etoposid zur Chemotherapie eingesetzt. Zu beachten ist, dass die Zytostatika-Therapie genügend hoch dosiert ist und konsequent durchgeführt werden muss [Breckwoldt et al. 2001; Hiddemann et al. 2004].

Um eine entsprechende Konzentration von Arzneistoffen in den Zellen zu erhalten, sind Transmembranproteine wichtig. Hier spielen transmembrantransporter von der OATP-Familie eine wichtige Rolle und diese werden im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

2.3. Die Transporterfamilie OATP

Die „*Organic Anion Transporting Polypeptides*“ (OATPs: beim Menschen, Oatps: bei Tieren) bilden eine Gruppe Natrium-unabhängiger Membrantransportproteine [Jacquemin et al. 1994; Kullak-Ublick et al. 1995; Noe et al. 1997; Walters et al. 2000], die den Transport von amphiphatischen organischen Anionen, einschließlich von Gallensäuren, Schilddrüsenhormonen, Steroidhormonen und deren Konjugaten, anionischen Oligopeptiden, Toxinen, Xenobiotika, Arzneistoffen wie z.B. Atorvastatin, Benzylpenizillin, Enalapril und Pravastatin, vermitteln [Meier et al. 1997; Kullak-Ublick et al. 2000; Kullak-Ublick et al. 2001].

Da sie auch für die Aufnahme von zytostatisch wirksamen Verbindungen wichtig sein können, sind sie für eine Chemotherapie von Tumoren von besonderer Bedeutung.

Einige OATPs sind selektiv bei der hepatischen Elimination von Albumin-gebundenen Komponenten beteiligt [Meier und Stieger 2002], trotzdem werden die meisten OATPs in verschiedensten Geweben, einschließlich der Blut-Hirn-Schranke, Herz, Lunge, Leber, Nieren, Plazenta, Testes und des Dünndarms, exprimiert [Tamai et al. 2000].

Bisher sind 36 unterschiedliche OATPs in Säugetieren, davon 11 beim Menschen, identifiziert worden [Wlcek et al. 2008].

2.3.1. Klassifizierung und Nomenklatur

OATPs werden anhand ihrer Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz in Familien und Subfamilien klassifiziert. Um eine Zugehörigkeit zu einer Familie oder Subfamilie zu gewährleisten, muss die Aminosäuresequenz eine Übereinstimmung von 40% bzw. 60% aufweisen [Hagenbuch und Gui 2008].

Betreffend der Nomenklatur werden die Familien mit arabischen Ziffern (z.B.: OATP1, OATP2, usw.) und die Subfamilien mit Buchstaben (OATP1A, OATP2B) gekennzeichnet. Bei individuellen Vertretern einer Subfamilie wird an den Buchstaben eine arabische Ziffer angegliedert (OATP1A1, OATP2B1). Des Weiteren werden menschliche OATPs mit Großbuchstaben (z.B.: OATP2B1) beschrieben, während OATPs von Nagetieren mit kleinen Buchstaben (z.B.: Oatp1a1) benannt werden [Hagenbuch und Meier 2004]. Dieses System beschreibt eine sogenannte ‚open-end‘ Nomenklatur, an der bei weiteren Unterteilungsnotwendigkeiten nochmals Zahlen oder Buchstaben angehängt werden könnten. Basierend auf einer

divergenten Evolution (Übereinstimmung der Aminosäuresequenz) und Definierung einer OATP/Oatp-Gen Superfamilie, die weiters in Subfamilien und individuelle Gene und Genprodukte eingeteilt werden kann, können weitere OATPs gut charakterisiert und Verwechslungen vermieden werden [Hagenbuch und Meier 2003]. Dieses evolutionäre System der Nomenklatur, das dem Cytochrom P450 System sehr ähnlich ist, wurde vom HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) eingeführt und genehmigt [Hagenbuch und Meier 2004].

Sind mehrere Splicevarianten eines OATPs vorhanden, werden diese folgend mit Unterstrich und einem „v“ versehen, z.B: Oatp1a3_v1, Oatp1a3_v2 [Hagenbuch und Meier 2004].

Tab. 3: Zellverteilung und chromosomale Lokalisation humaner OATPs. nach Kalliokoski et al. 2009 Oct;158(3): p. 694.09

Protein- Name	Gen- Name	Gen- Lokus	Gewebeverteilung
OATP1A2	SLCO 1A2	12p12	Gehirn, Niere, Leber, Darm, Ziliarkörper
OATP1B1	SLCO 1B1	12p12	Leber
OATP1B3	SLCO 1B3	12p12	Leber
OATP1C1	SLCO 1C1	12p12	Gehirn, Hoden, Ziliarkörper
OATP2A1	SLCO 2A1	3q21	Ubiquitär
OATP2B1	SLCO 2B1	11q13	Leber, Plazenta, Darm, Herz, Haut, Pankreas, Lunge, Dickdarm, Ovar, Hoden, Niere, Milz, Skelettmuskel
OATP3A1	SLCO 3A1	15q26	Ubiquitär
OATP4A1	SLCO 4A1	20q13.1	Ubiquitär
OATP4C1	SLCO 4C1	5q21	Niere
OATP5A1	SLCO 5A1	8q13.1	Herz, Nervensystem, embryonales Gewebe
OATP6A1	SLCO 6A1	5q21	Hoden

Während manche dieser OATPs in unterschiedlichen Geweben vertreten sind, zeigen andere, wie etwa „Leber-spezifischen OATPs, OATP1B1 und OATP1B3 eine Gewebsspezifität. OATP4C1 wird in der Niere hoch exprimiert, werden OATP6A1 im Hoden vorkommt. Diese Gewebsspezifität ist aber in malignem Gewebe nicht mehr gegeben [Kalliokoski et al. 2009].

2.3.2. Struktur

OATPs sind Transmembranproteine die aus 643-722 Aminosäuren zusammengesetzt sind [Tamai et al. 2000; Lu et al. 1996; Kanai et al. 1995]. Sie weisen 12-transmembrale Domänen (TMD) auf. Jedes OATP besitzt neben mehreren kleinen extra- und intrazellulären Domänen, eine große extrazelluläre

Domäne zwischen TMD 9 und 10 (extrazellulärer Loop 5) und mehrere N-Glykosilierungsstellen an Loop 2 und 5 [Hagenbuch und Meier 2004].

Experimente zeigten, dass die Glykosilierung für die Lokalisation des OATPs/Oatps in der Membran und für seine Transportfunktion essentiell sind [Lee et al. 2003]. Der extrazelluläre Loop 5 beinhaltet zehn konservierte Cystein-Reste [Hagenbuch und Meier 2003], die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind [Hänggi et al. 2006]. Diese Disulfidbrücken an Loop 5 sind für die Expression eines funktionellen Proteins an der Plasmamembran entscheidend [Hänggi et al. 2006]. Die durchgehend erhaltene „*Superfamilien-Signatur*“, das authentifizierende Merkmal der OATP Familie D-X-RW-(I,V)-GAWW-X-G-(F,L)-L liegt am Übergang des extrazellulären Loop 3 und der TMD 6 [Hagenbuch und Meier 2003]. Diese Struktur kann zur Identifizierung anderer OATPs/Oatps in verschiedenen Datenbanken verwendet werden.

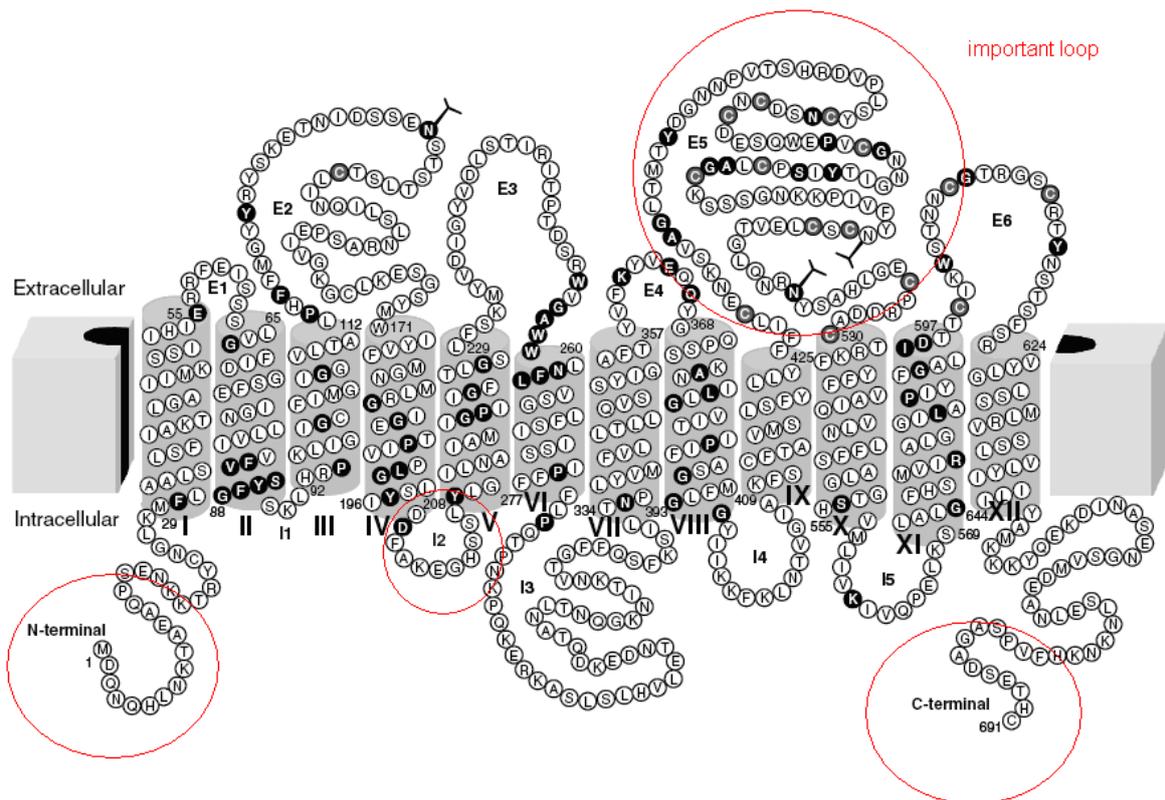


Abb. 3: Berechnetes topologisches Modell des humanen OATP 1B1. 12-Transmembrandomäne und konservierte Aminosäuren. nach Hagenbuch und Meier Jul 2008; 38(7-8): p. 780-82

2.3.3. OATP Familienmitglieder und deren Funktionalität

Im Menschen konnten bisher elf verschiedene OATPs identifiziert werden, die nach ihrer Homologie in der Aminosäuresequenz in Familien und Unterfamilien eingeteilt

werden und bisher in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen wurden [Hagenbuch und Gui 2008].

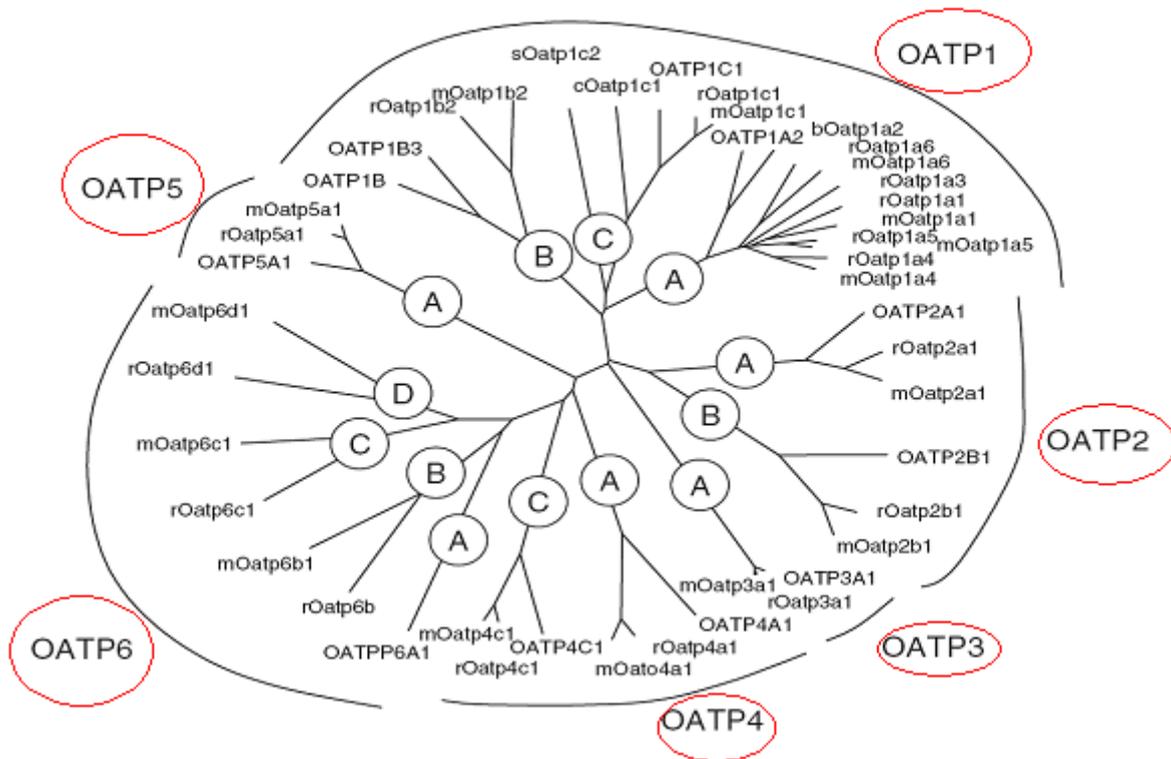


Abb. 4: Der phylogenetische Baum der OATP Gen Superfamilie. nach Hagenbuch und Gui Jul 2008; 38(7-8): p. 779

OATP1 Familie

OATP1A2 (früher OATP-A genannt) ist der einzige humane Vertreter der OATP1A Subfamilie. Das *SLCO1A2* Gen ist, zusammen mit allen anderen OATP1 Familienmitgliedern, in einem Cluster am Chromosom 12p12 lokalisiert [Hagenbuch und Meier 2003]. Der OATP1A2 Transporter besteht aus 670 Aminosäuren [Kullak-Ublick et al. 1995] und in der Leber hat dieser Transporter ein Molekulargewicht von 85 kDa [Kullak-Ublick et al. 1997]. Er vermittelt den Transport einer Vielfalt endo- und exogener, hauptsächlich amphipathischer organischer Komponenten, wie Gallensäuren, Schilddrüsen- und Steroidhormonen und deren Konjugate, Eicosanoide, cyclische und lineare Peptide, Toxine, organische Kationen und einer Vielzahl von Wirkstoffen.

OATP1B1 (OATP-C) ist ein Glykoprotein bestehend aus 691 Aminosäuren (ungefähres Molekulargewicht von 84 kDa) [König et al. 2000b]. *SLCO1B1* ist am

Chromosom 12p12 lokalisiert [Hagenbuch und Meier 2003]. Der OATP1B1 wird als leberspezifischer Transporter bezeichnet [König et al. 2000a]. Neben den üblichen OATP/Oatp Substraten, transportiert OATP1B1 auch Arzneistoffe wie Benzylpenicillin, Pravastatin und Rifampicin und die natürliche Toxine Microcystin und Phalloidin. OATP1B1 wird hauptsächlich in der basolateralen Plasmamembran der Hepatozyten exprimiert [Abe et al. 1999; Hsiang et al. 1999; König et al. 2000], wobei die Expression von dem Leber-spezifischen Transkriptionsfaktor HNF-1 α abhängt [Jung et al. 2001].

OATP1B3 (OATP8, LST-2) besteht aus 702 Aminosäuren, mit einem ungefähren Molekulargewicht von 120 kDa [König et al. 2000a]. *SLCO1B3* ist am Chromosom 12p12 lokalisiert [Hagenbuch und Meier 2003]. OATP1B3 weist eine 80%ige Aminosäuresequenzübereinstimmung mit OATP1B1 auf [Hagenbuch und Meier 2003] und wurde ebenfalls als leberspezifischer OATP eingestuft, dessen Expression an der basolateralen Membran der Hepatozyten im Bereich der Zentralvene am höchsten ist [Abe et al. 2001; König et al. 2000b]. Zusätzlich wurde dieser Transporter in unterschiedlichen Tumorzelllinien und malignem Gewebe (Magen, Darm, Pankreas, Gallenblase, Lunge und Hirn) nachgewiesen [Abe et al. 2001].

OATP1C1 (OATP-F) ist der einzige humane Vertreter der OATP1C Subfamilie. Er besteht aus 712 Aminosäuren und hat ein ungefähres Molekulargewicht von 78 kDa [Pizzagalli et al. 2002]. Das *SLCO1C1* Gen ist Teil des OATP1 Clusters, der am Chromosom 12p12 lokalisiert ist [Hagenbuch und Meier 2003]. Die Expression dieses Transporters ist an der Blut-Hirn-Schranke und in den Leydig'schen Zellen der Testes am höchsten [Pizzagalli et al. 2002]. OATP1C1 transportiert nur eine sehr geringe Anzahl an Substanzen, wie BSP (Bromosulfophtalein), Estradiol-17 β -glucuronide und Estrogen-3-sulfat. Er besitzt eine sehr hohe Transportaffinität für die Schilddrüsenhormone T4 (Thyroxin) und rT3 (reverses Triiodthyronin) [Pizzagalli et al. 2002].

OATP2 Familie

OATP2A1 (PGT, Prostaglandintransporter) ist der einzige humane Vertreter der OATP2A Subfamilie. Er besteht aus 643 Aminosäuren und hat ein ungefähres Molekulargewicht von 70 kDa [Hagenbuch und Meier 2003]. Das *SLCO2A1* Gen ist

auf Chromosom 3q21 lokalisiert. OATP2A1 ist in verschiedenen Geweben (Gehirn, Darm, Leber, Lunge, Ovarien, Placenta, Prostata, Milz und Dünndarm) exprimiert, wobei die Expression in Herz, Pankreas und Skelettmuskel am höchsten ist [Hagenbuch und Gui 2008]. OATP2A1 transportiert Prostaglandine und andere Eicosanoiden [Hagenbuch und Meier 2003]. Es wird angenommen, dass er in Zellen, die Cyclooxygenase (COX) exprimiert und an der Regulation des perizellulären Prostaglandinlevels teilnimmt [Schuster 2002].

OATP2B1 (OATP-B) besteht aus 709 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ungefähr 95 kDa im Ziliarkörper [Gao et al. 2005]. *SLCO2B1* ist am Chromosom 11q13 lokalisiert [Hagenbuch und Meier 2003]. Der OATP2B1 wird in humanen Geweben ubiquitär exprimiert. Bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 transportiert er nur ein kleines Spektrum an Substraten, wie BSP, Estron-3-sulfat und DHEAS (Dihydroepiandrosteron-3-sulfat). Bei saurem pH-Wert kommt der zusätzliche Transport von Taurocholat (Bilirubin Konjugat), Fexofenadin (Antihistaminikum), Statinen und Glibenclamid hinzu [Gao et al. 2000].

OATP3 Familie

OATP3A1 (OATP-D) ist am Chromosom 15q26 lokalisiert [Hagenbuch und Meier 2003]. Bei diesem OATP werden zwei verschiedene Splice-Varianten exprimiert, wobei die kürzere Variante OATP3A1_v1 (18 Aminosäuren des Carboxylterminus fehlen) primär in den Testes und Gehirn zu finden ist und die längere Variante OATP3A1_v2 eher ubiquitär exprimiert ist [Huber et al. 2007]. Diese zwei Proteine bestehen aus 710 und 692 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von ungefähr 76 und 74 kDa [Hagenbuch und Gui 2008]. OATP 3A1 ist für den Transport von Prostaglandinen, Schilddrüsenhormonen, dem cyclische Peptid BQ-123 und Vasopressin verantwortlich.

OATP4 Familie

OATP4A1 (OATP-E) besteht aus 722 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ungefähr 65 kDa [Sato et al. 2003]. *SLCO4A1* ist auf Chromosom 20q13.33 lokalisiert [Hagenbuch und Meier 2003]. OATP4A1 wird ubiquitär exprimiert.

OATP4C1 (OATP-H) ist ein Nierenspezifischer Transporter [Hagenbuch und Meier 2004; Mikkaichi et al. 2004]. Er besteht aus 724 Aminosäuren und hat ein

Molekulargewicht von ungefähr 79 kDa. SLCO4C1, ist auf Chromosom 5q21.2 lokalisiert [Hagenbuch und Gui 2008]. OATP4C1 scheint eine wichtige Rolle bei dem Transport von Schilddrüsenhormonen in die Niere zu spielen [Hagenbuch und Meier 2004].

OATP5 Familie

OATP5A1 (OATP-J) ist der einzige humane Vertreter der OATP5A Subfamilie und besteht aus 848 Aminosäuren und das Molekulargewicht beträgt ungefähr 92 kDa. SLCO5A1 ist auf Chromosom 8q13.3 lokalisiert [Hagenbuch und Gui 2008]. OATP5A1 wird ubiquitär exprimiert.

OATP6 Familie

OATP6A1 (OATP-I) ist der einzige Vertreter der OATP6A Subfamilie [Hagenbuch und Meier 2004] und besteht aus 719 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ungefähr 79 kDa. SLCO6A1, ist auf Chromosom 5q21.1 lokalisiert [Hagenbuch und Gui 2008]. RT-PCR Experimente zeigen die höchsten Expressionswerte in den Testes. Schwächere Signale finden sich in Milz, adultem und fötalem Gehirn und Plazenta [Suzuki et al. 2003; Lee et al. 2004]. Zusätzlich wurde OATP6A1 in Lungentumoren, Lungenkrebszelllinien, Blasen- und Speiseröhrentumoren nachgewiesen [Lee et al. 2004].

2.3.4. Physiologische Bedeutung

Wie der Name bereits aussagt, sind Natrium-unabhängige OATPs/Oatps für den Transport anionischer organischer Verbindungen verantwortlich, wobei der Transportmechanismus bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Man nimmt an, dass es zu einem Austausch von Anionen kommt. Dabei ist die zelluläre Aufnahme von organischen Substanzen mit dem Efflux einer anderen Verbindung gekoppelt z.B. Bicarbonate, Glutathione und/oder Glutathion-S-Konjugate [Hagenbuch und Meier 2004].

Es scheint, dass es allen Mitgliedern der OATP/Oatp Superfamilie möglich ist, einen bidirektionalen organischen Substrattransport zu vermitteln. Die Richtung des Transports scheint von dem lokalen Konzentrationsgradienten des Substrates abhängig zu sein. Zusätzlich scheint der OATP/Oatp vermittelte Transport auch pH-abhängig und elektroneutral zu sein, was zumindest für einige OATPs nachgewiesen wurde [Hagenbuch und Meier 2004].

2.3.5. Substrate

Bis heute wurden nur einige wenige Mitglieder dieser Transporterfamilie hinsichtlich ihrer Substratspezifität charakterisiert. Die Voraussetzungen, welche eine Substanz erfüllen muss um von OATPs als Substrat transportiert zu werden, sind noch nicht vollständig geklärt. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass amphipathische, organische Anionen mit hohem Molekulargewicht (>450 Da) aber auch neutrale sowie kationische Substanzen Substrate von OATPs sind. Als typische Substrate wurden Gallensäuren, Steroid-/ Thyroidhormone sowie deren Konjugate identifiziert. Zu den Arzneistoffen, die als OATP Substrate gelten, gehören Vertreter der Antibiotika, Cholesterinsenker oder Antihypertensiva. Basierend auf ihrer Lokalisation im menschlichen Körper und ihrer Funktion als Aufnahmetransporter spielen OATPs eine wichtige Rolle in der Absorption, Disposition und Elimination von exogenen Substanzen [Hagenbuch und Meier 2003].

Tab. 4: Substrate ausgewählter OATPs. nach Hagenbuch und Meier, Jan 2003: 10;1609(1): p. 10	
Protein	Substrate
OATP1A2	APD-Ajmalinium, Atrasentan, Bamet-R2, Bamet-UD2, Bilirubin, BQ-123, BSP Chlorambuciltaurocholat, Cholol, Ciprofloxacin, DHEAS, Deltorhin 2, Enoxacin Estradiol-17 β -Glucuronid, Estron-3-Sulfat, Fexofenadin, Gatifloxacin, Gd-B20790, Glycocholat, Levofloxacin, Lomefloxacin, Methotrexat, Microcystin, N-methylquinin, Norfloxacin, Ouabain, Pitavastatin, PGE2, rT3, Rocuronium, Rosuvastatin, Saquinavir, Taurocholat, T4, unprotonierte Metabolite
OATP1B1	ACU154, Arsen, Atorvastatin, Atrasentan, Bamet-R2, Bamet-UD2, Benzylpenicillin, Bilirubin, Bisglucuronosyl, Bilirubin, Bosetan, BQ-123, BSP, Caspofungin Cerivastatin, CDCA-NBD, Cholol, DADLE, DHEAS, Demethylphalloin, Enalapril, Estradiol-17 α -Glucuronid, Estron-3-Sulfat, Fluvastatin, Glycocholat, GUDCA, LTC4, LTE4, Methotrexat, Microcystin, Monoglucuronosyl Bilirubin, Olmesartan, Phalloidin, Pitavastatin, Pravastatin, PGE2, Rifampicin, Ro 48-5033, Rosuvastatin, SN-38, Taurocholat, TUDCA, TXB2, T3, T4, TR-14035, Troglitazon Sulfat, Valsartan
OATP1B3	Amanitin, Atrasentan, Bilirubin, Bosentan, Cholol, CCK-8, Deltorhin2, Demethylphalloin, Digoxin, Docetaxel, Enalapril, Estradiol-17 α -Glucuronid, Estron-3-sulfate, Fexofenadin, Fluvastatin, Fluo-3, Glutathion, Glycocholat, GUDCA, LTC4, Methotrexat, Microcystin, Monoglyucuronosyl Bilirubin, Olmesartan, Ouabain, Paclitaxel, Phalloidin, Pitavastatin, Rifampicin, Ro 48-5033, Rosuvastatin, Taurocholat, Telmisartan, T3, T4, TR-14035, Valsartan
OATP2A1	Eicosanoide: Prostaglandin D2 (PGD2), Prostaglandin E1 (PGE1), Prostaglandin E2 (PGE2), Prostaglandin F2 α (PGF2 α), Thromboxan B2
OATP2B1	Atorvastatin, Benzylpenicillin, Bosetan, BSP, CP-671,305, DHEAS, Estron-3-Sulfat, Fexofenadin, Fluvastatin, Glibenclamid, M17055, Pravastatin, Pitavastatin, Pregnenolon Sulfat, Prostaglandin E2, Rosuvastatin, Taurocholat, unprotonierte Metabolite
OATP3A1	<i>OATP3A1_v1</i> : Benzylpenicillin, BQ-123, Östron-3-sulfat, Prostaglandin E1 (PGE1), Prostaglandin E2 (PGE2), Prostaglandin F2 α (PGF2 α),

	Thyroxin (T4), Vasopressin
	OATP3A1_v2: Arachidonsäure, BQ-123, Prostaglandin E1 (PGE1), Prostaglandin E2 (PGE2), Thyroxin (T4), Vasopressin
OATP4A1	Benzylpenicillin, Östradiol-17 β -glucuronid, Östron-3-sulfat, Prostaglandin E2 (PGE2), reverses Triiodthyronin (rT3), Taurocholat (TCA), Thyroxin (T4), Triiodthyronin (T3)
OATP4C1	cAMP, Digoxin, Methotrexat, Ouabain, Sitagliptin, T4, T3
OATP5A1	Unbekannt
OATP6A1	Unbekannt

2.3.6. OATPs und Krebs

Heutzutage spielt die Chemotherapie eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Krebserkrankungen [Huang 2007] wobei die OATPs als Aufnahmetransporter einen bedeutenden Faktor in der Lieferung von Chemotherapeutika in neoplastische Zellen darstellen und somit einen Einfluss auf Erfolg als auch Nebenwirkungen in Chemotherapeutischer Behandlung erzielen [Nies 2007; Sai und Tsuji 2004].

Aufgrund eingeschränkter zellulärer Aufnahme oder geringer Penetration von Anti-Krebs-Medikamenten in das Tumorgewebe, können bei der Chemotherapie oft keine optimalen Ergebnisse erzielt werden [Trédan et al. 2007]. Zudem trägt eine nicht-selektive Wirkstoffaufnahme in gesunde Zellen Risiken einer Toxifizierung mit sich [Dobson und Kell 2008]. Durch das genaue Verständnis der Transportmechanismen könnte diesem Problem begegnet werden.

OATPs sind in verschiedenen Tumorgeweben zu finden, z. B. im Magen-, Pankreas-, Brust- und Kolonkarzinom, wobei sich in einigen Studien gezeigt hat, dass das Expressionsmuster in den einzelnen Tumoren zwischen den einzelnen Untergruppen variiert. Manche zeigen eine vermehrte Expression, andere wiederum eine verminderte.

So zeigten einige Studien, bei denen die Expression der verschiedenen OATPs in unterschiedlichem malignem Gewebe untersucht wurde, beispielsweise eine Expression des OATP1A2, OATP3A1, OATP4A1/4C1 und OATP5A1 in Brustkrebs [Miki et al. 2006; Nozawa et al. 2004; Pizzagalli et al. 2003, Wlcek et al. 2008], eine Expression des OATP6A1 in Lungen-, Blasen- und Speiseröhrenkrebs [Lee et al. 2004], eine Expression des OATP1B3 in Brustkrebs [Muto et al. 2007], Lungenkrebs [Monks et al. 2007] und gastrointestinalen Tumoren [Abe et al. 2001; Cui et al. 2003] und eine überregulierte Expression des OATP4A1 bei Darmkrebs [Ancona et al.

2006]. So stellte sich heraus, dass die Mehrheit der OATPs zumindest in einem malignem Gewebe bzw. einer Krebszelllinie exprimiert wird.

Basierend auf ihrer Multispezifität und Fähigkeit zytotoxische Substanzen wie Methotrexat und Paclitaxel zu transportieren, wären OATP1A2, OATP1B1 und OATP1B3 geeignete Kandidaten um eine Aufnahme von Zytostatika in Tumorzellen zu vermitteln. Eine systematische Untersuchung der einzelnen OATP Expression in den einzelnen Tumoren und der Zytostatika, für deren Aufnahme sie wichtig sind, könnte brauchbare Informationen bezüglich wirksamerer Therapiemöglichkeiten bringen [Hagenbuch und Gui 2008]. Es muss dabei aber auch bedacht werden, dass es bei vermehrter Expression durch einen bestimmten Transporter nicht nur zu einer erhöhten Aufnahme von zytostatischen Medikamenten kommen kann, sondern es bestünde auch die Möglichkeit, dass vermehrt Wachstumsfaktoren und Hormone in die Zellen transportiert werden. Jedoch könnte dies die Tumorentwicklung begünstigen und sich negativ auf die Chemotherapie auswirken [Hagenbuch und Gui 2008].

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1.1. Maligne und nicht- maligne Leberproben

Diese Studie wurde durch die Ethikkommission der Gemeinde Wien bewilligt und die Zustimmung der Patienten für die Verwendung der Gewebe für Forschungszwecke wurde eingeholt.

Die Untersuchungsreihe umfasst Gewebeproben von 43 Patienten, die sich hinsichtlich Tumorstadium, Histologie und Alter unterscheiden. Die Proben stammen aus dem KFJ Spital Wien und wurden im Rahmen der Routineoperation entnommen. Die Befunde wurden in der jeweiligen pathologischen Abteilung (Leiter Prof. M. Klimpfinger) erhoben. Dabei wurde sowohl eine Probe vom Tumor als auch eine von angrenzenden in der pathologischen Befundung normal erscheinenden („gesundem“) Gewebe für die Studie verwendet. Informationen über die Tumorstadien, den Differenzierungsgrad des Tumors, und das Alter der Patienten wurden der Krankengeschichte der Patienten entnommen. Insgesamt wurden Proben von 25 männlichen (n=25) und 18 weiblichen (n=18) Patienten untersucht.

Patient	Geschlecht	Alter	Grad
C1	Weiblich	58	2
C2	Weiblich	41	2
C3	Weiblich	83	3
C4	Weiblich	74	2
C5	Weiblich	78	3
C6	Weiblich	54	3
C7	Männlich	70	2-3
C8	Männlich	78	2-3
C9	Weiblich	77	2
H1	Männlich	43	3
H2	Männlich	62	2
H3	Männlich	48	2-3
H4	Weiblich	16	3
H5	Männlich	75	2
H6	Weiblich	77	3
H7	Männlich	44	2-3
H8	Männlich	52	2-3
H9	Männlich	62	3
H10	Männlich	69	3
H11	Männlich	63	3
M1	Männlich	54	3
M2	Männlich	57	3

M3	Männlich	56	2
M4	Weiblich	42	2
M5	Männlich	62	3
M6	Weiblich	66	2
M7	Weiblich	75	3
M8	Weiblich	66	3
M9	Männlich	54	3
M10	Männlich	70	2
M11	Weiblich	68	3
M12	Männlich	56	3
M13	Männlich	72	3
M14	Weiblich	65	3
M15	Männlich	47	3
M16	Männlich	59	2
M17	Männlich	62	2
M18	Männlich	47	3
M19	Weiblich	66	3
M20	Männlich	79	2
M21†	Männlich	22	3
M22†	Weiblich	75	3
M23†	Weiblich	82	3
HCC , hepatozelluläres Karzinom; CCC , cholangiozelluläres Karzinom; MLT , metastatische Lebertumore; † unbekannte primäre Tumore			

3.1.2. Isolierung von RNA mittels peqGOLD TriFast®

Zuerst wird aus 20-30mg der gesunden und malignen Gewebeproben die RNA isoliert, die dann in cDNA umgeschrieben werden soll, da für PCR Analysen nur DNA verwendet werden kann. Die Isolation von RNA aus Zellen ermöglicht eine Analyse der momentanen Zelltätigkeit, da nur aktive Gene in Zellen als RNA vorliegen.

RNA ist sehr instabil und ist durch ubiquitär vorkommende RNasen ständig vom Abbau bedroht. RNasen sind äußerst stabil und schwer zu inaktivieren. Daher sind bei der RNA-Isolierung ein möglichst RNase- freies Milieu und eine rasche, saubere Arbeitsweise unumgänglich. Weiters muss die RNA immer stark gekühlt behandelt werden, da sie bei Raumtemperatur sehr instabil ist.

Die Gesamt- RNA der Gewebeproben wurde mit Hilfe des peq GOLD Trifast® isoliert.

Material und benötigte Geräte

- peqGOLD Trifast® (Applied Biosystems, California, USA)

- Flüssiger Stickstoff (AGA Medizinische Gase, Wien, Ö)
- RNase- und DNAase freies H₂O (Gibco[®], Invitrogen[™] California, USA)
- AnalaR Normapur Ethanol (VWR Prolabo BDH, Pennsylvania, USA)
- Chloroform (Merck, Darmstadt, DE)
- Isopropanol (Merck, Darmstadt, DE)
- Reibschale + Pistill
- Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, DE)
- Pipetten (Eppendorf AG Hamburg, DE)
- DNase, RNase freie Pipettenspitzen (Biozym, Safe Seal Tips)
- L24 Vortexer (Labinco Breda, NE)
- IKA[®] T10 Basic Homogenizer (IKA[®] - Werke GMBH & Co.KG, Staufen, DE)
- Zentrifuge 5415 R (Eppendorf AG, Hamburg, DE)
- Nanodrop- 1000 Spektrophotometer (peqLab Biotechnologie GmbH, Nürnberg, DE)
- peqGOLD Universal Agarose (peqLab Biotechnologie GmbH, Nürnberg, DE)
- 10x TAE Puffer, pH 7,2 (Genaxxon Bioscience, Ulm, DE)
- Ethidiumbromid
- MIK 4600 Mikrowelle (Elin, Wien, Ö)
- HE99X Max Submarine Elektrophoreseapparatur (Hoefer, Holliston, MA)
- UV-Detektor (Herolab, Wiesloch, DE)

Durchführung

1. Gewebezubereitung

Gewebestücke werden in flüssigem N₂ im Mörser zerrieben und 1ml peqGOLD TriFast[®] zugegeben. Dann wird auf Eis homogenisiert mit dem Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburg, DE) und das Gemisch in Eppendorfgefäße überführt.

2. Phasentrennung

Die Proben werden für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Je eingesetztem Milliliter peqGOLD TriFast[®] 0.2 ml Chloroform zugegeben und die Proben für 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Danach wiederum für 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen

gelassen. Anschließend für 15 Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert um eine Phasenauftrennung zu erhalten. Dabei entstehen drei Schichten. Die unterste Schicht bildet die rote Phenol-Chloroform-Phase, dann folgt die Interphase und ganz oben liegt die farblose wässrige Phase. Die RNA ist ausschließlich in der wässrigen Phase angereichert, während sich die DNA und die Proteine in der Interphase und der Phenolphase befinden. Die wässrige Phase nimmt dabei ca. 60 % des Probenvolumens ein. Das verwendete Chloroform sollte von Zusätzen wie beispielsweise Isoamylalkohol frei sein.

3. RNA-Präzipitation

Die wässrige Phase wird in frische Eppis überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgt mit 750µl Isopropanol pro eingesetzten Milliliter peqGOLD TriFast[®]. Anschließend werden die Proben gemischt und für 10 Minuten auf Eis bzw. 4 °C inkubiert. Im Anschluss wird wieder für 15 Minuten bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das daraus resultierende RNA-Präzipitat besteht aus einem gelartigen Pellet, das an der Unterseite des Eppis liegt.

4. Waschen der RNA

Der Überstand aus Isopropanol wird vorsichtig entfernt und das übrige Pellet zweimal mit je 1 ml 70 % Ethanol aufgereinigt. Dazwischen wird gevortext und zentrifugiert (5 Minuten, 12.000 x g).

5. Lösen der RNA

Der Restalkohol wird abgesaugt und verworfen. Ein Erhitzen der RNA-Lösung auf 55°C für 3 Minuten verbessert die Lösbarkeit. Die RNA wird dann mit RNase-freiem Wasser (25-50 µl PCR-H₂O) suspendieren. Abschließend nochmals Erhitzen auf 55°C für 10 Minuten bei max. Geschwindigkeit!

Zur Feststellung ob die Probe in Gehalt und Reinheit entspricht wird in Folge eine Vermessung am Spektrophotometer durchgeführt. Die erhaltene Lösung ist frei von DNA und Proteinen, wenn sie einen A₂₆₀/A₂₈₀-Quotienten von 1.6-2.0. Um zu überprüfen, ob eine mögliche Degradierung der RNA stattgefunden hat, wird eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Die isolierte RNA ist bei Raumtemperatur nicht stabil und muss bei -80 °C gelagert werden.

6. Detektion der RNA

Die RNA wird mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wird ein 1,5 %iges Agarosegel verwendet.

Herstellung des Agarosegels:

Um das 1,5%-ige Agarosegel herzustellen, werden zuerst 0,450 g Agarose in 40 ml 1xTAE Puffer gelöst. Um eine vollständige Löslichkeit der Agarose zu erreichen, ist ein mehrmaliges kurzes Erhitzen mittels Mikrowelle und Schwenken nötig. Danach wird die nun klare Lösung unter ständigem Schütteln auf ca. 60°C abgekühlt, und 1,5µl Ethidiumbromid zugesetzt. Diese Mischung wird in den sogenannten Schlitten gegossen. Um die Probe später in das Gel applizieren zu können, sind kleine Kammern, sogenannte „Slots“, nötig. Diese erhält man durch Stecken von Kämmen, welche als Platzhalter dienen, in das noch flüssige Gel. Nachdem das Gel etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend mindestens 15 Minuten im Kühlschrank abkühlt, ist es gehärtet und die Kämmen werden entfernt.

Gelelektrophorese:

Nun wird der Schlitten in die Elektrophoreseapparatur eingelegt. Dabei sollte das Gel immer vollständig mit TAE Puffer überschichtet sein, ansonsten muss dieser ergänzt werden. Jeweils 2 µl Loading Dye Solution werden pro Probe in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit jeweils 1µl der PCR Produkte und 7µl H₂O gemischt. Pro Probe werden 10 µl Mix in die Geltasche pipettiert. Die Apparatur wird verschlossen, wobei darauf geachtet werden muss, dass die Elektrophorese immer vom negativen zum positiven Pol verläuft. Das Gerät wird gestartet, die Dauer beträgt 20 Minuten und der Vorgang wird bei 90 Volt durchgeführt. Anschließend werden die Gelplatten unter UV Licht analysiert und mittels Gel Scanner fotografiert.

3.1.3. Reverse Transkription mittels High Captivity cDNA Kit

Da bei der Polymerase Ketten Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) DNA als Vorlage benötigt wird, muss die isolierte RNA zuerst mit Hilfe einer reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in cDNA (complementary

DNA) umgeschrieben werden. Mit „revers“ ist der Vorgang während der Transkription gemeint, bei dem das Enzym die RNA in DNA umwandelt.

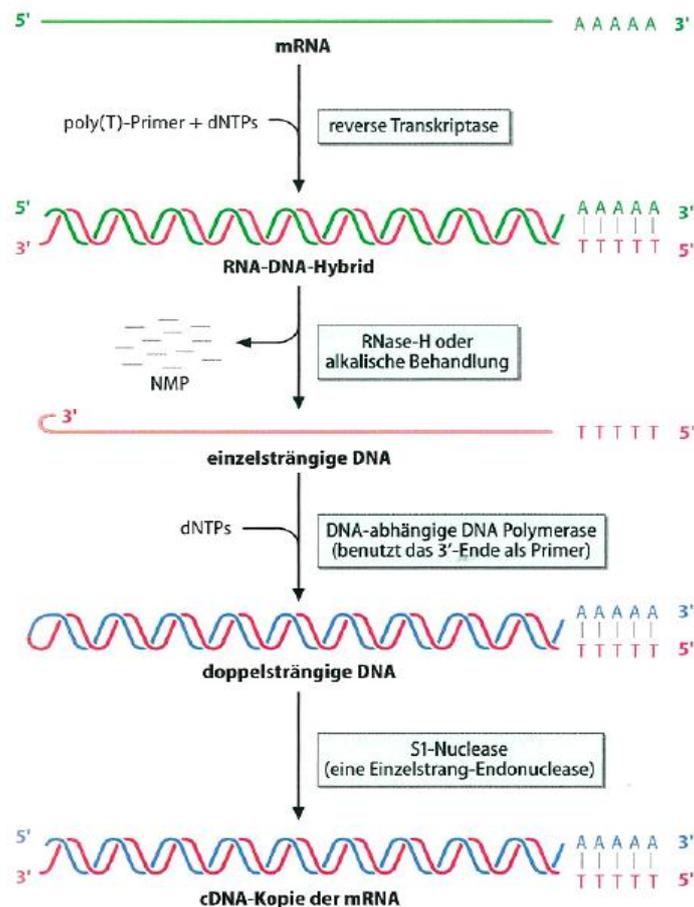


Abb. 5: Herstellung von cDNA durch Behandlung von mRNA mit reverser Transkriptase. <http://www.labor-gaertner.de>, Apr 2011

Material und benötigte Geräte

- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems California, USA)
 - 10x Buffer
 - 10x Random primer
 - 25x dNTP Mix
 - MultiScribe™ MuLV reverse transcriptase (50U/μl)
- Rnase™ Inhibitor (50U/μl) (Applied Biosystems, California, USA)
- DNase/RNase freies Wasser (Gibco®, Invitrogen™)
- Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, DE)

- Zentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg, DE)
- Biometra Personalcycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- L24 Vortexer (Labinco, Breda, NE)
- DNase, RNase freie Pipettenspitzen (Biozym, Safe Seal Tips)

Durchführung

2µg der Gesamt-RNA wird in 20µl Reaktionen unter Verwendung eines „High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit“ (RT Mastermix, Applied Biosystems) in cDNA revers transkribiert. Insgesamt werden von 43 Patienten maligne (T) und nicht maligne Gewebe (N) untersucht.

Tab. 6: Herstellung der cDNA von malignen (T) und nicht malignen (N) Leberproben							
Patient	cDNA	H2O	ng/µl	260/280	01:10*	µl RNA	µl H2O
1	1N	25	3128,6	1,82	312,86	6,39	3,61
	1T	25	984	1,88		2,03	7,97
2	2N	25	1632,4	1,9		1,23	8,77
	2T	25	221,3	1,78		9,04	0,96
3	3N	25	841,8	1,87		2,38	7,62
	3T	25	412,8	1,84		4,84	5,16
4	4N	25	1412,3	1,93		1,42	8,58
	4T	25	1926,3	1,92		1,04	8,96
5	5N	50	2565,8	1,87	256,58	7,79	2,21
	5T	25	1094,8	1,73		1,83	8,17
6	6N	25	762,7	1,89		2,62	7,38
	6T	25	356,9	1,8		5,60	4,40
7	7N	25	2429,4	2	242,94	8,23	1,77
	7T	25	473,8	1,82		4,22	5,78
8	8N	25	662,5	1,88		3,02	6,98
	8T	25	855,1	1,95		2,34	7,66
9	9N	25	3677,6	1,67	367,76	5,44	4,56
	9T	25	512	1,88		3,91	6,09
10	12N	25	2925,6	1,86	292,56	6,84	3,16
	12T	25	731,1	1,9		2,74	7,26
11	13N	25	3014,6	1,84	301,46	6,63	3,37
	13T	25	705	1,87		2,84	7,16
12	14N	25	753,9	1,91		2,65	7,35
	14T	25	545,5	1,88		3,67	6,33
13	15N	25	921,1	1,91		2,17	7,83
	15T	25	440,6	1,89		4,54	5,46
14	17N	25	630,4	1,84		3,17	6,83
	17T	25	438,2	1,82		4,56	5,44
15	18N	25	675,2	1,83		2,96	7,04
	18T	25	698,7	1,88		2,86	7,14
16	19N	25	848,5	1,88		2,36	7,64
	19T	25	974,9	1,89		2,05	7,95

17	20N	25	435,3	1,82		4,59	5,41
	20T	25	244	1,76		8,20	1,80
18	22N	25	1925,1	1,87		1,04	8,96
	22T	25	388,5	1,84		5,15	4,85
19	24N	25	486,1	1,81		4,11	5,89
	24T	25	814,9	1,92		2,45	7,55
20	25N	25	638,5	1,89		3,13	6,87
	25T	25	701,7	1,87		2,85	7,15
21	26N	25	341,2	1,8		5,86	4,14
	26T	25	821,9	1,86		2,43	7,57
*) 1:10 Verdünnung bei ng/µl Werten > 2000							

Der Mastermix für die reverse Transkription wird wie folgt zusammengestellt:

Tab. 7: MM Reverse Transkription 20µl/Reaktion	V pro Reaktion (µl)
10x RT Buffer	(2.0)
25x dNTP Mix (100 mM)	(0.8)
10x RT Random Primers	(2.0)
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	(1.0)
RNase Inhibitor	(1.0)
Nuclease-free H2O	(3.2)

Diese Reagenzien werden zu einem Totalvolumen von 10µl zusammengemischt und in 8er-Strips pipettiert. Nun werden jeweils 10µl RNA mit nukleasefreiem Wasser (1µg RNA in 10µl Wasser), wie in Tabelle 4 beschrieben, zugefügt um ein Volumen von insgesamt 20µl/Reaktion zu erreichen. Die Mischung in den Strips wird gevortext und zentrifugiert (1 Minute bei 2000rpm). Das Gemisch wird dann im Biometra Personalcycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) unter folgendem Programm amplifiziert:

Tab. 8: Amplifikationsprogramm	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temperature (°C)	25	37	85	4
Time (Min)	10	120	5	∞

Die entstandene cDNA (50ng/µl) wird 1:40 (Konzentration 1,25ng/µl) verdünnt.

3.1.4. TaqMan® Real-Time RT- PCR

Beim Prozess der Real Time RT- PCR wird Nukleinsäure vervielfältigt und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Bemessung erfolgt durch einen Fluoreszenzfarbstoff, der während des PCR-Zyklus ermittelt wird. Die

Fluoreszenz steigt proportional mit der Anzahl der PCR- Endprodukte. Ist der Vorgang der Real Time RT- PCR beendet, wird für die Quantifizierung die resultierenden Werte der Fluoreszenzsignale ermittelt. Die korrekte Bemessung ist nur in der exponentiellen Phase möglich, da nur dann die besten Reaktionsbedingungen vorliegen [Holzapfel et al. 2009, Bustin 2007].

TaqMan-Sonden

Für die Bemessung der PCR-Produkte ist die Anwesenheit des FRET (Fluorescence resonance energy transfer) entscheidend. Dabei wird ein Donor-Fluorochrom (Reporter) durch eine Lichtquelle angeregt und gibt eine gewisse Menge seiner Energie an ein in benachbartes Akzeptor-Fluorochrom (bzw. dark Quencher) ab. Mit steigender Entfernung zwischen Akzeptor und Donor, erfolgt eine Reduzierung von FRET und somit auch die des Fluoreszenzsignals des Akzeptors, während das Signal des Donors steigt. Vorteil dieses Verfahrens ist die hohe Genauigkeit des Assays, jedoch ist es zeitaufwendig und kostspielig. FRET kann in Verbindung mit einer Sonde, die an einem Ende einen Quencher hat, und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (TAMRA und FAM) versehen ist, verwendet werden. Bei der Synthese des 5'- Endes wird die Sonde mittels Taq-Polymerase (5'-3'-Exonuklease-Aktivität) abgebaut. Dies verursacht eine Trennung von Quencher und Fluorophor, wobei eine erhöhte Reporter-Fluoreszenz beobachtet wird. Am Ende jedes Elongationsschrittes findet die Messung statt [Holzapfel et al. 2009, Bustin 2007].

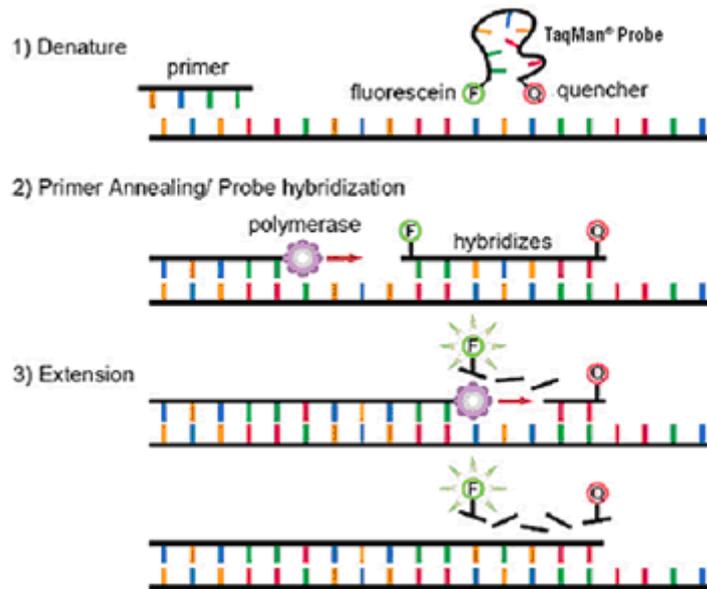


Abb. 6: Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der Real-time-PCR und TaqMan-Sonden. (1) Die Unterdrückung des Fluoreszenzsignals des Reporter-Fluorophors bei TaqMan-Sonden entsteht durch einen Quencher. Dabei findet eine Energieübertragung ohne Strahlung (FRET) statt. (2) Während des Zyklus findet eine Hybridisierung der Sonde mit der komplementären Nukleinsäure statt. Zunächst ist die Reporter-Fluoreszenz stillgelegt. (3) Das 5'-Ende der Sonde wird von der Taq-Polymerase (5'-3'-Exonucleaseaktivität) abgebaut. Nun kann die Fluoreszenz des Reporters bemessen werden. (http://de.wikipedia.org/wiki/Real_time_quantitative_PCR, Apr 2011)

Material und benötigte Geräte

- DNase, RNase freies Wasser (Gibco®, Invitrogen™)
- Forward Primer, Reverse Primer (Sense/Antisense) (in Primer/Probe Mix)
- TaqMan® Probe for all eleven human OATPs (Gene Expression Assays) (Applied Biosystems, Californian, USA)
- geNorm™ Housekeeping-Gene Selection Kit with PerfectProbe™ (PrimerDesign Ltd, South Hampton, UK)
- 2x TaqMan® PCR Mastermix (Applied Biosystems, Californian, USA)
- Micro Amp™ 96-Well Reaction Plates (0,1ml) (Applied Biosystems)
- Micro Amp™ Optical Adhesive Film (DNA/RNA/Rnase Free) (Applied Biosystems)
- ABI PRISM™ 7900 Sequenzdetektor (Applied Biosystems, Californian, USA)
- DNase, RNase freie Pipettenspitzen (Biozym, Safe Seal Tips)
- Zentrifuge (Sigma 4K15C)

Durchführung

Die Real- Time RT- PCR Analyse der elf humanen OATPs wird mittels StepOnePlus System (Applied Biosystems) durchgeführt.

Tab. 9: Gene Expression Assays für Real- Time PCR Analysen. http://www.appliedbiosystems.com , Apr 2011			
Gene Symbol	Assay Ida	Amplicon size (bp)	Accession number
SLCO1A2	hs00245360_m1	57	NM_021094.2
SLCO1B1	hs00272374_m1	77	NM_006446.3
SLCO1B3	hs00251986_m1	69	NM_019844.2
SLCO1C1	hs00213714_m1	92	NM_017435.3
SLCO2A1	hs00194554_m1	87	NM_005630.1
SLCO2B1	hs00200670_m1	113	NM_007256.2
SLCO3A1	hs00203184_m1	89	NM_013272.2
SLCO4A1	hs00249583_m1	80	NM_016354.3
SLCO4C1	hs00698884_m1	77	NM_180991.4
SLCO5A1	hs00229597_m1	60	NM_030958.1
SLCO6A1	hs00542846_m1	63	NM_173488.3

Für die PCR- Reaktion werden 4µl verwendet, in denen sich 5ng cDNA befinden (cDNA Konzentration 1,25ng/µl). Dies wird zu 5µl des gebrauchsfertigen 2x TaqMan® PCR Mastermix, 0.5µl des Gene Expression Assay und 0.5µl des nukleasenfreien H₂O zugefügt und ein Gesamtvolumen von 10µl pro Reaktion erreicht. Außerdem werden noch 2 Negativkontrollen (nukleasefreies H₂O) in die 0,1ml Mikro AmpTM 96-Well Reaktionsplatten (Applied Biosystems) pipettiert und mit adhesive optical films (Applied Biosystems) isoliert. Die Wahl der Referenz-Gene (Applied Biosystems, CA, USA) als interne Normalisierung ist ein wichtiger Faktor und kann eine tiefgreifende Wirkung auf die experimentellen Ergebnisse der Real-Time RT-PCR haben [DHEDA 2005]. Die ausgewählten Referenz- Gene wurden mittels Expression von zwölf verschiedenen humanen Housekeeping-Genes in bösartigen und gesunden Gewebeproben mit Hilfe des geNormTM Housekeeping-Gen Selection Kit with PerfectProbeTM (PrimerDesign Ltd, South Hampton, Großbritannien) und geNorm software [VANDESOMPELE et al. 2002] ermittelt. CYC1, UBC, ATP5B (HK-DD-hu-300, Primer Design Ltd.) und 18S (Part # 4310893E) wurden als akzeptable Referenz- Gene für die TaqMan® Real Time-Analyse der Gewebeproben ausgewählt.

Das Amplifikationsprogramm wird auf 2 Minuten bei 50 °C, 10 Minuten bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen je 15 Sekunden bei 95 °C und 1 Minute bei 60 °C eingestellt.

Das Fluoreszenzsignal der TaqMan® Sonde- Spaltung wird mittels StepOnePlus System (Applied Biosystems) bemessen.

Tab. 10: MM Real- Time PCR 10µl/ Reaktion	V pro Reaktion (µl)
2* PCR MM	5µl
Gene Expression Assay	0,5µl
PCR- H2O	0,5µl
Volumen	6µl MM + 4µl Sample

Die dabei resultierenden Ct-Werte werden in Microsoft Excel exportiert und die Ergebnisse unter Verwendung der $\Delta\Delta C_t$ Methode [LIVAK & SCHMITTGEN 2001] als relative Größen (RQ) auf den geometrischen Mittelwert der vier endogenen Kontrollen normiert [Vandesompele et al. 2002]. Einerseits werden die Real-time RT-PCR-Daten als Heatmap mit hierarchischer Clusteranalyse anhand der durchschnittlichen Verknüpfung der Algorithmen und Distanzmaße basierend auf die Standard-Pearson-Korrelation (Korrelation zentriert) dargestellt [Svoboda et al. 2011].

Andererseits werden die Real-time RT-PCR-Daten als Vergleich der signifikanten Unterschiede in der OATP Expression zwischen malignen und gesunden Gewebeproben unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Test dargestellt. Die Signifikanz ist als $p < 0,05$ festgelegt.

3.2. Expression von OATP 3A1 v1/v2 in gesunden und malignen Ovarialgeweben

RNA von 21 Patientinnen aus gesundem Ovarialgewebe und cDNA von 222 Patientinnen aus malignem Ovarialgewebe wurden von Partnern des OVCAD EU-geförderten STREP-Projektes, Leitung: Prof. Robert Zeillinger, Managerin: Prof. Dan Cacsire Castillo-Tong aus der Universitätsklinik für Frauenheilkunde (Medizinische Universität Wien) zur Verfügung gestellt. 194 Proben wurden für die Datenermittlung verwendet. Probe von benignen Tumoren wurden ebenfalls durch Prof. Zeillinger zur Verfügung gestellt.

Die Befunde wurden in der jeweiligen pathologischen Abteilung erhoben. Informationen über die Tumorstadien, den Differenzierungsgrad des Tumors, und das Alter der Patientinnen wurden der Krankengeschichte entnommen.

Tab. 11: Patientencharakteristik			
Geb. Datum	Organ	Diagnose	Histotyp
19.05.1974	Ovar	Cyst	endometrioid
12.10.1939	Ovar	Cyst	mucinous
20.08.1975	Ovar	Cyst	endometrioid
14.10.1982	Ovar	Cyst	mucinous
23.09.1944	Ovar	Cyst	serous
02.12.1950	Ovar	Cyst	serous/mucinous
20.07.1957	Ovar	Cyst	serous
29.07.1976	Ovar	Cyst	endometrioid
20.10.1966	Ovar	Cyst	mucinous
04.05.1949	Ovar	Cyst	mucinous
12.12.1941	Ovar	Cyst	serous
03.02.1947	Ovar	Cyst	serous
16.01.1973	Ovar	Cyst	serös
16.09.1949	Ovar	Cyst	mucinös
21.01.1956	Ovar	Cyst	Corpus Luteum
02.07.1941	Ovar	Cyst	serous/einschluss
02.04.1958	Ovar	Cyst	endometriose
20.01.1944	Ovar	Cyst	serous
23.09.1962	Ovar	Cyst	Einschluss
28.10.1939	Ovar	Cyst	serous/mucinous
22.05.1969	Ovar	Cyst	

3.2.1. Reverse Transkription mittels High Captivity cDNA Kit

1µg der Geamt-RNA wird in 20µl Reaktionen unter Verwendung eines „High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit“ (RT Mastermix, Applied Biosystems) in cDNA, wie in Tabelle 7 zuvor beschrieben, revers transkribiert.

Tab. 12: Herstellung der cDNA aus benignen Ovarialproben				
cDNA	c (ng/µl)	1µg	500ng	µl H2O
1	142	7.04		2.96
2	154	3.24	500ng	1.76
3	111	9.01		0.99
4	87	10.0		0
5	124	8.06		1.94
6	156	6.41		3.59
7	168	5.95		4.05
8	126	7.94		2.06
9	132	7.58		2.42
10	195	5.13		4.87
11	204	4.9		5.1
12	436	2.29		7.71

13	87	5.0	500ng	0
14	213	4.69		5.31
15	357	2.8		7.2
16	121	8.26		1.74
17	163	6.13		3.87
18	216	4.63		5.37
19	128	7.81		2.19
20	223	4.48		5.52
21	199	5.03		4.97

Das Gemisch wird dann im Biometra Personalcycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), wie in Tabelle 8 beschrieben, amplifiziert. Die entstandene cDNA (50ng/ μ l) wird 1:40 (Konzentration 1,25ng/ μ l) verdünnt.

3.2.2. TaqMan[®] Real-Time RT- PCR

Die Real-Time RT- PCR von OATP 3A1 wird mittels ABI PRISM[™] 7700 Sequenzdetektor (Applied Biosystems) und SDS 2.3 Software (Applied Biosystems) analysiert. Jede PCR- Reaktion beinhaltet 4 μ l, die aus 5ng cDNA besteht (Konzentration 1,25ng/ μ l). Dies wird zu 5 μ l des gebrauchsfertigen 2x TaqMan[®] PCR Mastermix, 0,5 μ l des Gene Expression Assay und 0,5 μ l des nukleasenfreien H₂O zugefügt und ein Gesamtvolumen von 10 μ l pro Reaktion erreicht. Außerdem werden noch 2 Negativkontrollen (nukleasefreies H₂O) in die 0,1ml Mikro Amp[™] 96-Well Reaktionsplatten (Applied Biosystems) pipettiert und mit adhesive optical films (Applied Biosystems) isoliert. Die Wahl der Referenz-Gene (Applied Biosystems, Foster City, CA) als interne Normalisierung ist ein wichtiger Faktor und kann eine tiefgreifende Wirkung auf die experimentellen Ergebnisse der Real-Time RT-PCR haben [DHEDA 2005]. Die ausgewählten Referenz- Gene wurden mittels Expression von zwölf verschiedenen humanen Housekeeping-Genes (18S, ATP5B, B2M, CYC1, EIF4A2, GAPDH, RPL13A, SDHA, ACTB, UBC, TOP1, YWHAZ) in bösartigen und gesunden Gewebeproben mit Hilfe des geNorm[™] Housekeeping- Gene Selection Kit with PerfectProbe[™] (PrimerDesign Ltd, South Hampton, Großbritannien) und geNorm Software [VANDESOMPELE et al. 2002] ermittelt. ACTB (PN 4326315E, Genbank Acc. No. NM_001101.2), UBC (Genbank Acc. No. NM_003286), TOP1 (Genbank Acc. No. NM_021009) und YWHAZ (Genbank Acc. No. NM_003406) wurden als akzeptable Referenz- Gene für die TaqMan[®] Real Time- Analyse der Gewebeproben ausgewählt. Als Kalibrator (IRC, Cat. No. 636690, Clontech

Laboratories Inc., Mountain View, CA, USA) fungierte eine kommerziell erhältliche Referenz- RNA. Das Amplifikationsprogramm wird auf 10 Minuten bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen je 15 Sekunden bei 95 °C und 1 Minute bei 60 °C eingestellt. Die Fluoreszenz der TaqMan® Sonde- Spaltung durch die 5' → 3' Exonuklease- Aktivität der DNA-Polymerase wird mittels ABI 7900HT Fast RT- PCR System und SDS 2.3 Software (Applied Biosystems) analysiert. Die dabei resultierenden Ct-Werte werden in Microsoft Excel exportiert und die Ergebnisse unter Verwendung der $\Delta\Delta Ct$ Methode [LIVAK & SCHMITTGEN 2001] als relative Größen (RQ) auf den geometrischen Mittelwert der vier endogenen Kontrollen normiert [Vandesompele et al. 2002]. Für die statistische Auswertung, werden die erhaltenen Werte von RQ in \log_2 (RQ) umgewandelt. Um die OATP- Transporter Expression zwischen zwei oder mehreren Gruppen zu vergleichen, wurde die Methode des T-Tests oder Einweg-ANOVA unter Verwendung der \log_2 - umgewandelten RQ-Werte als unabhängige Variablen, verwendet.

OVCAD Kriterien wurden verwendet, um Zeitpunkte für den Krankheitsverlauf zu definieren. Univariate Cox Schätzungen wurden verwendet, um den Einfluss der bekannten, prognostischen Faktoren und das Potenzial neuer Prognosefaktoren annähernd zu bestimmen. Das Cox-Regressionsmodell, einschließlich klinischer Parameter und Kandidatengene mit relativem Risiko $<0,95$ und $> 1,05$ wurde mit Hilfe des „backward conditional procedure“ (der „Removal term“ wurde 0,1 gesetzt). Alle statistischen Analysen wurden mittels Graph Pad Prism 5 (One-way, Anova-Test) durchgeführt. Multiple-Test Korrekturen wurden durch die Bonferroni Holm Verfahren durchgeführt. Statistisch signifikant sind P-Werte $\leq 0,05$ [Holm 1979].

3.3. Expression von SLCO 1B1 in ZR 75-1 Brustkrebszellen

Anhand von ZR 75-1 Brustkrebs Zellen soll die Expression von SLCO 1B1 detektiert werden. Dafür werden ZR 75-1 Zellen mit 1 μ g und 5 μ g Puromycin- Gehalt verwendet:

Tab. 13: Puromycinbehandelte- Untersuchungsreihe	
1μg Puromycin	5μg Puromycin
1.0 (Control)	1.0 (Control)
1.1	5.1
1.2	5.2
1.3	5.3
1.4	5.4
1.5	5.5

Material und benötigte Geräte:

- Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 Medium (PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach, DE)
- FBS (Fetal Bovine Serum), (PAN™ Biotech GmbH)
- Penicillin (10.000 U/ml)-Streptomycin (10.000 µg/ml)-Lösung (P/S), (Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA)
- 1x PBS (Phosphate Buffered Saline), pH= 7,4
- Trypsin/ EDTA-Lösung (10x), (Gibco®)
- Dimethyl Sulfoxid (DMSO), (SIGMA®, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH P.O, Steinheim, DE)
- 70 % Ethanol
- Zellkulturflaschen (25 cm²), (Iwaki, Asahi Technoglass Co., Ltd., Tokyo,JP)
- Sterile Pasteurpipetten/Pipetten (1 ml und 10 ml), (Sterilin®, Bibby-Sterilin, Staffordshire, UK)
- Greiner-Röhrchen (Techno Plast Products AG, Trasadingen, CH)
- Kryo-Röhrchen (Sterilin®)
- Inkubator (Kendro Laboratories GmbH, Vienna, AT)
- Zentrifuge (Hettich AG, Bäch, CH)
- Pipetboy (Fastpette, Labnet International Inc.)
- Laminar air flow (Heraeus, Hanau, Germany)

3.3.1. Zellkultivierung

Die verwendete Zelllinie ZR 75-1 wird unter standardisierten Bedingungen kultiviert, d.h. bei 37° und einem CO₂-Gehalt von 5%. Die Arbeit mit den Zellen findet in einem sterilen Bereich für Gewebekulturen, unter Benutzung eines „Laminar Air Flow“ (Sterilwerkbank) statt. Im Speziellen wird darauf geachtet, dass sowohl die Arbeitsfläche im „Laminar Air Flow“ als auch alle verwendeten Geräte, vor und nach der Benutzung mit 70% Ethanol desinfiziert werden, um Kontaminationen zu vermeiden. Als Standardmedium wird (RPMI)-1640, welches zusätzlich zu 10% mit FBS und zu 1% mit P/S versetzt wurde, verwendet. Dieses wird jeden 2. Tag gewechselt. Zur Beurteilung der Konfluenz und ausreichenden Ablösung der Zellen bei der Behandlung mit Trypsin wird eine mikroskopische Beurteilung durchgeführt.

3.3.2. Auftauen der Zellen

Die Kryo-Röhrchen werden zum Auftauen der enthaltenen Zellsuspension, in ein genau auf 37° temperiertes Wasserbad gehalten. Sobald die Zellen aufgetaut sind, werden sie in ein Greiner-Röhrchen, welches man mit 4 ml Medium befüllt, überführt. Bei 1000 rpm wird dann 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird mittels Pasteurpipette abgesaugt und in 4 ml frischem Medium resuspendiert. Nun wird die Suspension in eine Zellkulturflasche überführt und in den Inkubator gegeben.

3.3.3. Einfrieren der Zellen

Um sich einen Vorrat an Zellen anzulegen, können diese bei -180° mittels flüssigen Stickstoffs (Stickstoffturm) eingefroren werden. Dabei wird zunächst das alte Medium mittels Pasteurpipette abgesaugt. Im Weiteren werden die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen, welches nach einer Einwirkzeit von etwa 30 Sekunden ebenfalls abgesaugt wird. Nun wird zur Ablösung der Zellen vom Zellkulturflaschenboden 1 ml 0,5% Trypsin/EDTA-Lösung zugefügt. Um eine gute Ablösung zu gewährleisten, ist eine Inkubationszeit von ca. 3 Minuten erforderlich. Die Trypsin Reaktion wird mittels Zugabe von 4 ml Medium gestoppt und die Zellsuspension in ein Greiner Röhrchen überführt. Nach 3 minütiger Zentrifugation bei 1000 rpm wird das überstehende Medium abgesaugt und das verbleibende Zellpellet wird im Einfriermedium (RPMI 1640, FBS, DMSO im Mischungsverhältnis 8:1:1) resuspendiert. Die Suspension wird in ein beschriftetes „Kryo-Röhrchen“ überführt und in der Tiefkühltruhe bei -80° bis zum nächsten Tag gelagert, bevor die endgültige Lagerung bei -180° im Stickstoffturm erfolgt, da eine Schockgefrierung zu vermeiden ist.

3.3.4. Splitten der Zellen

Wenn eine Konfluenz von ca. 80% vorliegt, d.h. der Boden der Zellkulturflasche nahezu vollständig bedeckt ist, ist es nötig die Zellen zu splitten. Dieser Vorgang ist der Vorbereitung des Einfrierens der Zellen gleich. D.h. das alte Medium wird abgesaugt und mit 4 ml PBS gewaschen, welches wiederum entfernt wird. Hiernach fügt man 1 ml Trypsin zu. Während der Inkubationszeit werden die neuen Zellkulturflaschen vorbereitet und beschriftet (Name der Zelllinie, Datum, Passagenzahl). Die neuen, als auch die alte trypsinhältige Flasche wird mit 4 ml frischem Medium versetzt. Infolge versetzt man die neuen Zellkulturflaschen mit 3 Tropfen bis zu 1 ml (je nachdem wie schnell das weitere Wachstum erwünscht ist)

der Suspension aus der alten Flasche. Die alten Flaschen werden anschließend entsorgt, die neuen in den Inkubator gelegt.

3.3.5. Expression von SLCO 1B1

Als Ausgangspunkt für die Real Time PCR benötigt man eine Zellkulturflasche, deren Boden möglichst vollständig mit Zellen bewuchert ist. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen. Danach werden die Zellen durch Zugabe von 1 ml Trypsin abgelöst und im Inkubator mindestens 5 Minuten gestellt. Sind die Zellen nicht allzu sensibel kann die Einwirkzeit erhöht werden. Ziel ist, möglichst alle Zellen gelöst und getrennt vorliegen zu haben, jedoch so, dass diese selbst nicht durch das Trypsin angegriffen werden. Man mischt anschließend mit 4 ml Medium und kontrolliert das vereinzelt vorliegen unter dem Mikroskop.

1. RNA Isolierung

Für die RNA Isolierung werden die Zellen auf eine 6-well-Platte überführt. Jeweils 400µl Zellsuspension wird in ein Well überführt und mit 2ml Medium aufgefüllt. Die 6-well-Platte wird bis zum Ernten im Inkubator aufbewahrt.

Für das Ernten der Zellen wird das Medium abgesaugt und 3 Mal mit je 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wird pro Well 500µl peqGOLD Trifast[®] Reagenzlösung zugefügt. Um eine gute Homogenisierung sicherzustellen, ist es nötig mehrmalig zu pipettieren. Die Platte wird auf Eis und dann für 5 Minuten auf den Schüttler gestellt. Danach werden die Zellen in sterile Eppendorfgefäße überführt und die RNA aus den Zellen, wie zuvor bereits beschrieben, isoliert.

Der Reinheitsgehalt der RNA wird durch die Vermessung am Spektrophotometer und mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Die erhaltene RNA ist frei von DNA und Proteinen und hat einen A260/280-Quotienten von 1.6-2.0.

2. Reverse Transkription

Tab. 14: Reverse Transkription						
cDNA	H2O	ng/µl	260/280	01:10*)	µl RNA	µl H2O
1.0. (Control)	25	731.1	1.87		2.74	7.26
1.1.	25	525.6	1.83		3.81	6.19
1.2.	25	776.7	1.85		2.57	7.43
1.3.	25	1107.9	1.91		1.81	8.19
1.4.	25	1311.7	1.9		1.52	8.48

1.5.	25	1144.3	1.91		1.75	8.25
5.1.	25	708.7	1.87		2.82	7.18
5.2.	25	1267.2	1.92		1.58	8.42
5.3.	25	1669.1	1.93		1.2	8.8
5.4.	25	1463.2	1.91		1.37	8.63
5.5.	25	2163.5	1.93	216.35	9.24	0.76
*) 1:10 Verdünnung bei ng/µl Werten > 2000						

1µg der Geamt-RNA wird in 20µl Reaktionen unter Verwendung eines „High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit“ (RT Mastermix, Applied Biosystems) in cDNA wie in Tabelle 7 beschrieben, revers transkribiert. Die Reaktion findet im Biometra Personalcycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) statt und wird wie in Tabelle 8 beschrieben, angefertigt. Die entstandene cDNA (50ng/µl) wird 1:40 (Konzentration 1,25ng/µl) verdünnt.

3. TaqMan® Real -Time RT- PCR

Die Real- Time RT- PCR wird mit dem ABI PRISM™ 7700 Sequenzdetektor (Applied Biosystems) gemacht. Für die PCR- Reaktion werden 4µl verwendet, in denen sich 5ng cDNA befinden (cDNA Konzentration 1,25ng/µl). Dies wird zu 5µl des gebrauchsfertigen 2x TaqMan® PCR Mastermix, 0.5µl des Gene Expression Assay und 0.5µl des nukleasenfreien H₂O zugefügt und ein Gesamtvolumen von 10µl pro Reaktion erreicht. Außerdem werden noch 2 Negativkontrollen (nucleinsäuren-freies H₂O) in die 0,1ml Mikro Amp™ 96-Well Reaktionsplatten (Applied Biosystems) pipettiert und mit Adhesive Optical Films (Applied Biosystems) bedeckt, analysiert. Die Wahl der Referenz-Gene (Applied Biosystems, Foster City, CA) als interne Normalisierung ist ein wichtiger Faktor und kann eine entscheidende Wirkung auf die experimentellen Ergebnisse der Real-Time RT-PCR haben [DHEDA K. et al, 2005]. Wir untersuchen die Expression des OATPs 1B1 und verwenden als Kontrollgen das Housekeeping Gene HPRT (4310890E), das am stabilsten exprimiert war.

3.3.6. Auswertung

Zu Beginn einer PCR ist die DNA-Menge begrenzt (Startphase). Zum Schluss einer PCR ist die DNA Menge der Zielsequenz so stark angestiegen, dass immer häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren und so die PCR hemmen (Plateauphase). Zwischen Startphase und Plateauphase liegt die exponentielle Phase, in der sich die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen verdoppelt. Der

Anfang der exponentiellen Phase wird zur Quantifizierung genutzt. Dabei wird der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal wesentlich über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt als CT-Wert (Threshold Cycle = „Schwellenwert-Zyklus“; TaqMan™) bezeichnet. Die Signalintensität hängt von der Anzahl der Doppelstränge ab.

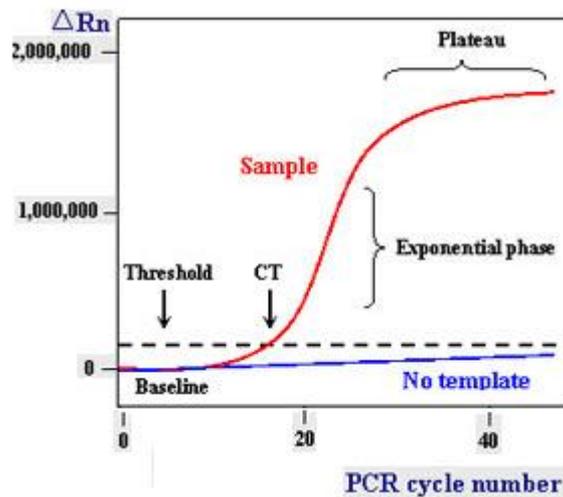


Abb. 7: Phasen der PCR Amplifikation: Exponential, Linear und Plateau Phase.
<http://www.rt-pcr.com>, Jan 2011

Als endogene Kontrolle werden sogenannte „Housekeeping genes“ verwendet. Dabei handelt es sich um stabil exprimierte Gene, deren Expression sich durch verschiedene pathologische Vorgänge oder pharmakologische Behandlungen möglichst wenig verändert. Die Expression eines Zielgens wird mit diesem Referenzgen (Housekeeping gene) normalisiert, indem die Signale des Referenzgens verwendet werden, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA-Probe auszugleichen.

Die Berechnung setzt eine optimale PCR-Effizienz voraus (Effizienz =2), d.h. dass die Anzahl der Zielsequenz sich mit jedem PCR-Zyklus verdoppelt. In der Praxis liegt die Effizienz bei 1,7 – 1,9. Daher können geringe Schwankungen in der Effizienz zu großen Unterschieden führen. Im Idealfall sollte deshalb die Auswertung einer relativen Quantifizierung eine Effizienzkorrektur beinhalten. Neben der Effizienz spielt auch die Wahl des richtigen Referenzgens eine wichtige Rolle. Die Detektion des Housekeeping Genes sollte einfach sein und sich nicht zwischen Zelltypen oder bei chemischer Behandlung unterscheiden. Der Ct-Wert (Threshold Cycle) gibt jene

Zykluszahl an, bei der die emittierte Fluoreszenz erstmals linear über den Schwellenwert (t) ansteigt.

Für die Berechnung der relativen Expression wird die $\Delta\Delta\text{Ct}$ - Methode nach LIVAK & SCHMITTGEN (2001) herangezogen. Dabei wird in den Testsamples der CT- Wert der endogenen Kontrolle vom Ct- Wert des Zielgens subtrahiert. Man erhält den ersten ΔCt Wert. Analog wird mit den Ct- Werten des Zielgens und den Ct- Werten der endogenen Kontrolle in der Kalibratorprobe verfahren. Man erhält den zweiten ΔCt Wert. Nun wird der ΔCt des Kalibrators vom ΔCt Wert der Testprobe abgezogen. Dies ergibt den $\Delta\Delta\text{Ct}$ Wert. Der Gehalt der mRNA Expression des Zielgens in den Testproben wird als n-fache Menge des Gehalts des Zielgens im Kalibrator (Referenz- RNA=1) angegeben (relative Quantifizierung) und mit folgender Formel berechnet:

$$2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

4. ERGEBNISSE

Identifizierung von Markern für die Progression und Chemotherapie-Resistenz von Ovarialkrebs und Lebertumoren sind von hohem Interesse. OATPs/SLCOs Proteine können eine breite Palette von endogenen Verbindungen, einschließlich Prostaglandine, Schilddrüsenhormone, Steroid-Konjugate und Verbindungen aus dem zellulären Metabolismus sowie Zytostatika transportieren. Dies könnte für das Tumorwachstum wichtig sein. Einige OATPs, wie OATP1B3 scheinen als Krebs-Progressionsmarker und in der Medikamentenresistenz eine wichtige Rolle zu spielen. Daher wurde die Expression der OATPs an Tumoren der Leber und des Ovars, die sich durch besondere Chemoresistenz auszeichnen, untersucht.

4.1. Analyse des OATP Expressionsmusters in Lebertumoren

22 Proben von Patienten mit primären Lebertumoren und Tumormetastasen von extrahepatischen Tumoren wurden für die Analyse der OATP-Expression mittels Real-Time RT-PCR verwendet. Hierfür wurde die RNA aus tiefgefrorenen Proben, die bei Routineoperationen entnommen wurden, isoliert.

Ziel der Studien war es, die Expression aller 11 OATPs in Lebergewebe zu bestimmen und die Expressionsraten im normalen Gewebe mit der des Tumorgewebes zu vergleichen. Es wurden je 7 Proben von HCC, 7 von CCC und 8 Metastasen untersucht. Das an den Tumor angrenzende Gewebe, das bei den pathologischen Untersuchungen keinen Hinweis auf eine maligne Veränderung zeigte, wurde als Normalgewebe klassifiziert. Allerdings gilt hier auch die Einschränkung, dass die Genexpression in diesem Gewebe bereits verändert sein kann, obwohl die Gewebsstruktur als normal anzusehen ist. Dies wurde zum Beispiel bei Kolonkarzinomen für normal erscheinende Tumorrandgewebe bei einigen Genen gezeigt [Abe et al. 2001].

Der mRNA Gehalt der 11 humanen OATPs wurde in nicht-malignen (N) und malignen (T) Lebergewebe mittels Clusteranalyse aus den Real-Time PCR Daten ermittelt und das Färbemuster in den einzelnen Proben ist der „Heat map (Abb. 8) zu entnehmen. Ein helles Grün bedeutet eine sehr niedrige Expression eines bestimmten OATPs, während ein helles Rot die höchste Expression symbolisiert. Die

Werte wurden jeweils auf den Durchschnittswert (schwarz) eines bestimmten OATPs in allen Proben normalisiert.

Die Daten zeigen eine Upregulation (rot) bei OATP2A1, OATP3A1, OATP4A1 und OATP5A1 und eine Downregulation (grün) der "Leber-spezifischen" OATPs, OATP1B1 und OATP1B3 sowie OATP1A2, OATP2B1 und OATP4C1. Die mRNA Expression von zwei OATPs (OATP1C1 und OATP6A1) lagen unter der Nachweisgrenze in der Mehrzahl der malignen und nicht malignen Leberproben und wurden daher nicht weiter analysiert.

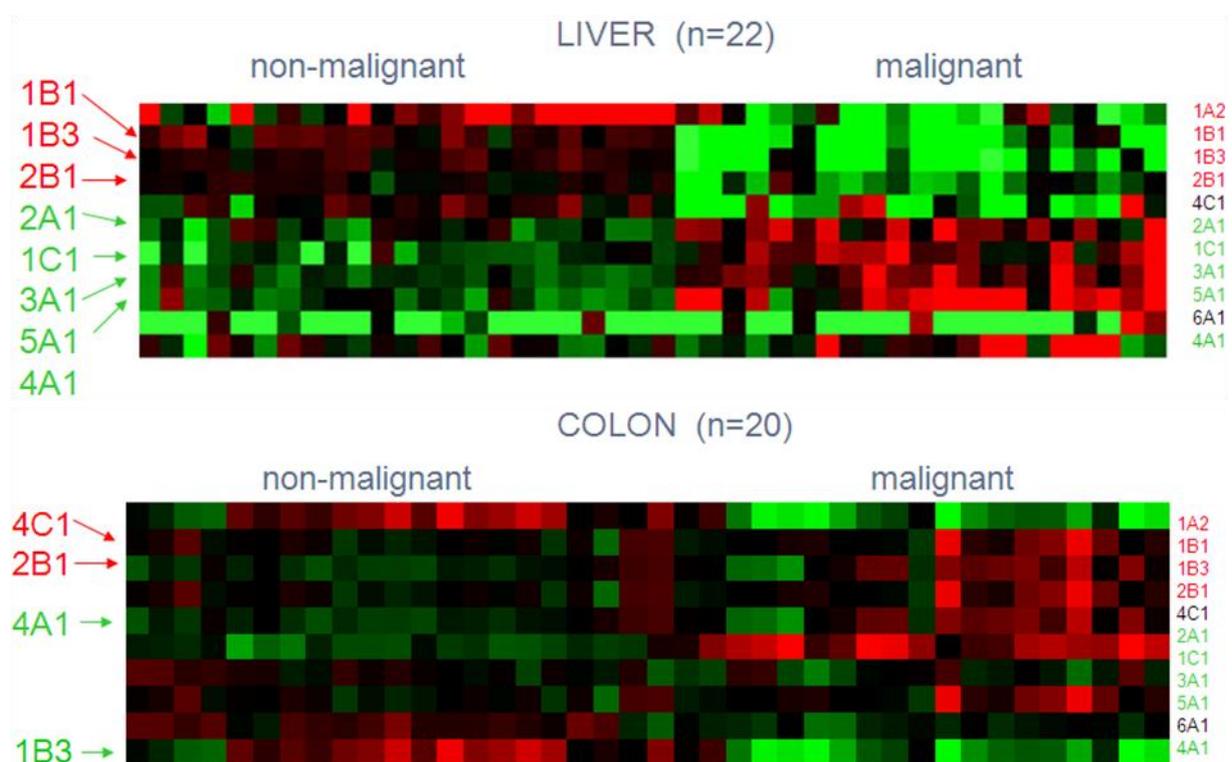


Abb. 8: Die Clusteranalyse zeigt zwei Heat maps, die die mRNA Expression der 11 humanen OATPs von ausgewählten Patienten in nicht- malignen (N) und malignen (T) Lebergewebe (n=22) und Kolongewebe (n=20) an.

Vergleichsstudien wurden auch mit malignen und nicht malignen Proben von Kolontumoren (die RNA wurde dankenswerterweise von Fr. Prof. Enikö Kallay, IPA) zur Verfügung gestellt.

In den Kolontumoren waren die leberspezifischen OATPs, OATP1B1 und OATP1B3 im nicht-malignen Gewebe nicht nachweisbar. OATP1B3 war auch nur in einigen malignen Tumoren exprimiert. Dies ist bemerkenswert, da die Expression von

OATP1B3 ausschließlich in malignem Gewebe und in anderen Tumoren (Pankreas, Prostata, Brust) gezeigt werden konnte. Es scheint, dass dieses OATP als Tumormarker Bedeutung haben könnte [Kounnis et al. 2011].

Unter der Nachweisgrenze in den meisten Tumoren waren auch OATP1C1, OATP6A1 und OATP1A2. OATP2A1, OATP2B1, OATP5A1 und OATP3A1 waren in den meisten malignen und nicht-malignen Proben relativ homogen exprimiert. Deutliche Unterschiede zwischen malignen und nicht-malignen Geweben zeigten sich in der Expression von OATP4A1 und OATP4C1. Während OATP4A1 in malignen Geweben erhöht war, war OATP4C1 vor allem im nicht-malignen Gewebe verstärkt exprimiert. Frühere Studien mittels DNA- Microarrays zeigten eine erhöhte Expression von OATP4C1 in Kolontumoren [Ancona et al. 2006].

4.1.1. Analyse der OATP-Expression in Gruppen von primären und sekundären Lebertumoren

Die mRNA Expression der 11 humanen OATPs wurde in primären Lebertumoren (HCC, CCC) und Lebermetastasen (MLT) analysiert. Dafür wurde die Studie auf 43 Tumorproben ausgeweitet (Abb 9).

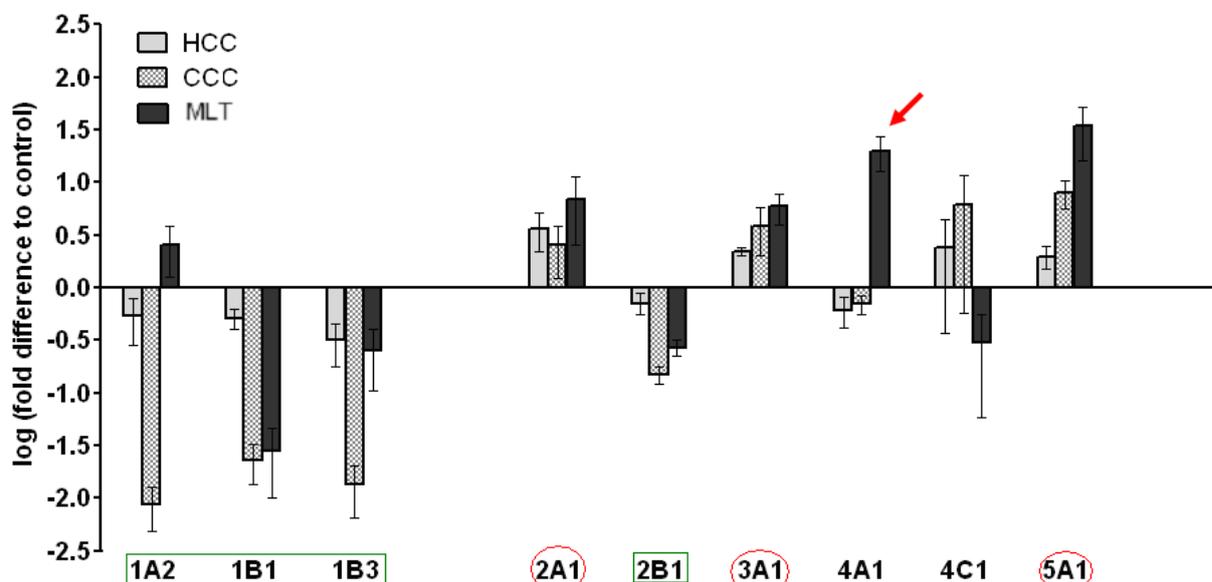


Abb. 9: Veränderung des Expressionsmusters aller 11 humanen OATPs in Gruppen von Lebertumoren (Hepatozelluläre Karzinome (HCC, n=11), Cholangiozelluläre Karzinome (CCC, n=9) und Lebertumormetastasen (MLT, n=23).

Die Mittelwerte der OATP-Expression (+/- SEM) wurden mittels Graph Pad Prism 5 berechnet und wurden auf den durchschnittlichen mRNA Gehalt pro Gruppe bezogen. Pfeil: OAT4A1 ist in den Metastasen erhöht.

Die statistische Analyse zeigt den Vergleich der Expression der einzelnen OATPs in den malignen und nicht-malignen Proben der einzelnen Tumorgruppen. Die statistische Analyse zur Ermittlung der signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$;) zwischen der Expressionsrate in den malignen vs. nicht-malignen Proben wurde mittels Mann-Whitney U Tests, der keine Normalverteilung vorausgesetzt, durchgeführt.

Man erkennt, dass die Expression der "Leber-spezifischen" OATPs, OATP1B1 und OATP1B3 sowie OATP2B1 und OATP1A2 deutlich unterdrückt wird. Dies ist vor allem bei der CCC- Gruppe zu beobachten, wo die Expression bis zu 60-fach vermindert ist ($P < 0,01$). Dies könnte den Ersatz von Hepatozyten durch maligne Zellen, die aus unterschiedlichen Vorläufern gewonnen wurden, widerspiegeln. Der mRNA Gehalt von OATP1B1 in HCC und OATP1B3 in HCC und MLT Proben zeigt eine mäßige (bis 4-fache, $P < 0,05$) Abnahme. Die Dedifferenzierung der Zellen während der Tumorprogression könnte die Downregulation von OATP1A2, einem Transporter in Cholangiozyten bei der gesunden, humanen Leber erklären. Eine reduzierte Expression von OATP2B1 ist auch in der CCC- und MLT Gruppe (4- bis 7-fach) zu verzeichnen.

Im Gegensatz zu diesen OATPs, sind OATP2A1, OATP3A1 und OATP5A1 besonders in den HCC, CCC und MLT- Gruppen hochreguliert. Die Expression dieser OATPs ist bis zu 40-fach höher als in den nicht-malignen Proben. In der HCC- Gruppe sind die Werte für diese OATPs im Allgemeinen höher als in den nicht-malignen Proben. OATP4A1 zeigt in der MLT- Gruppe eine 22- fach erhöhte Expression ($P < 0,002$), während bei den HCC- und CCC Patienten ähnliche oder niedrigere Werte im Vergleich zu den nicht malignen Proben verzeichnet wurden. Dies ist bemerkenswert, da dieses OATP in den Kolonkarzinomen verstärkt exprimiert wird und diese Tumormetastasen vermehrt von den Kolonkarzinomen aus Primärtumoren stammen.

Die Expression von OATP4C1 war sehr variabel, jedoch wurde auch ein starke Reduktion in der MLT- Gruppe ($P < 0,02$) beobachtet.

Wie Studien auch in Tiermodellen zeigen [Fardel et al. 2009, Le Vee et al. 2010] haben inflammatorische Zytokine eine Auswirkung auf die OATP Expression. Sie könnten dadurch die Abnahme der Expression bei OATP2B1, aber auch eine verstärkte Expression bei OATP2A1, OATP3A1, OATP4A1 und OATP5A1 bewirken.

Insgesamt ist zu sagen, dass OATPs bei Lebertumoren ein sehr spezifisches Expressionsmuster zeigen. Während leberspezifische OATPs in den Tumoren vermindert exprimiert werden, ist die Expression anderer OATPs erhöht. Es scheint, dass OATPs, die endo-oder exogene Verbindungen transportieren, die für das Tumorwachstum benötigt werden, im Tumor auch verstärkt exprimiert werden. Sie könnten dadurch zum Überleben der Tumorzellen beitragen.

Teile der Ergebnisse dieser Studien wurden in eine Publikation eingefügt, die 2008 im internationalen Journal „Cancer Biology and Therapy“ publiziert wurde [Wlcek et al. 2008].

4.2. Expression von OATP 3A1v1/v2 mRNA in benignen und malignen Ovarialtumoren

Weitere Studien über die die Expression von OATPs wurden in der Arbeitsgruppe „Zelluläre Pathologie und Pharmakokinetik“ auch an anderen Tumoren durchgeführt. Es zeigte sich, dass vor allem OATP3A1 bei vielen Tumoren, wie auch z.B. dem Ovarialkarzinom in allen Tumorproben stark exprimiert wird. Daher wurde die Expression von OATP3A1 in malignen Proben und in Proben von benignen Tumoren untersucht.

Die Studie umfasste 191 Ovarialkarzinomproben und 21 Proben von benignen Ovarialtumoren. Angaben über die Patientencharakteristik und den Krankheitsverlauf waren verfügbar und wurden für die Berechnung der Signifikanz der OATP3A1 mRNA Expression in verschiedenen Patientengruppen verwendet. Alle statistischen Analysen wurden mittels Graph Pad Prism 5 (One-way, Anova-Test) durchgeführt. Multiple-Test Korrekturen wurden durch das Bonferroni Holm Verfahren durchgeführt. Statistisch signifikant sind P-Werte $\leq 0,05$ [Holm 1979].

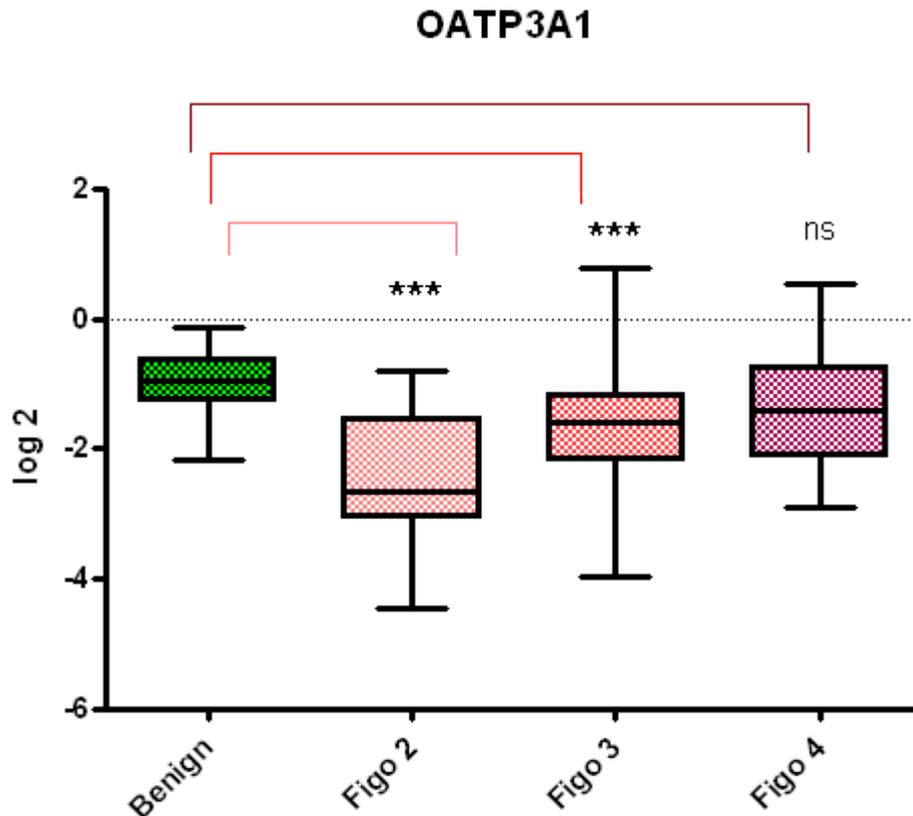


Abb. 10: OATP3A1 mRNA Expression in benignen und malignen Ovarialtumoren. Maligne Tumore wurden nach FIGO [Schmidt-Matthiesen et al. 1995; Breckwoldt et al. 2001; Kiechle 2007; Huber et al. 2001] in Stadien 1-3 eingeteilt. Die OATP3A1 Expression in malignen Tumoren [FIGO 2 (n=9), FIGO 3 (n=155), FIGO 4 (n= 30)] und in benignen Ovarialtumoren (n=21) wurden miteinander verglichen.

***P<0.005, OATP3A1 Expression in FIGO 2 und FIGO 3 Tumoren vs. der Expression in den benignen Tumoren.

Abbildung 10 zeigt die OATP3A1 Expression in malignen und benignen Tumoren. Die Expression in den malignen und benignen Ovarialtumoren wurden miteinander verglichen. Maligne Tumore wurden nach dem FIGO Status der Patientinnen [Schmidt-Matthiesen et al. 1995; Breckwoldt et al. 2001; Kiechle 2007; Huber et al. 2001] in verschiedene Stadien eingeteilt.

In FIGO-Stadium 2 [Schmidt-Matthiesen et al. 1995; Breckwoldt et al. 2001; Kiechle 2007; Huber et al. 2001] befällt der Tumor eines oder beide Ovarien mit Ausdehnung auf das kleine Becken. Die Unterklassen umfassen: IIA- Ausbreitung oder Metastasen auf oder in den Uterus oder in die Tuben, IIB- Ausbreitung auf andere Gewebe des Beckens, IIC- Ausbreitung im Becken, zusätzlich maligne Zellen im Aszites oder mit einer positiven Peritonealzytologie nach Peritonealspülung.

In FIGO-Stadium 3 [Schmidt-Matthiesen et al. 1995; Breckwoldt et al. 2001; Kiechle 2007; Huber et al. 2001] infizieren die Tumorzellen einen oder beide Eierstöcke mit Peritonealmetastasen an der Beckenoberfläche oder an regionalen Lymphknotenmetastasen. Die Unterklassen umfassen: IIIA- Mikroskopische Peritonealmetastasen inklusive Metastasen auf Leberkapsel. Die Lymphknoten sind negativ. IIIB- Makroskopische Peritonealmetastasen (<2cm), Metastasen auf Leberkapsel. Die Lymphknoten sind negativ. IIIC- Makroskopische Peritonealmetastasen (>2cm) und positive regionäre Lymphknoten.

In FIGO-Stadium 4 [Schmidt-Matthiesen et al. 1995; Breckwoldt et al. 2001; Kiechle 2007; Huber et al. 2001] bilden sich Fernmetastasen (zB: Leberparenchym, Lunge) und ein maligner Pleuraerguss aus.

Daten wurden graphisch mittels Graph Pad Prism 5 dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Expression von OATP3A1 bei Tumoren von Patientinnen im FIGO- Stadium 2 ($P < 0,005$) und Stadium 3 ($P = 0,023$) signifikant geringer als bei benignen Ovarialtumoren ist. Bei den Daten der Tumore von Patientinnen im FIGO- Stadium 4 lies sich kein signifikanter Unterschied gegenüber benignen Ovarialtumoren erkennen.

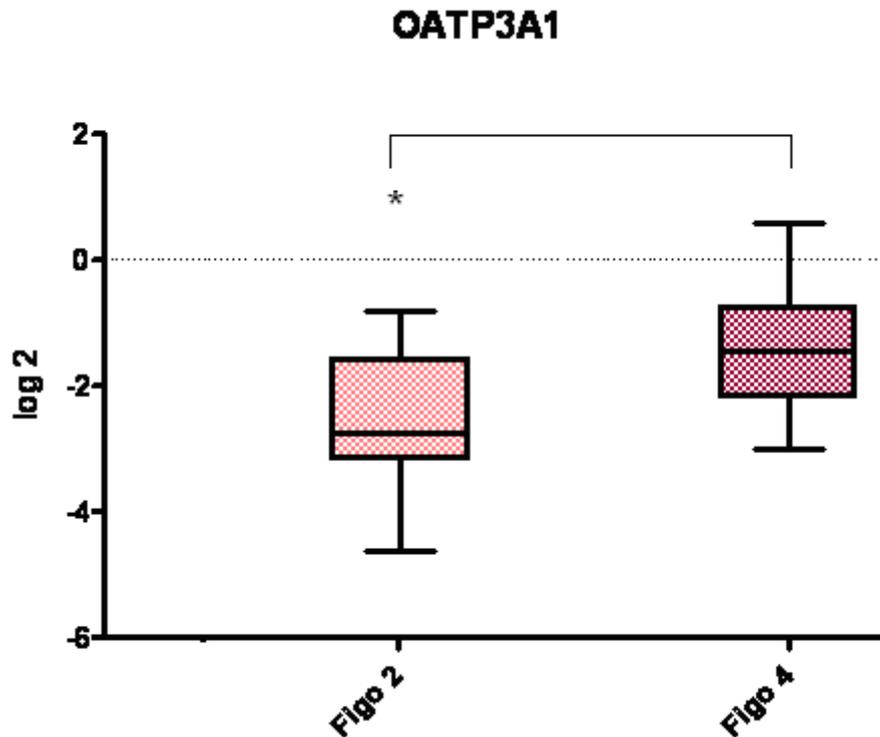


Abb. 11: OATP3A1 mRNA Expression in benignen und malignen Ovarialtumoren. Diese wurden nach FIGO [Schmidt-Matthiesen et al. 1995; Breckwoldt et al. 2001; Kiechle 2007; Huber et al. 2001] in verschiedene Stadien eingeteilt. Maligne Tumore [FIGO 2 (n=9) und FIGO 4 (n= 30)] wurden miteinander verglichen.

***P<0.05 FIGO 2 vs. FIGO 4**

Beim Vergleich der OATP3A1 Expression von Tumoren in FIGO- Stadium 2 (n=9) mit denen in Stadium 4 (n=30) war die Expression im frühen Stadium signifikant vermindert (P<0,05).

Dies weist auf eine Funktion dieses OATPs, dessen Substrate OATP3A1_v1: Benzylpenicillin, BQ-123, Deltorphin, Estrone-3-sulfate, PGE1, PGE2, PGF2á, T4, Vasopressin und OATP3A1_v2: Arachidonic acid, BQ-123, PGE1, PGE2, T4, Vasopressin sind, in der Tumorentwicklung hin [Hagenbuch and Meier 2004].

OATP 3A1

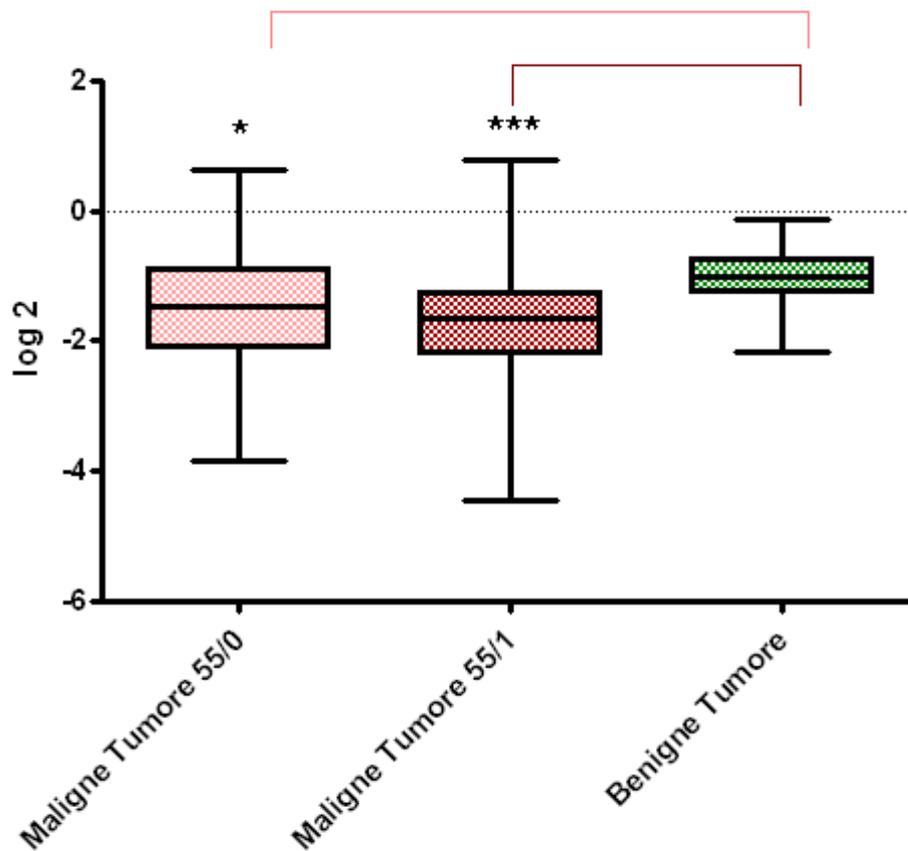


Abb. 12: Vergleich der OATP3A1 mRNA Expression in benignen und malignen Tumoren. Patientinnen mit malignen Tumoren wurden in zwei Altersgruppen >55 Jahre [Age 55/0 (n=86)] und <55 Jahre [Age 55/1 (n=108)] unterteilt. Bei den benignen Ovarialtumoren (n=17) waren alle Patientinnen über 45 Jahre alt. Die Gruppe der benignen Tumore wurden mit den beiden Altersgruppen (maligne Tumore) verglichen.

***P<0.005, *P<0.05

Patientinnen mit malignen Tumoren wurden in zwei Altersgruppen >55 Jahre [Age 55/0 (n=86)] und <55 Jahre [Age 55/1 (n=108)] unterteilt. Der Vergleich der OATP3A1 mRNA Expression in malignen Tumoren in der Altersgruppe jünger als 55 (55/0) und älter als 55 (55/1) mit benignen Ovarialtumoren wurde graphisch mittels Graph Pad Prism 5 dargestellt. Bei den benignen Ovarialtumoren (n=17) waren alle Patientinnen über 45 Jahre alt. Die Gruppe 55/0 zeigte gegenüber den benignen Ovarialtumoren signifikante niedrigere Werte für die OATP3A1 mRNA Expression (P<0,05). Auch bei der Gruppe 55/1 war die Expression deutlich geringer als bei der

benigen Gruppe ($P < 0,005$). Kein signifikanter Unterschied in der OATP3A1 mRNA Expression war in den beiden Altersgruppen zu beobachten. Dies zeigt, dass die OATP3A1 mRNA Expression in Tumoren nicht durch das Alter der Patientinnen und den Menopausestatus beeinflusst wird.

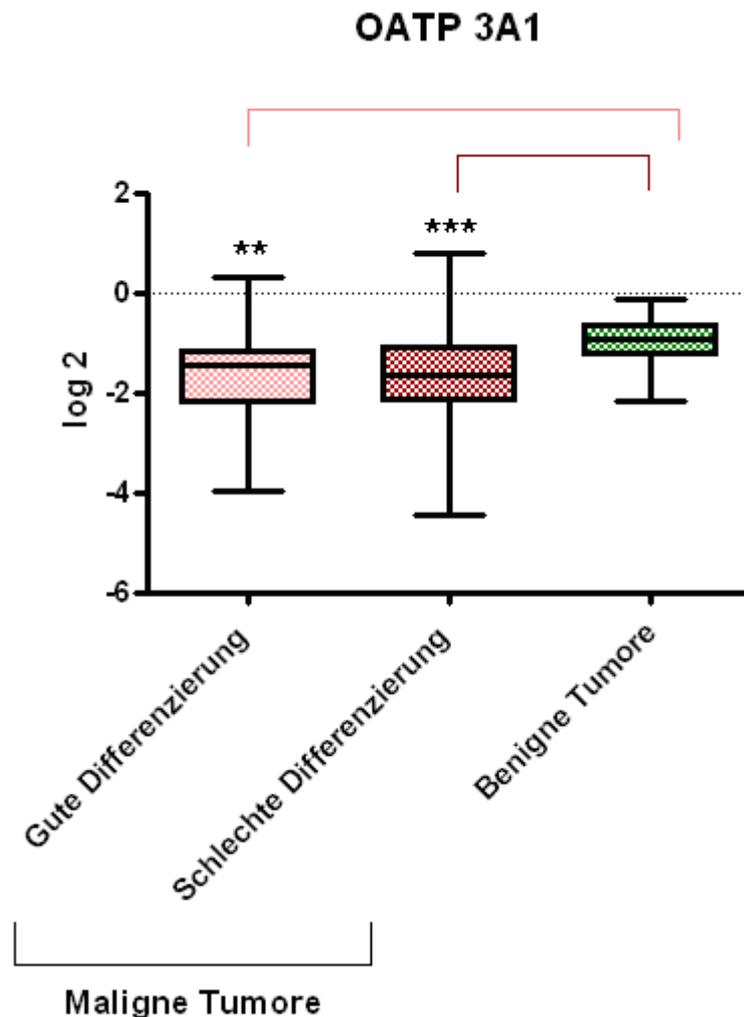


Abb. 13: Vergleich der OATP3A1 mRNA Expression in benignen und malignen Tumoren. Der Differenzierungsgrad der Patientinnen mit malignen Tumoren [gute Differenzierung (n=52) vs Schlechte Differenzierung (n=142)] wurde untersucht. Die Gruppe der benignen Tumore (n=21) wurde mit beiden Gruppen (maligne Tumore) verglichen.

*** $P < 0.005$, ** $P < 0.01$

Weiters wurde der Differenzierungsgrad der Zellen in den Tumoren berücksichtigt. Der Vergleich der OATP3A1 mRNA Expression von malignen Tumoren [gute Differenzierung, n=52; vs schlechte Differenzierung, n=142] mit benignen

Ovarialtumoren (n=21) zeigten signifikante Werte ($P < 0,005$). Diese Signifikanz könnte somit als Marker für die Tumorprogression dienen.

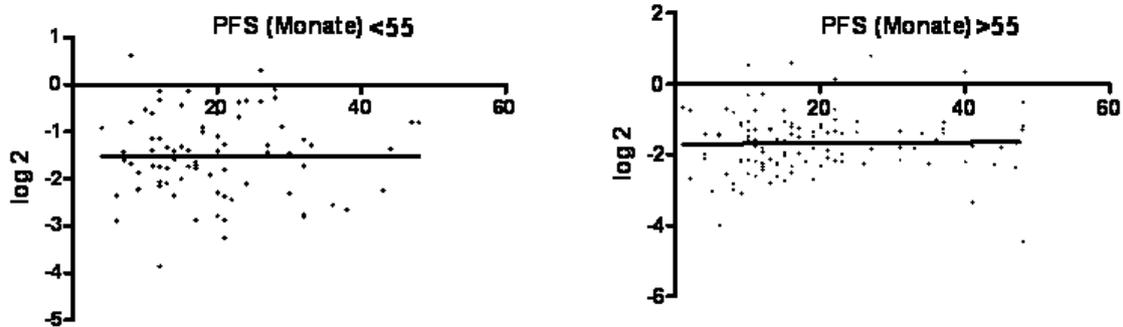


Abb. 14: Expression von OATP3A1 mRNA im Verhältnis zur Zeit des progressionsfreien Überlebens (PFS) in Monaten bei Patientinnen im Alter von <55 (n=78) und >55 Jahre (n=115). Die ermittelten Daten sind in Tab. 15 zusammengefasst.

Weiters wurde die OATP3A1 mRNA Expression mit der Zeit des progressionsfreien Überlebens (PFS, angegeben in Monaten) bei Patientinnen im Alter von <55 und >55 Jahre in Beziehung gesetzt. Wie aus Abb. 14 und Tab. 15 zu ersehen ist, lies sich in beiden Altersgruppen keine signifikante Beziehung zwischen PSF und der OATP3A1 mRNA Expression darstellen.

Gruppe	N	R ²	Steigung	95% Confidence Interval	P
<55	78	2,48E-05	0,00043 ± 0,010	-0,0195 to 0,0204	0,965
>55	115	2,48E-05	0,0012 ± 0,0067	-0,0121 to 0,0146	0,850

Tab. 15: Lineare Regressionsanalyse zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen dem progressionsfreien Überleben (PFS) und der OATP3A1 mRNA Expression bei Patientinnen <55 und > 55 Jahren.

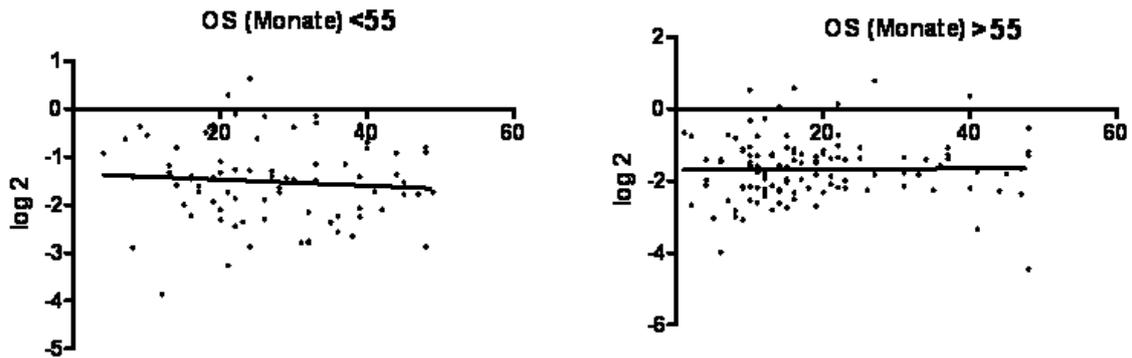


Abb. 15: Expression von OATP3A1 mRNA im Verhältnis zur Zeit des gesamten Überlebens (OS) in Monaten bei Patientinnen im Alter von <55 (n=79) und >55 Jahre (n=115). Die ermittelten Daten sind in Tab. 16 zusammengefasst.

Ebenfalls wurde die mRNA OATP3A1 mRNA Expression mit der Zeit des gesamten Überlebens (OS, angegeben in Monaten) bei Patientinnen im Alter von <55 und >55 Jahre in Beziehung gesetzt. Wie aus Abb. 15 und Tab. 16 zu ersehen ist, lies sich in beiden Altersgruppen keine signifikante Beziehung zwischen OS und der OATP3A1 mRNA Expression darstellen.

Gruppe	N	R ²	Steigung	95% Confidence Interval	P
<55	79	0,006883	-0,006 ± 0,0086	-0,0235 to 0,01090	0,4673
>55	115	0,000315	0,0012 ± 0,0067	-0,01211 to 0,01465	0,8506

Tab. 16: Lineare Regressionsanalyse zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen dem gesamten Überleben (OS) und der OATP3A1 mRNA Expression bei Patientinnen <55 und > 55 Jahren.

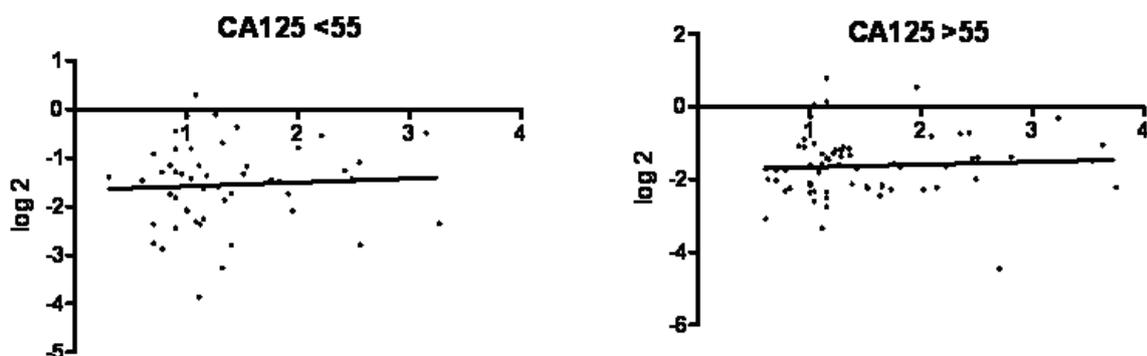


Abb. 16: Expression von OATP3A1 mRNA bei Patientinnen in Abhängigkeit von Tumormarker CA 125. Patientinnen wurden in die Altersgruppen <55 (n=50) und >55 Jahre (n=66) eingeteilt. Die ermittelten Daten sind in Tab. 17 zusammengefasst.

Gruppe	N	R ²	Steigung	95% Confidence Interval	P
<55	50	2,48E-05	0,07907 ± 0,1890	-0,3012 to 0,4594	0,6775
>55	66	2,48E-05	0,07406 ± 0,1441	-0,2140 to 0,3621	0,6091

Tab. 17: Lineare Regressionsanalyse zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen dem Biomarker CA 125 und der OATP3A1 mRNA Expression bei Patientinnen <55 und > 55 Jahren.

Weiters wurde die mRNA Expression von OATP3A1 im Verhältnis zu dem zum Tumormarker CA 125 gesetzt. Das Glykoprotein CA 125 ist ein Zucker-Eiweiß-Molekül, welches als Tumormarker bei Eierstockkrebs große Bedeutung hat [Duraismy et al. 2006]. Der Tumormarker CA-125 unterliegt dem Mucin16 Protein, (MUC16) [Yin et al. 2001]. Erhöhte Werte weisen auf einen Rückfall oder auf Metastasen hin [Yin et al. 2002]. Wie aus Abb. 16 und Tab. 17 zu ersehen ist auch hier kein signifikanter Zusammenhang zwischen CA125 und der OATP3A1 Expression.

4.3. Nachweis von OATP 3A1 mittels Immunfluoreszenz Mikroskopie und Immunhistochemie

Um die zelluläre Lokalisation von OATP3A1 zu bestimmen, wurde OATP in Paraffinschnitten von Patientinnen mit Ovarialkarzinom mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Ebenso wurde auch der Tumormarker CK19 (Cytokeratin-19), auch als Keratin Typ-I-Zytoskelett-19 bekannt, nachgewiesen [Schweizer et al. 2006]. Es ist ein Protein, das im Menschen durch das KRT19 Gen kodiert wird [Schweizer et al. 2006]. Keratine sind Intermediärfilament- Proteine und verantwortlich für die strukturelle Integrität von Epithelzellen. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit von CK19, ist er der am häufigsten verwendete Marker für die Erkennung von Tumorzellen in Lymphknoten, peripherem Blut, Brustkrebspatientinnen und Ovarialtumoren [Lacroix 2006].

Der Nachweis der Expression der Aufnahmetransporter erfolgt mithilfe eines OATP3A1 spezifischen Antikörpers, nämlich des Ziegen-Antikörpers und des Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers, sowie des CK19 Maus-Antikörpers und des

Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörpers. Die gefärbten Präparate wurden mittels Zeiss-Mikroskop, das mit einer AxioCam-Kamera versehen ist, aufgenommen.

Um die Lokalisation des Transporters in bestimmten Zellen im Gewebe zu lokalisieren, wurden Doppelfärbungen mit einem Antikörper gegen das Intermediärfilament Cytokeratin 19, das ein wichtiger Marker für differenzierte Epithelzellen im Ovar [Schweizer et al. 2006, Lacroix 2006] ist, durchgeführt.

Dieser Marker wurde mittels Alexa Fluor 568 gekoppeltem Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, nachgewiesen, während OATP3A1 durch einen Alexa Fluor 488 Antikörper detektiert wird.

Die Zellkerne wurden mit dem blau fluoreszierendem, interkalierendem DNA-Farbstoff DAPI angefärbt. Durch Anwendung von FITC-, Texas Red- und DAPI-Filter können die gefärbten Strukturen entweder in jedem Kanal separat [rot (Alexa Fluor 568), grün (Alexa Fluor 488), und blau (Dapi-Kernfärbung)] oder in der Überlagerung identifiziert werden. Dabei ergibt die Überlagerung des roten und grünen Signals eine gelbe- bzw. orange Färbung und dies zeigt, dass die beiden Proteine OATP3A1 und CK19 gemeinsam in den Zellen vorkommen.

4.3.1. Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von OATP3A1 in Ovarialkarzinomen

In den Abbildungen 17-19 sind Doppelfärbungen durch OATP3A1 und CK19 in Epithelzellen von Ovarialkarzinomen in 20- und 40facher Vergrößerung dargestellt. Die Überlagerung von CK19 (rot) mit OATP3A1 (grün) zeigt eine deutliche Gelbfärbung, was auf das Vorkommen von OATP3A1 in den Epithelzellen hinweist. Die Zellkerne sind durch DAPI blau gefärbt.

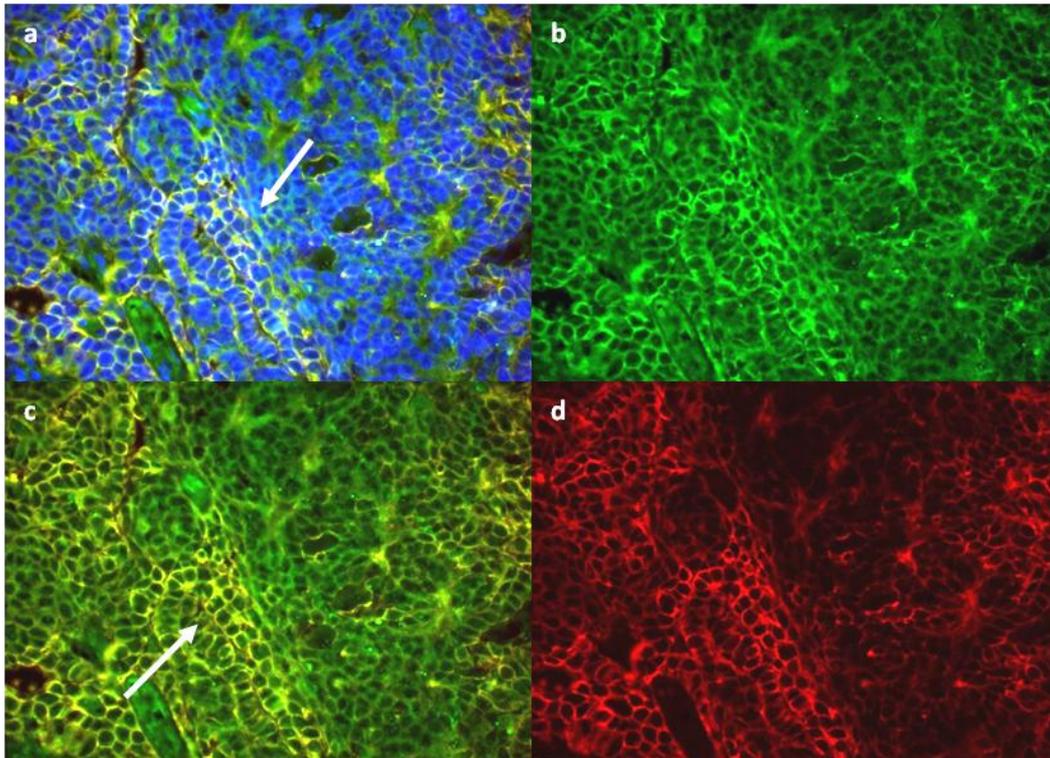


Abb. 17: Nachweis von OATP3A1 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie im Ovarialkarzinomgewebe. Anwendung eines OATP3A1 Ziegen-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers sowie eines CK19 Maus-Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörpers. 20x Vergrößerung

- a) Dreifachfärbung: Die Überlagerung von OATP3A1 mit CK19 (Pfeil) ergibt eine gelb bis orange Färbung. Auch die blaue Kernfärbung ist sichtbar.
- b) OATP3A1
- c) OATP3A1 und CK19 (ohne Kernfärbung)
- d) CK19

Abbildung 17 zeigt eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung von OATP3A1 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) im Ovarialkarzinomgewebe in 20-facher Vergrößerung. Die Kerne sind blau angefärbt. Abbildung 18 zeigt hingegen OATP3A1 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) im Ovarialkarzinomgewebe in 40-fache Vergrößerung.

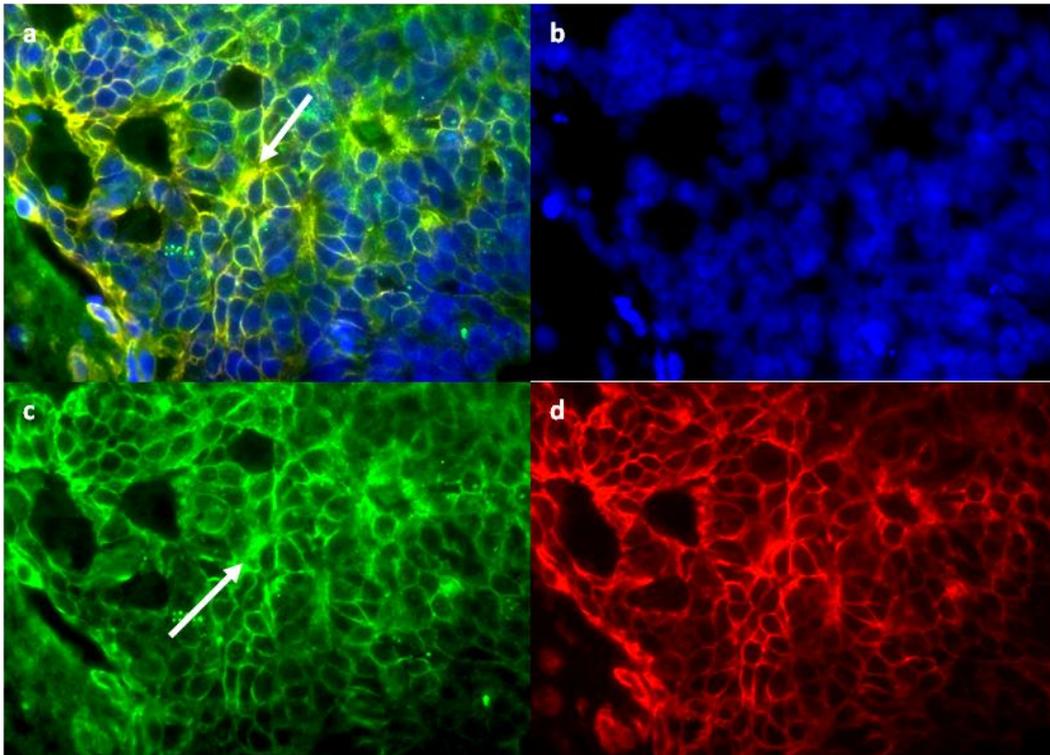


Abb. 18: Nachweis von OATP3A1 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz- Mikroskopie im Ovarialgewebe. Anwendung eines OATP3A1 Ziegen-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers sowie eines CK19 Maus-Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörpers. 40x Vergrößerung

a) Dreifachfärbung: Die Überlagerung von OATP3A1 mit CK19 (Pfeil) ergibt eine gelb bis orange Färbung. Auch die blaue Kernfärbung ist sichtbar.

b) OATP3A1

c) OATP3A1 und CK19 (ohne Kernfärbung)

d) CK19

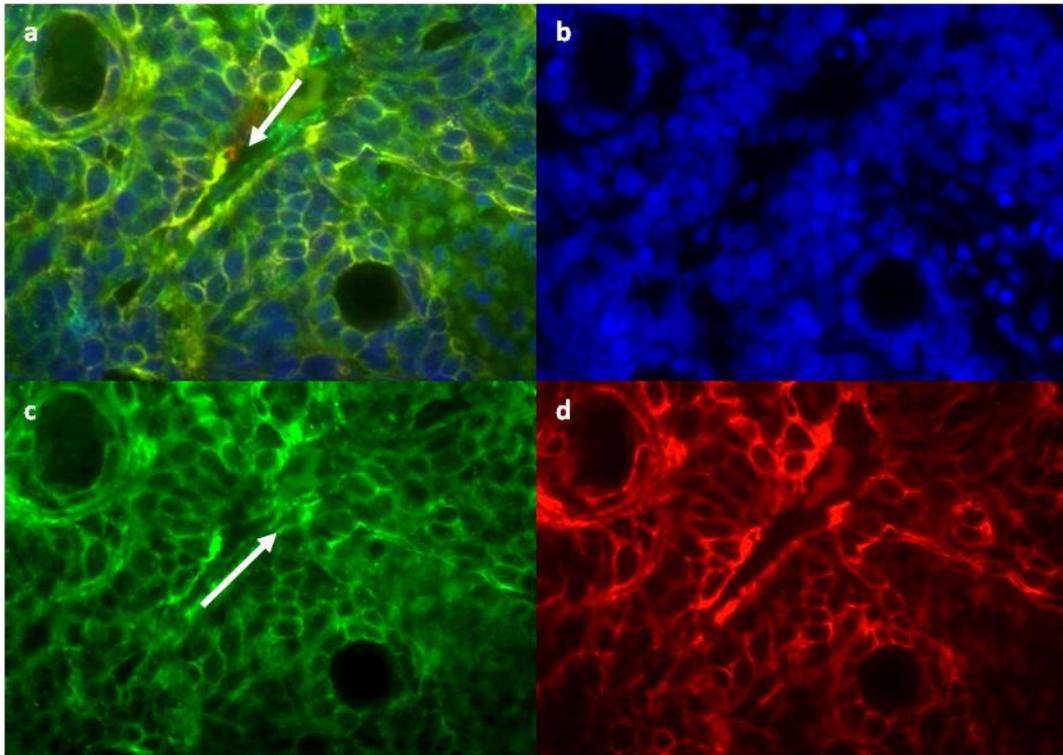


Abb. 19: Nachweis von OATP3A1 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz im Ovarialkarzinomgewebe. Anwendung eines OATP3A1 Ziegen-Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Zweitantikörpers sowie eines CK19 Maus-Antikörpers und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörpers. 40x Vergrößerung

a) Dreifachfärbung: Die Überlagerung von OATP3A1 mit CK19 (Pfeil) ergibt eine gelb bis orange Färbung. Auch die blaue Kernfärbung ist sichtbar.

b) OATP3A1

c) OATP3A1 und CK19 (ohne Kernfärbung)

d) CK19

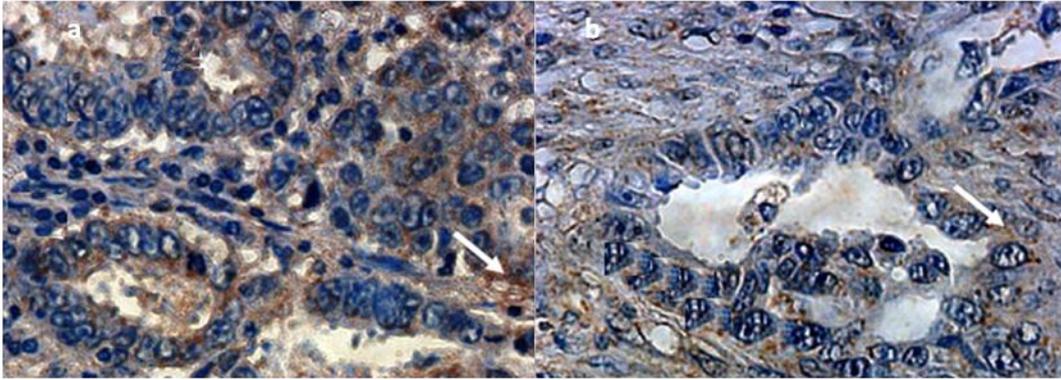


Abb. 20: Nachweis von OATP3A1 mittels Immunhistochemie im Ovarialgewebe. Die Braunfärbung zeigt eine Lokalisation von OATP3A1 in den Tumorzellen mit Grad 2 Ovarialkarzinom an. Die Ovarialkarzinomzellen finden sich in den deutlich sichtbaren Epithelstrukturen (weiße Pfeile). In den umgebenden Bindegewebszellen zeigt die Braunfärbung langgestreckte Fibroblasten, die somit OATP3A1 Zellen besitzen. Die Kerne aller Zellen sind blau gefärbt. Weiße Pfeile: OATP3A1 (braune Färbung) in den Karzinomzellen und Bindegewebszellen. 40x Vergrößerung

a) Immunhistochemie- Färbung: OATP3A1- Braunfärbung in Epithelzellen und dazwischenliegendem Stroma (weiße Pfeile)

b) Immunhistochemie- Färbung: OATP3A1- Braunfärbung mit langgestreckten Fibroblasten (weiße Pfeile)

Die Kerne aller Zellen sind blau gefärbt.

Die Abbildung 20 zeigt relativ gut differenzierte Tumorgewebe mit deutlich sichtbaren Epithelstrukturen und dem dazwischen befindlichen Stroma (a), das eine gute Immunreaktion mit dem Antikörper gegen OATP3A1 aufweist. Die Fibroblasten sind an den langgestreckten Kernen erkennbar (b). OATP3A1 wird in zwei verschiedenen Splice-Varianten exprimiert, wobei die kürzere Variante OATP3A1_v1 (18 Aminosäuren des Carboxylterminus fehlen) primär in Zellen des Testes und Gehirns zu finden ist und die längere Variante OATP3A1_v2 eher ubiquitär exprimiert ist [Huber et al.2007].

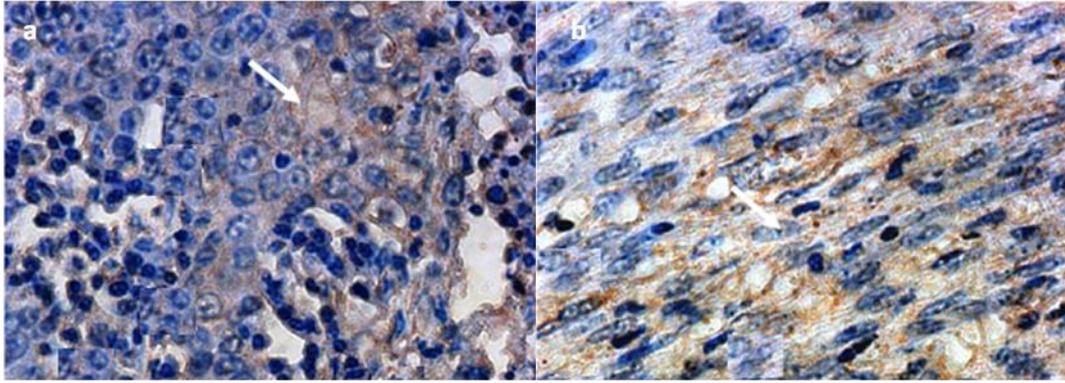


Abb. 21: Nachweis von OATP3A1 (braune Färbung) mittels Immunhistochemie im Ovarialkarzinomgewebe. Die Kerne aller Zellen sind blau gefärbt, wobei kleine runde dunkelblau gefärbte Kerne (a) Immunzellen aufweisen. Weiße Pfeile deuten auf eine Membranfärbung hin. In Bild (b) sind die durch OATP3A1 gefärbten Bindegewebszellen sichtbar. 40x Vergrößerung

- a) Immunhistochemie- Färbung: OATP3A1- Braunfärbung in den Epithelzellen (weiße Pfeile)**
 - b) Immunhistochemie- Färbung: OATP3A1-Braunfärbung in den Stromazellen (weiße Pfeile)**
- Die Kerne sind blau gefärbt.**

In Abbildung 21 ist ein mäßig differenzierter Tumor zu sehen, wobei aber die braune OATP3A1-Färbung in den Epithelzellen (a) und in den Stromazellen (b) deutlich nachweisbar ist. Dies zeigt, dass OATP3A1 in den Ovarialkarzinomen in den epithelialen Tumorzellen und im umgebenden Bindegewebe vorhanden ist. Dabei ist eine zytosolische Färbung vorherrschend und nur in einer geringen Anzahl von Tumorzellen eine Membranfärbung sichtbar.

5. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Diplomarbeit ist die Expression aller 11 humanen OATPs in normaler Leber, in primären Lebertumoren und in Lebermetastasen auf mRNA-Ebene untersucht worden. Beispielsweise werden OATP2A1, OATP3A1 und OATP4A1 die Prostaglandine, Steroide wie Schilddrüsenhormone und Xenobiotika wie Arzneistoffe, transportieren in den untersuchten Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe verstärkt exprimiert. Da sie den Transport verschiedener Substanzen in die Leber bewirken, könnten sie in Zukunft für die Aufnahme von Zytostatika von Bedeutung sein.

Es konnte gezeigt werden, dass neun der elf OATPs in malignen und nicht malignen Leberproben mittels qRT-PCR nachzuweisen waren. Die mRNA Expression von OATP1C1 und OATP6A1 lag unterhalb der Nachweisgrenze in der Mehrzahl der malignen und nicht malignen Leberproben. Das Expressionsmuster aller andern OATPs war aber in den gesunden Gewebeproben und HCC, CCC und MLT Proben unterschiedlich. In den Tumor-Gruppen wiesen OATP2A1, 3A1 und 5A1 eine deutlich höhere Expression in malignen als in nicht-malignen Gewebeproben auf.

Frühere Daten zeigten eine Abnahme der Expression von OATP1B1 und 1B3 bei benignen Hyperplasien und malignen hepatozellulären Läsionen, verglichen mit gesunden Lebergeweben [Cui et al. 2003; Vander Borgh et al. 2005; Vavricka et al. 2004]. Dies konnte in dieser Studie bestätigt werden, da auch hier eine Downregulation dieser Transporter in HCC, CCC und MLT Proben im Vergleich zu den gesunden Geweben beobachtet wurde. Die dabei deutlichste Reduktion der OATP1B1 und 1B3-mRNA-Expression wurde in der CCC- Gruppe beobachtet und könnte zumindest teilweise einen Ersatz von Hepatozyten durch maligne Zellen aus Cholangiozyten und deren Precursor-Zellen widerspiegeln. Die Dedifferenzierung dieser Zellen könnte auch die Downregulation von OATP1A2 erklären, da OATP1A2 ein Transporter ist, der in den Cholangiozyten der gesunden, menschlichen Leber exprimiert wird.

Weiters wurde gezeigt, dass die Expression von OATP2A1, 3A1, 4A1 und 5A1 in den meisten gesunden Leberproben nachweisbar ist. Dies wurde auch in normalen Hepatozyten beobachtet, obwohl die Expression von OATP5A1 sehr variabel zwischen den verschiedenen Patienten ist [Hagenbuch et al. 2008]. Eine hohe interindividuelle Variabilität, die in dieser Studie beobachtet wurde, könnte erklären,

warum die Expression von OATP2A1, 3A1 und 4A1 nicht in allen Studien [Tamai et al. 2000; Hilgendorf et al. 2007; Okabe et al. 2008] beobachtet wurde.

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass eine höhere mRNA- und Proteinexpression von OATP4A1 nur in der MLT-Gruppe vorkommt. Dies spiegelt die Upregulation von OATP4A1 in Proben aus Darmtumoren wider. Daher sind weitere Untersuchungen von OATP4A1 als möglicher diagnostischer Marker für MLTs in Darmtumoren notwendig.

Weiters wurde in dieser Studie die mRNA Expression von OATP3A1 in benignen und malignen Ovarialtumoren untersucht. Prognostisch ist das Ovarialkarzinom das ungünstigste Genitalkarzinom, weil es erst im fortgeschrittenen Stadium (III und IV) diagnostiziert wird [Schmidt- Matthiesen et al. 1995; Gubbles et al. 2010]. In früheren Studien wurde die Expression aller 11 humanen OATPs in benignen und malignen Ovarialkarzinomen durchgeführt [Thalhammer et al. 2010]. Diese zeigten deutlich unterschiedliche mRNA- Werte von OATP3A1, die als FIGO- Stadien II, III, IV (One-way, Anova Test, $P = 0.03$) eingeteilt wurden. Dies veranlasst somit weitere Untersuchungen von OATP3A1, die für die Progression und Chemotherapieresistenz bei Ovarialkarzinomen von Bedeutung sind.

Darauf basierend, war ein weiterer Aspekt dieser Arbeit, die Expression von OATP3A1 auf mRNA-Ebene in benignen und malignen Ovarialtumoren, sowie auf Proteinebene in Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom mittels Immunfluoreszenz und Immunhistochemie zu erforschen. Zunächst wurde die mRNA Expression von OATP3A1 in benignen und malignen Ovarialtumoren verglichen, dabei wurden die malignen Tumore nach FIGO [Schmidt-Matthiesen et al. 1995; Breckwoldt et al. 2001; Kiechle 2007; Huber et al. 2001] in verschiedene Stadien eingeteilt und eine bestimmte Signifikanz ($P < 0,05$) ermittelt. Die Expression von OATP3A1 bei malignen Tumoren von Patientinnen im FIGO-Stadium 2 ($P < 0,005$) und Stadium 3 ($P = 0,023$) und bei gering- bis schlecht differenzierten Tumoren ($P < 0,005$) war signifikant geringer als bei benignen Ovarialtumoren. OATP3A1 scheint für die Tumorzellen im Gegensatz zu den Zellen von benignen Tumoren für das Überleben und das Wachstum nicht mehr von Bedeutung zu sein. Allerdings ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Überlebenszeit der Patientinnen und der Erhöhung der OATP3A1 Expression.

Weiters wurden an ausgewählten Proben Immunfluoreszenz- und Immunhistochemiestudien durchgeführt, um die zelluläre Lokalisation dieses Transporters zu studieren. Es konnte eine Lokalisation von OATP3A1 in Ovarialkarzinomzellen epithelialer Herkunft, die Cytokeratin 19 exprimieren, gezeigt werden. Dies sollte es in weiterer Folge ermöglichen, Transportproteine als Tumormarker für die Diagnose, Prognose und Therapie zu evaluieren.

Eine optimale Konzentration des Primärantikörpers wurde mittels unterschiedlicher Antikörperversdünnungen festgelegt, um so die unspezifischen Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Oberstes Ziel ist es, ein möglichst klares, hintergrundarmes Ergebnis zu erreichen, wobei die gute Morphologie der Ovarialschnitte erhalten bleiben sollte. Verantwortlich für unspezifische Hintergrundfärbungen können sowohl falsche beziehungsweise unzureichende Verdünnungen als auch eine schlechte Vorbehandlung der Schnitte sein. Daher sollte ein gründliches und häufiges Waschen der Paraffinschnitte mit PBS-Tween zur Entfernung von überschüssigem, ungebundenem oder unspezifisch, gebundenem Antikörper erfolgen. Auch bei der Antigendemaskierung oder dem Entparaffinisierungsschritt sollte die Arbeit so durchgeführt werden, dass die spezifische Epitopmarkierung verstärkt und die unspezifische Hintergrundanfärbung vermindert wird. Bei den Doppelimmunfluoreszenzfärbungen trat das Problem auf, dass die Fluoreszenzsignale die von Alexa Fluor 488 herrührten mit dem von Alexa Fluor 568 Signalen überlappte. Durch Einsatz des Farbstoffes Alexa Fluor 647, der das Emmissionsmaximum bei 647 nm hat, konnte eine Überlagerung der Signale vermieden werden. Außerdem wurde durch Anwendung kurzer Belichtungszeiten das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe vermindert.

Um nachzuweisen, dass in den OATP3A1 Tumoren zahlreiche Gefäße eingelagert sind, wurde mit einem Antikörper gegen CK19, der als Marker für Zellen epithelialer Herkunft verwendet wird, gefärbt. Die zytokeratinexprimierenden Zellen in verschiedenen Epithelien wurden rot dargestellt. Bei der Überlappung des roten (CK19) und des grünen Kanals (OATP) kommt es in allen Fällen zu einer Überlagerung der Signale von CK19 und dem Transportprotein OATP3A1. Es kommt insbesondere um den Zellkern herum zu einer starken Überlagerung der beiden Fluorochrome, sodass eine gelb-orangene Mischfarbe, gemäß der additiven Farblehre, entsteht. CK19 stellt daher einen entscheidenden Differenzierungsmarker bezüglich der Epithelien dar. Somit konnten in CK19 positiven Zellen,

Transportproteine nachgewiesen werden. Die Überlagerung von CK19 mit OATP3A1 zeigte eine deutliche Gelbfärbung, was sowohl auf die starke CK19-Anfärbung als auch auf das Vorkommen dieser Transporterproteinklasse in epithelialen Zellen hinweist. Jedoch besteht die Möglichkeit, dass eine Veränderung im CK19-Expressionsmuster infolge eines Ovarialkarzinoms aufgetreten sein könnte. OATP-Expressionssignale konzentrieren sich hauptsächlich im Bereich des Endothels von Gefäßen oder auf epithelialen Zellen, die CK19-Positivität zeigten. In allen untersuchten Proben wurden OATP3A1 nachgewiesen.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass OATP3A1 sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene in den Ovarialkarzinomen epithelialen Ursprungs hoch exprimiert ist. Dieses Transportprotein, das Hormone, Prostaglandine und zahlreiche Medikamente in die Zellen transportiert, könnte auch in diesen Tumoren für die Aufnahme verschiedener Verbindungen wichtig sein und dadurch das Tumorstadium beeinflussen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Leber- und Ovarialkrebs sind maligne Tumore, die eine generell schlechte Prognose was das Überleben der Patienten betrifft, haben. Dies beruht vor allem darauf, dass sie meist erst im fortgeschrittenen Stadium entdeckt werden und dann weitgehend resistent gegenüber jeder Therapie sind.

Für die Therapie spielt neben der operativen Entfernung des Tumors, eine anschließende Chemotherapie mit zytostatischen Medikamenten eine wichtige Rolle. Der Therapieerfolg wird bestimmt von der zytostatisch effektiven Dosis an Medikamenten in den Krebszellen. Dies ist weitgehend davon abhängig, ob entsprechende Transporter, wie Transporter der OATP-Familie, für die Aufnahme der Zytostatika in den Zellen exprimiert werden.

Um dies zu untersuchen, wurde daher mittels Real Time RT-PCR die mRNA Expression aller 11 OATPs in (gepaarten) malignen und nicht malignen Proben von Lebertumoren von 43 Patienten untersucht. Es wurde auch der Vergleich der Expression der OATPs in verschiedenen Arten von Leberkarzinomen (Hepatozelluläres Karzinom, Cholangiozelluläres Karzinom und Lebermetastasen) durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte mRNA Expression von OATP2A1, OATP3A1, OATP4A1 und OATP5A1 in den malignen Tumoren erfolgte. Am höchsten waren die Expressionswerte für OATP4A1 in Kolonkarzinom-Metastasen, was die vermehrte Expression dieses Transporters in Kolonkarzinomen widerspiegelt. Dagegen waren die "Leber-spezifischen" Transporter OATP1B1 und OATP1B3, sowie OATP1A2, OATP2B1 und OATP4C1 in den Lebertumorproben vermindert exprimiert.

Ebenfalls wurde in dieser Studie die mRNA Expression von OATP3A1 bei 191 Ovarialkarzinomproben und 21 Proben von benignen Ovarialtumoren mittels Real-Time RT-PCR untersucht. An ausgewählten Proben wurden Immunfluoreszenz- und Immunhistochemiestudien durchgeführt, um die zelluläre Lokalisation dieses Transporters zu studieren. Es konnte eine Lokalisation von OATP3A1 in Ovarialkarzinomzellen epithelialer Herkunft, die Cytokeratin 19 exprimieren, gezeigt werden. Weiters zeigte es sich, dass die Expression von OATP3A1 bei malignen Tumoren von Patientinnen im FIGO-Stadium 2 ($P < 0,005$) und Stadium 3 ($P = 0,023$)

und bei gering- bis schlecht differenzierten Tumoren ($P < 0,005$) signifikant geringer als bei benignen Ovarialtumoren war. OATP3A1 scheint für die Tumorzellen im Gegensatz zu den Zellen von benignen Tumoren für das Überleben und das Wachstum nicht mehr von Bedeutung zu sein. Allerdings ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Überlebenszeit der Patientinnen und der Erhöhung der OATP3A1 Expression.

Das differenzierte Bild das die Expression der einzelnen OATPs in malignen und nicht-malignen Geweben von der Leber und vom Ovar zeigt, zeigt dass einige dieser Transporter für die Versorgung der Tumorzellen mit endogenen Verbindungen (Hormonen, Nährstoffen) wichtig sein könnten. Sie würden daher das Tumorstadium beeinflussen. Damit stellen die gewonnenen Erkenntnisse die Grundlage für weitere Forschungsarbeiten über die Rolle der OATPs in der Tumorbio- und -therapie bei Leber- und Ovarialkrebs dar.

7. SUMMARY

Liver and ovarian cancers are malignant tumors, which have a generally poor prognosis of survival. This is mainly due to the fact that they are usually detected at an advanced stage and then are largely resistant compared with each therapy.

For the therapy, in addition to the surgical removal of the tumor, subsequent chemotherapy with cytostatic drugs plays an important role. Whether such a therapy success is achieved, also depends on the concentration of the cytostatic drugs in cancer cells. This is largely dependent on appropriate transporters, such as transporters of the OATP family, which are expressed for the inclusion of cytostatics in the cells. To investigate this, mRNA levels of the eleven OATPs in paired (cancerous and adjacent non-cancerous) specimens from 43 patients with hepatocellular and cholangiocellular carcinoma (HCC, CCC) being primary liver cancers and liver metastases from colon tumors (MLT) were determined using Real-time RT-PCR analysis.

In malignant liver samples the results show, an upregulation in OATP2A1, OATP3A1, and OATP4A1 OATP5A1 and a downregulation in the "liver-specific" OATP1B1 and OATP1B3 and OATP1A2, OATP2B1 and OATP4C1. OATP4A1 had the highest expression levels for colon carcinoma metastases; this is reflecting the increased expression of this transporter in colon carcinomas.

Also in this study the mRNA expression level of OATP3A1 from 191 cancerous and 21 adjacent non-cancerous ovarian specimens was determined using Real-time RT-PCR analysis. To study the cellular localization of this transporter, immunofluorescence and immunohistochemistry were performed on selected samples. It was shown a localization of OATP3A1 in ovarian cancer cells of epithelial origin, like cytokeratin 19. Furthermore, it was found that the expression of OATP3A1 in malignant tumors of women with FIGO stage 2 ($P < 0.005$) and stage 3 ($P = 0.023$) and at low-to poorly differentiated tumors ($P < 0.005$) was significantly lower than in benign ovarian tumors. The survival and growth of tumor cells in contrast to the cells of benign tumors seem not to be dependend on OATP3A1. However, no significant correlation was found between the survival time of patients and an increase in the expression of OATP3A1.

The differentiated picture of the expression of individual OATPs in malignant and non-malignant tissues in liver and ovary shows, that some of these transporters could be important for the supply of tumor cells with endogenous compounds (hormones, nutrients). So they would affect the tumor growth. Therefore, the insights provide the basis for further research into the role of OATPs in tumor biology and therapy of liver and ovarian cancer.

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Die menschliche Leber. nach Menche 2004: Biologie, Anatomie und Physiologie; Elsevier, Urban & Fischer; 5. Auflage p. 302

Abb. 2: Querschnitt durch das Ovar. nach Thews et al. 1999: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen; 5. Auflage p. 148

Abb. 3: Berechnetes topologisches Modell des humanen OATP1B1. 12-Transmembrandomäne und konservierte Aminosäuren. nach Hagenbuch und Meier 2008 Jul; 38 (7-8): p. 780-82.

Abb. 4: Der phylogenetische Baum der OATP Gen Superfamilie. nach Hagenbuch and Gui 2008 Jul; 38 (7-8): p. 779.

Abb. 5: Herstellung von cDNA durch Behandlung von mRNA mit reverser Transkriptase. <http://www.labor-gaertner.de>, Apr 2011

Abb. 6: Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der Real-time-PCR und TaqMan-Sonden. http://de.wikipedia.org/wiki/Real_time_quantitative_PCR, Apr 2011

Abb. 7: Phasen der PCR Amplifikation: Exponential, Linear und Plateau Phase. <http://www.rt-pcr.com>, Apr 2011

Abb. 8: Die Clusteranalyse zeigt zwei Heat maps, die die mRNA Expression der 11 humanen OATPs von ausgewählten Patienten in nicht- malignen (N) und malignen (T) Lebergeweben (n=22) und Kolongeweben (n=20) an.

Abb. 9: Veränderung des Expressionsmusters aller 11 humanen OATPs in Gruppen von Lebertumoren (Hepatozelluläre Karzinome (HCC, n=11), Cholangiozelluläre Karzinome (CCC, n=9) und Lebertumormetastasen (MLT, n=23)).

Abb. 10: Vergleich der OATP3A1 mRNA Expression in benignen und malignen Ovarialtumoren.

Abb. 11: Vergleich der OATP3A1 mRNA Expression in benignen und malignen Ovarialtumoren.

Abb. 12: Vergleich der OATP3A1 mRNA Expression in benignen und malignen Ovarialtumoren.

Abb. 13: Vergleich der OATP3A1 mRNA Expression in benignen und malignen Ovarialtumoren.

Abb. 14: Expression von OATP3A1 mRNA im Verhältnis zur Zeit des progressionsfreien Überlebens (PFS) in Monaten bei Patientinnen im Alter von <55 (n=78) und >55 Jahre (n=115).

Abb. 15: Expression von OATP3A1 mRNA im Verhältnis zur Zeit des gesamten Überlebens (OS) in Monaten bei Patientinnen im Alter von <55 (n=79) und >55 Jahre (n=115).

Abb. 16: Expression von OATP3A1 mRNA bei Patientinnen in Abhängigkeit von Tumormarker CA 125.

Abb. 17: Nachweis von OATP3A1 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz- Mikroskopie im Ovarialkarzinomgewebe.

Abb. 18: Nachweis von OATP3A1 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz- Mikroskopie im Ovarialkarzinomgewebe.

Abb. 19: Nachweis von OATP3A1 (grüne Färbung) und CK19 (rote Färbung) mittels Doppelimmunfluoreszenz- Mikroskopie im Ovarialkarzinomgewebe.

Abb. 20: Nachweis von OATP3A1 mittels Immunhistochemie im Ovarialgewebe.

Abb. 21: Nachweis von OATP3A1 (braune Färbung) mittels Immunhistochemie im Ovarialkarzinomgewebe.

„Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.“

9. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: TNM-Klassifikation. nach Böcker et al. 2008; Leber und intrahepatische Gallenwege in Pathologie. 4. Auflage, Elsevier, Urban & Fischer: p. 814.

Tab. 2: FIGO-Stadieneinteilung für das Ovarialkarzinom. nach Schmidt-Matthiesen et al. 1995; Breckwoldt et al. 2001; Kiechle 2007; Huber et al. 2001; p. 91-104.

Tab. 3: Zellverteilung und chromosomale Lokalisation humaner OATPs. nach Kalliokoski et al. 2009 Oct;158(3): p. 694.09

Tab. 4: Substrate ausgewählter OATPs. nach Hagenbuch and Meier, Biochemie Biophysik Acta. 2003 Jan 10;1609(1): p. 10.

Tab. 5: Patientencharakteristik- Gesunde und Maligne Leberproben

Tab.6: Herstellung der cDNA von malignen (T) und nicht malignen (N) Patientenproben

Tab.7: Zusammenstellung- Mastermix Reverse Transkription 20µl/Reaktion. <http://www.appliedbiosystems.com>, Apr 2011

Tab. 8: Amplifikationsprogramm. <http://www.appliedbiosystems.com>, Apr 2011

Tab. 9: Gene Expression Assays für Real- Time PCR Analysen. <http://www.appliedbiosystems.com>, Apr 2011

Tab. 10: Zusammenstellung- Mastermix Real- Time PCR 10µl/ Reaktion. <http://www.appliedbiosystems.com>, Apr 2011

Tab. 11: Patientencharakteristik- Gesunde und Maligne Ovarialproben

Tab. 12: Herstellung der cDNA aus benignen Ovarialproben

Tab. 13: Puromycinbehandelte- Untersuchungsreihen

Tab. 14: Reverse Transkription

Tab.15: Lineare Regressionsanalyse zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen dem progressionsfreien Überleben (PFS) und der OATP3A1 mRNA Expression bei Patientinnen <55 und > 55 Jahren.

Tab.16: Lineare Regressionsanalyse zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen dem gesamten Überleben (OS) und der OATP3A1 mRNA Expression bei Patientinnen <55 und > 55 Jahren.

Tab.17: Lineare Regressionsanalyse zur Ermittlung des Zusammenhangs zwischen dem Biomarker CA 125 und der OATP3A1 mRNA Expression bei Patientinnen <55 und > 55 Jahren.

10. LITERATURVERZEICHNIS

- Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S, Yawo H (1999) Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *Journal of Biology and Chemistry* 274:17159-17163
- Abe T, Unno M, Onogawa T, Tokui T, Kondo TN, Nakagomi R, Adachi H, Fujiwara K, Okabe M, Suzuki T, Nunoki K, Sato E, Kakyo M, Nishio T, Sugita J, Asano N, Tanemoto M, Seki M, Date F, Ono K, Kondo Y, Shiiba K, Suzuki M, Ohtani H, Shimosegawa T, Iinuma, Nagura H, Ito S, Matsuno S (2001) LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology* 120:1689-1699
- Ancona N, Maglietta R, Piepoli A, D'Addabbo A, Cotugno R, Savino M, Liuni S, Carella M, Pesole G, Perri F (2006) On the statistical assessment of classifiers using DNA microarray data. *BMC Bioinformatics* 7:387.
- Arias A, Baker N. E., Ingham P. W. (1988): Role of segment polarity genes in the definition and maintenance of cell states in the *Drosophila* embryo. *Development* 103, 157-170.
- Auersperg N., Wong Ast., Choi K., Kang Sk., Leung Pck. (2001), Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology and Pathology, *Endocrine Reviews* April 22 (2): 255
- Baltzer, J. Mickan, H. Gynäkologie – Ein kurzgefasstes Lehrbuch (Begründet von Günther Kern) 5.neubearbeitete und erweiterte Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 1994, 679-691
- Benninghoff, Drenckhanhn (2003), Anatomie, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 1, 17.Auflage, München 2004, S. 416. ISBN 3-437-42350-9
- Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H. Leber und intrahepatische Gallenwege, in Pathologie. 4. Auflage, 2008, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München: p. 814.
- Breckwoldt M., Kaufmann M., Pfeleiderer A. (2001), Gynäkologie und Geburtshilfe, 5.Auflage, Urban und Fischer, München 2000, ISBN 3-437-22210-4, S. 245-246.

- Breitenecker G, Reinthaller, A., Kainz, Ch., Kohlberger, P.K., Tempfer, C., Gitsch, G., Kölbl, H., (1995) CD44-Splice-Varianten als Prognosefaktoren beim invasiven Zervixkarzinom, Gynakol Geburtshilfliche Rundsch. 1995;35(1):16-9.
- Bruix J, Calvet J, Costa J, (1989): Prevalence of antibody to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. Lancet 2:1004-1006.
- Bruix J, Boix L, Sala M, Llovet J (2004): Focus on hepatocellular carcinoma. Cancer Cell 5:215-219.
- Bruix J, Sherman M (2005): Management of hepatocellular carcinoma. Hepatology 42:1208-1236.
- Bustin SA et al (2009): "The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments." Clin Chem. 2009 Apr;55(4):611-22.
- Bühling K.J., Friedman W. (2009), Intensivkurs: Gynäkologie und Geburtshilfe 2. Auflage, Springer Verlag, p. 357-364
- Chiang D, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, LeBlanc AC, Donovan DJ, Thung SN, Solé M, Tovar V, Alsinet C, Ramos AH, Barretina J, Roayaie S, Schwartz M, Waxman S, Bruix J, Mazzaferro V, Ligon AH, Najfeld V, Friedman SL, Sellers WR, Meyerson M, Llovet JM (2008): Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. Research 68:6779-6788.
- Cui Y, König J, Nies AT, Pfannschmidt M, Hergt M, Franke WW, Alt W, Moll R, Keppler D (2003) Detection of the human organic anion transporters SLC21A6 (OATP2) and SLC21A8 (OATP8) in liver and hepatocellular carcinoma. Laboratory Investigation 83(4):527-538.
- Dancygier H, Nagell W. (2003) nach Klinische Hepatologie, Grundlagen, Diagnostik und Therapie, Springer Verlag, p. 220
- Denk H, Dienes H.P. und Düllmann J: Pathologie der Leber und Gallenwege Springer, Berlin (1999), p. 52
- Denoix PF (1946): Enquete permanent dans les centres anticancereaux, Bull Inst Nat Hyg 1946, Vol. 1, pp. 70-75.
- Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GA, Zumla A. (2005): The implications of using an inappropriate reference gene for real time PCR, Anal Biochem. 2005 Sep 1;344(1):141-3.
- Dixon K (2003): Liver Cancer Treatment. <http://www.livercancertreatment.org/>(2010)

- Dobson PD, Kell DB (2008) Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 7, No. 3, pp. 205-220.
- Duraisamy S, Ramasamy S, Kharbanda S, Kufe D (2006). "Distinct evolution of the human carcinoma-associated transmembrane mucins, MUC1, MUC4 AND MUC16". *Gene* 373: 28–34.
- Fardel O, Le Vée M. Regulation of human hepatic drug transporter expression by pro-inflammatory cytokines. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2009; 5:1469-81.
- Gao B, Hagenbuch B, Kullak-Ublick GA, Benke D, Aguzzi A, Meier PJ (2000) Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood–brain barrier. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy* 294:73-79.
- Gao B, Huber RD, Wenzel A, Vavricka SR, Ismail MG, Reme C, Meier PJ (2005) Localization of organic anion transporting polypeptides in the rat and human ciliary body epithelium. *Experimental Eye Research* 80(1):61-72.
- Gilks CB, Prat J. Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances. *Hum Pathol.* 2009 Sep;40(9):1213-23.
- Gubbles J.A., Claussen N., Kapur A.K., Connor J.P. , Patankar M.S. (2010), The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer, *Journal Ovarian Res.* 2010 Mar 29;3:8.
- Hagenbuch B, Meier PJ (2003) The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1609(1):1-18.
- Hagenbuch B, Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: Phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Archives* 447(5):653-665.
- Hagenbuch B, Gui C (2008) Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica* 38(7-8):778-801
- Hänggi E, Grundschober AF, Leuthold S, Meier PJ, St-Pierre MV (2006) Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1. *Molecular Pharmacology* 70(3):806-817.
- Hartmann, M., Pabst, M.A., Shmied, R., Caluba, H.-C., Dohr, G., *Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie: Licht- und elektronenmikroskopischer Bildatlas*, Facultas, Wien, 2009, p.87-90

- Hiddemann W., Huber H., Bartaram C. (2004), Die Onkologie, Teil 2: Epidemiologie, Pathogenese, Grundprinzipien der Therapie. Solide Tumoren, Lymphome, Leukämien, Springer Verlag ISBN: 3540797246, p. 1750
- Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell AL, Karlsson J. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(8):1333-1340.
- Holm S (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. In: *Scandinavian Journal of Statistics*. Vol. 6, S. 65–70
- Holzappel Bianca, Wickert Lucia (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit*. Band 37, Nr. 2, S. 120-126.
- Hricak H, Husband J, Panicek DM, (2007) *Bildgebung in der Onkologie: Diagnostik und Bewertung – Das Wesentliche für das Konsil Elsevier, München, (2009) p. 304 EAN: 9783437230455 (ISBN: 343723045X)*
- Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang W-P, Kirchgessner TG (1999) A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). *Journal of Biology and Chemistry* 274:37161-37168
- Huang Y (2007) Pharmacogenetics/genomics of membrane transporters in cancer chemotherapy, *Cancer Metastasis Rev* 2007, Vol. 26, No. 1, pp. 183-201.
- Huber RD, Gao B, Sidler Pfandler MA, Zhang-Fu W, Leuthold S, Hagenbuch B, Folkers G, Meier PJ, Stieger B (2007) Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain. *American Journal of Physiology* 292(2):C795-C806.
- Huber J.C., Kubista E., Leodolter S. (2001), *Lehrbuch der Frauenheilkunde, Gynäkologie*. Verlag Wilhelm Maudrich, 2001: 97-100
- Ishak KG, Anthony PP, Sobin LH (1994) *Histological Typing of Tumours of the Liver*, 2nd edition, Springer-Verlag, Berlin, pp. 11-13.
- Ishak KG, Anthony PP, Sobin LH (1994): *Histological Typing of Tumours of the Liver*, 2nd edition, Springer-Verlag, Berlin, pp. 17.
- Ishak KG, Goodman ZD, Stocker JT (1999): *Atlas of Tumor Pathology, Tumors of the Liver and Intrahepatic Bile Ducts*, Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, pp. 199-200.
- Ishak KG, Goodman ZD, Stocker JT (1999): *Atlas of Tumor Pathology, Tumors of the Liver and Intrahepatic Bile Ducts*, Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, pp. 245.

- Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ (1994) Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 91(1):133-137.
- Jung D, Hagenbuch B, Gresh L, Pontoglio M, Meier PJ, Kullak-Ublick GA (2001) Characterization of the human OATP-C (SLC21A6) gene promoter and regulation of liver-specific OATP genes by hepatocyte nuclear factor 1 alpha. Journal of Biology and Chemistry 276:37206-37214
- Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. British Journal Pharmacology 2009; 158:693-705.
- Kanai N, Lu R, Satriano AJ, Bao Y, Wolkoff AW, Schuster VL (1995) Identification and characterization of a prostaglandin transporter. Science 268(5212):866-9.
- Kiechle M. (2007), Gynäkologie und Geburtshilfe 1. Auflage, Verlag Elsevier Urban & Fischer, München/Jenapp.155-166
- Kim RB. Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition. Eur J Clin Invest 2003;33(S2):1-5.
- Kinlen L. Infections and immune factors in cancer: the role of epidemiology, Journal Cancer Res Clinical Oncology 2004 Aug 23;23(38):6341-8
- König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D (2000) A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. American Journal of Physiol 278:G156-G164
- König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D (2000a) Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. Journal of Biology and Chemistry 275:23161-23168.
- König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D (2000b) A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. American Journal of Physiology 278:G156-G164.
- Kounnis Valentinos, Elli Ioachim, Martin Svoboda, Andreas Tzakos, Ioannis Sainis, Theresia Thalhammer, Georg Steiner, and Evangelos Briasoulis (2011). Expression of organic anion-transporting polypeptides 1B3, 1B1, and 1A2 in human pancreatic cancer reveals a new class of potential therapeutic targets. Onco Targets Ther. 2011 Apr 8;4:27-32
- Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Schteingart CD, Hofmann AF, Wolkoff AW, Meier PJ (1995) Molecular and functional characterization of an organic anion

- transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* 109:1274-1282
- Kullak-Ublick GA, Glasa J, Boker C, Oswald M, Grutzner U, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ, Beuers U, Kramer W, Wess G, Paumgartner G (1997) Chlorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 113(4):1295-1305.
- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B (2001) Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 120:525-533
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ (2000) Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis.* 2000;20(3):273-92.
- Lacroix, M (2006). "Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells". *Endocrine-Related Cancer* 13 (4): 1033–1067.
- Lee SY, Williamson B, Caballero OL, Chen YT, Scanlan MJ, Ritter G, Jongeneel CV, Simpson AJ, Old LJ (2004) Identification of the gonad-specific anion transporter SLCO6A1 as a cancer/testis (CT) antigen expressed in human lung cancer. *Cancer and Immunology* 4:13.
- Lee TK, Koh AS, Cui Z, Pierce RH, Ballatori N (2003) N-glycosylation controls functional activity of Oatp1, an organic anion transporter. *American Journal of Physiology and Gastrointestinal Liver Physiology* 285(2):G371-G381.
- Le Vee M, Jouan E, Moreau A, Fardel O. (2010): Regulation of drug transporter mRNA expression by interferon-gamma in primary human hepatocytes. *Fundam Clin Pharmacol.* 2011 Feb;25(1):99-103. doi: 10.1111/j.1472-8206.2010.00822x.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methods. 2001 Dec;25(4):402-8.
- Löffler und Petrides (2003): nach *Biochemie und Pathobiochemie*, 7. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2003, ISBN 3-540-42295-1
- Lu R, Kanai N, Bao Y, Schuster VL (1996) Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA (HPGT). *Journal of Clinical Investigation* 98(5):1142-1149
- Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B, Stieger B (1997) Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* 26, 1667-1677.

- Meier PJ, Stieger B (2002) Bile salt transporters. *Annual Reviews of Physiology* 64:635-661
- Miki Y, Suzuki T, Kitada K, Yabuki N, Shibuya R, Moriya T, Ishida T, Ohuchi N, Blumberg B, Sasano H (2006) Expression of the steroid and xenobiotic receptor and its possible target gene, organic anion transporting polypeptide-A, in human breast carcinoma. *Cancer Research* 66(1):535-542.
- Mikkaichi T, Suzuki T, Onogawa T, Tanemoto M, Mizutamari H, Okada M, Chaki T, Masuda S, Tokui T, Eto N, Eto N, Abe M, Satoh F, Unno M, Hishinuma T, Inui K, Ito S, Goto J, Abe T (2004) Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101(10):3569-3574.
- Monks NR, Liu S, Xu Y, Yu H, Bendelow AS, Moscow JA (2007) Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells. *Molecular Cancer Therapy* 6(2):587-598.
- Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, Dantona F, Terranova A, Castagnetta LA (2002): Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann. NY Acad. Sci.* 963:13-20.
- Muto M, Onogawa T, Suzuki T, Ishida T, Rikiyama T, Katayose Y, Ohuchi N, Sasano H, Abe T, Unno M (2007) Human liver-specific organic anion transporter-2 is a potent prognostic factor for human breast carcinoma. *Cancer Science* 98(10):1570-1576.
- Nguyen AT, Emelyanov A, Koh V, Spitsbergen J, Lam S, Mathavan S, Parinov S, Gong Z: A high level of liver-specific expression of oncogenic KrasV12 drives robust liver tumorigenesis in transgenic zebrafish, *Dis Model Mechanism* 2011 Nov;4(6):801-13. Epub 2011 Jul 4.
- Nies AT (2007) The role of membrane transporters in drug delivery to brain tumors. *Cancer Letters*, Vol. 254, No. 1, pp. 11-29.
- Noe B, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ (1997) Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 94:10346-10350
- Nozawa T, Suzuki M, Takahashi K, Yabuuchi H, Maeda T, Tsuji A, Tamai I (2004) Involvement of estrone-3-sulfate transporters in proliferation of hormone-

- dependent breast cancer cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy* 311:1032-1037.
- Okabe M, Szakács G, Reimers MA, Suzuki T, Hall MD, Abe T, Weinstein JN, Gottesman MM. Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters. *Molecular Cancer Therapy* 2008; 7(9):3081-3091.
- Pfeifer B, Preiß J, Unger C. Tumorklassifikation, in *Onkologie integrativ: Konventionelle und komplementäre Therapie*. 1. Auflage, 2006, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München: p. 46.
- Pfisterer, J. as *Ovarialkarzinom: Therapeutische Standards – klinische Empfehlungen*, Thieme Verlag Stuttgart New York (2002) p. 13 – 21
- Pfleiderer A, Kommos F., Pfisterer J., Thome M., Geyer H., Sauerbrei W., Pfleiderer A.: Estrogen and progesterone receptors in ovarian neoplasms, 1991; *Gynecol Oncology* 1992 Dec;47(3):317-22.
- Pisani, Nishioka, Bruix, Colombo: Chemoembolization for hepatocellular carcinoma, *Cancer Chemother Pharmacol.* 1990;23 Suppl: p.126-8.
- Pizzagalli F, Hagenbuch B, Stieger B, Klenek U, Folkers G, Meier PJ (2002) Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide (OATP-F) as a high affinity thyroxine transporter. *Molecular Endocrinology* 16:2283-2296
- Pizzagalli F, Varga Z, Huber RD, Folkers G, Meier PJ, St-Pierre MV (2003) Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88(8):3902-3912.
- Sai Y, Tsuji A (2004) Transporter-mediated drug delivery: recent progress and experimental approaches, *Drug Discovery Today*, Vol. 9, No. 16, pp. 712-720.
- Satoh H, Yamashita F, Tsujimoto M, Murakami H, Koyabu N, Ohtani H, Sawada Y (2003) Citrus juices inhibit the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. *Drug Metabolism and Disposition* 33(4):518-523.
- Schmidt-Matthiesen H., Bastert G.(1995) *Diagnostik, nach Therapie und Nachsorge der bösartigen Genitaltumoren und des Mammakarzinoms*, Schattauer Stuttgart New York, pp 105
- Schuster VL (2002) Prostaglandin transport. *Prostaglandins and Other Lipid Mediation* 68-69:633-647

- Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Maltais L, Omary MB, Parry DA, Rogers MA, Wright MW (2006). "New consensus nomenclature for mammalian keratins". *J Cell Biol* 174 (2): 169–74.
- Suzuki T, Onogawa T, Asano N, Mizutamari H, Mikkaichi T, Tanemoto M, Abe M, Satoh F, Unno M, Nunoki K, Suzuki M, Hishinuma T, Goto J, Shimosegawa T, Matsuno S, Ito S, Abe T (2003) Identification and characterization of novel rat and human gonad specific organic anion transporters. *Molecular Endocrinology* 17(7):1203-1215.
- Svoboda Martin (2010) Multidrug Resistance (MDR) in Ovarian Carcinoma Cells: Impact of OATP/SLCO Uptake Transporters on Intracellular Drug Accumulation.
- Svoboda Martin, Dissertation: Novel insights into Xenobiotic Transport by organic anion transporting Polypeptides (OATPs) and OATP Expression in profiling in ovarian carcinoma and other solid tumors. University of Vienna, June 2010
- Svoboda Martin, Wlcek Katrin, Juliane Riha, Susanna Zakaria, Ulrike Olszewski, Zdenek Dvorak, Franz Sellner , Isabella Ellinger, Walter Jäger, Theresia Thalhammer (2011) The analysis of organic anion transporting polypeptide (OATP) mRNA and protein patterns reveals differences between primary and metastatic liver cancer, *Cancer Biology Therapy*, 2011 May 1;11(9):801-11.
- Svoboda M, Wlcek K, Pils D, Hager G, Tong D, Zeillinger R, Jäger W, Thalhammer T. mRNA Expression of SLCO3A1, SLCO6A1, ABCB2, and ABCC2 in Ovarian Carcinoma is associated with Tumor Staging and Patients' Survival. Manuscript in preparation.
- Tamai I, Nezu J, Uchino H, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A (2000) Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 273:251-260.
- Thews G, Mutschler E, Vaupel P, (1999) nach *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Wiss. Verlag-Ges., Stuttgart 2007, ISBN 978-3-8047-2342-9
- Thomas C (1996) nach *Spezielle Pathologie*, ISBN 3-7945-1840-3
- Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF (2007) Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute* 2007, Vol. 99, No. 19, pp. 1441-1454.

- Vander Borght S, Libbrecht L, Blokzijl H, Faber KN, Moshage H, Aerts R, Van Steenberghe W, Jansen PL, Desmet VJ, Roskams TA. Diagnostic and pathogenetic implications of the expression of hepatic transporters in focal lesions occurring in normal liver. *Journal of Pathology* 2005; 207(4):471-482.
- 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 Biology* 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18.
- Vavricka SR, Jung D, Fried M, Grützner U, Meier PJ, Kullak-Ublick GA. The human organic anion transporting polypeptide 8 (OATP1B3) gene is transcriptionally repressed by hepatocyte nuclear factor 3beta in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004; 40(2):212-218
- Vogelstein B, Kinzler KW: Cancer genes and the pathways they control, *Clinical Cancer Research* 2004 Jan 1;10(1 Pt 2):396S-40
- Walters HC, Craddock AL, Fusegawa H, Willingham MC, Dawson PA (2000) Expression, transport properties, and chromosomal location of organic anion transporter subtype 3. *American Journal of Physiology* 279:G1188-G1200
- Wallwiener D, Meyer A, Wagner U, Huober J. Ovarialkarzinom. In: Hiddemann W, Huber H, Bertram C (Hrsg.). *Die Onkologie Teil 2* (p.1057-1071). Berlin Heidelberg: Springer 2004
- Welsch, U., Sobotta Lehrbuch Histologie, Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie, 2.Auflage, Urban & Fischer Verlag, München-Jena, 2006, p.448-456
- Wlcek K, Svoboda M, Thalhammer T, Sellner F, Krupitza G, Jaeger W. Altered expression of organic anion transporter polypeptide (OATP) genes in human breast carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2008 Sep;7(9):1450-5.
- Yin BW, Lloyd KO (2001). "Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16". *Journal Biological Chemistry* 276 (29): 27371–5.
- Yin BW, Dnistrian A, Lloyd KO (2002). "Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene". *International Journal Cancer* 98 (5): 737–40.

11. CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name: **Susanna Zakaria**
Geburtsdatum: 10.05.1986
Staatsangehörigkeit: Österreich
Familienstand: Ledig
Bekenntnis: Koptisch orthodox
Fremdsprachen: Arabisch, Englisch, Französisch
Computerkenntnisse: Microsoft Office, Excell

Ausbildung

Volksschule: 1992- 1996
Wirtschaftskundliches
Realgymnasium: 1996- 2004, Wien 1020 Sperlgymnasium
Reifeprüfung: Juni 2004
Werdegang: Seit 2005 Studium der Genetik- Mikrobiologie an
der Universität Wien

Wissenschaftliche Arbeit: 2010/11 Diplomarbeit am Institut für Pathophysiologie
und Allergieforschung zum Thema „Proteins of the
Family of “Organic Anion Transporters (OATP)” and
their Potential Role in Liver and Ovarian Cancer
Therapy “

Berufserfahrung

Zeitraum: 07/2003 bis 09/2003

Tätigkeitsbereich: Marktforschung

Name und Adresse des Arbeitgebers: Telebiz, 1160 Wien

Zeitraum: 01/2006 bis 12/2007

Tätigkeitsbereich: Finanzierungsplanung

Name und Adresse des Arbeitgebers: Santander Bank, 1130 Wien

Zeitraum: 09/2010 bis 04/2011

Tätigkeitsbereich: Update einer Wissenschaftlichen Arbeit: "The analysis of organic anion transporting polypeptide (OATP) mRNA and protein patterns reveals differences between primary and metastatic liver cancer" im Rahmen eines vom Wiss. Fonds des Bürgermeisters der Stadt Wien geförderten Projektes (Projektleiterin Dr. Veronika Buxhofer-Ausch)

Name und Adresse des Arbeitgebers: Dr. Veronika Buxhofer-Ausch, Interne Medizin, SMZ Ost, 1220 Wien