



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Expression von OATP4A1 im kolorektalen Karzinom:
Bedeutung des Transporters in Bindegewebs- und
Immunzellen“

verfasst von

Simone Zotter

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Walter Jäger

Danksagung

Die vorliegende Diplomarbeit ist im Wintersemester 2012 am Department für klinische Pharmazie und Diagnostik in Kollaboration mit dem Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung der medizinischen Universität Wien entstanden.

Die Fertigstellung meiner Diplomarbeit möchte ich zum Anlass nehmen, Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Walter Jäger, Dr. Veronika Buxhofer-Ausch und dem Med.-Wiss. Fonds des Bürgermeisters der Stadt Wien zu danken, mir die Mitwirkung als Teil dieses spannenden Forschungsgebietes ermöglicht zu haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Ao. Univ.-Prof. Dr. Theresia Thalhammer vom Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung am Allgemeinen Krankenhaus Wien für die stete und umfangreiche Unterstützung, die verständnisvolle und hilfsbereite Art und die großartige Betreuung.

Nicht weniger gilt mein Dank meinen lieben Arbeitskollegen, welche Unsicherheiten meinerseits beim experimentellen Teil meiner Arbeit mit großer Hilfsbereitschaft entgegengetreten sind und mit denen ich eine harmonische und unvergessliche Zeit verbringen durfte.

Herzlichster Dank gebührt Lukas Hoffelner, der mir in allen Lebenslagen tatkräftig zur Seite steht, sowie meinen Eltern, die mir nicht nur das Studium durch finanzielle Unterstützung ermöglicht haben, sondern mich auch moralisch immer unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben.

INHALTSVERZEICHNIS

ABSTRACT	1
1. EINLEITUNG	5
1.1 Das kolorektale Karzinom.....	5
1.1.1 Epidemiologie.....	5
1.1.2 Symptome.....	7
1.1.3 Diagnostik.....	7
1.1.4 Ätiologie und Pathogenese.....	8
1.1.4.1 Adenom-Karzinom-Sequenz.....	9
1.1.4.2 Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)	11
1.1.4.3 Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom.....	12
1.1.5 Klassifikation.....	13
1.1.6 Morphologie	16
1.1.7 Immunologische Umgebung beim kolorektalen Karzinom	16
1.1.7.1 Cytotoxisches T-Lymphozyten Antigen (CTLA-4).....	17
1.1.7.2 Tumor-infiltrierende Lymphozyten	18
1.1.7.2.1 Prognostische Aussagekraft der TILs.....	18
1.1.8 Metastasierung.....	19
1.1.8.1 Lebermetastasen beim kolorektalen Karzinom	20
1.1.8.1.1 Histologische Wachstumsmuster als Prognosefaktoren	22
1.1.9 Therapie des kolorektalen Karzinoms	24
1.1.9.1 Chirurgische Therapie	24
1.1.9.2 Adjuvante und palliative onkologische Therapie	24
1.1.9.2.1 5-Fluoruracil (5-FU)	24
1.1.9.2.2 Oxaliplatin	25
1.1.9.2.3 Irinotecan	26
1.1.9.2.4 Panitumomab.....	27
1.1.9.2.5 Vorteile der adjuvanten Chemotherapie.....	28
1.1.9.2.6 Immunologische Effekte bei Chemotherapie	29
1.2 Divertikel.....	30
1.2.1 Ätiologie und Pathogenese der Divertikelkrankheit.....	30
1.2.2 Histologische Inflammationsmuster	31

1.3	Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs)	32
1.3.1	Nomenklatur und Klassifikation	34
1.3.2	Struktur und Aufbau von OATP-Kanälen	35
1.3.3	Funktion und Mechanismus	37
1.3.3.1	Exo- und endogene Substrate der OATPs	38
1.3.4	OATP4A1	39
1.3.5	Regulierung der OATP-Expression	40
1.3.6	Einfluss der OATP-Expression bei Karzinomen	41
1.3.7	OATP und das kolorektale Karzinom	43
1.3.8	OATP-Expression in Immunzellen	43
2.	ZIELSETZUNG	44
3.	MATERIAL UND METHODEN	45
3.1	Patienten	45
3.2	Immunhistochemie	45
3.2.1	Nachweis des OATP4A1 durch Immunfärbung	46
3.2.2	Material	47
3.2.3	Durchführung	47
3.3	Immunofluoreszenz	49
3.3.1	Sudan Black B	50
3.3.2	Material	50
3.3.3	Durchführung einer Immunofluoreszenz-Doppelfärbung	51
3.4	Primär- und Sekundärantikörper	54
3.5	TissueFaxs	55
3.6	Analyse mit HistoQuest 4.0.4.0122	57
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	59
4.1	OATP4A1-Expression in Immunzellen beim kolorektalen Karzinom	59
4.2	Unterschiede der OATP4A1-Expression in den Tumorstadien UICC I, II und III	62
4.3	OATP4A1-Expression bei nicht-maligner Divertikulitis	64
4.4	OATP4A1-Expression in malignem Gewebe im Vergleich zu nicht- malignem Gewebe	66
4.5	Identifizierung der OATP4A1-exprimierenden Immunzellen	69
4.5.1	Nachweis von OATP4A1 auf B-Lymphozyten mittels CD20	69
4.5.2	Nachweis von OATP4A1 in Gefäß-Endothelzellen mittels CD34	72

4.5.3	Nachweis von OATP4A1 auf T-Zellen mittels CD44	74
4.5.4	Nachweis von OATP4A1 auf Leukozyten mittels CD45	75
4.5.5	Nachweis von OATP4A1 auf Makrophagen mittels CD68.....	77
4.5.6	Nachweis von OATP4A1 auf Mastzellen mittels Mastzell-Tryptase	78
5.	ZUSAMMENFASSUNG	80
6.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	83
7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	85
8.	TABELLENVERZEICHNIS.....	87
9.	LITERATURVERZEICHNIS	88
10.	CURRICULUM VITAE	99

ABSTRACT

Deutsch

Organische Anionen transportierende Polypeptide (OATPs) sind Na-unabhängige Transporter für verschiedenste endo- und exogene Substrate. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression, dem therapeutischen Erfolg einer Zytostatikatherapie und der Resistenzentwicklung gegenüber zytostatischen Wirkstoffen, da sie die zelluläre Konzentration von Hormonen, zyklischen Nukleotiden, „Second messenger“ Proteinen und Arzneistoffen regulieren und oft in gesundem und pathologischem Gewebe heterogen verteilt sind. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde der Fokus auf den Transporter OATP4A1 gelegt, welcher eine zentrale Rolle in der Entwicklung und der Chemosensitivität des kolorektalen Karzinoms zu spielen scheint. Es wurde die Expression von OATP4A1 in Immun-, Epithel- und Tumorzellen kolorektaler Karzinome bestimmt und mit dem Vorkommen in nicht-malignen Gewebeproben verglichen. Dafür wurden Gewebeschnitte von 148 Patienten mit kolorektalem Karzinom in den Tumorstadien UICC 1-3 (mit oder ohne Rezidiv innerhalb von 5 Jahren) und Gewebeproben von 8 Patienten mit entzündlicher Divertikulitis analysiert. Die in Paraffin eingebetteten und mit Formaldehyd fixierten Schnitte wurden mit einem Anti-OATP4A1-Antikörper immunhistochemisch geprobt. Für die Identifizierung der OATP4A1-exprimierenden Immunzellen wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit einem Anti-SLCO4A1-Antikörper und mit Antikörpern gegen CD20 (B-Lymphozyten), CD34 (Epithelzellen), CD44 (Leukozyten), CD45 (Lymphozyten), CD68 (Makrophagen) und Mastzelltryptase (Mastzellen) kombiniert. Dabei wurde OATP4A1 in CD20+ B-Zellen und CD45+ Lymphozyten nachgewiesen. Zur quantitativen Bestimmung von OATP4A1 wurde das Image Analyse Programm HistoQUEST an virtuellen Bildern, die im TissueFAXS Mikroskop eingescannt wurden, verwendet. Es zeigte sich, dass die OATP4A1-Expression in Immun- und Tumorzellen signifikant höher als in Stromazellen und gesunden Epithelzellen war. Weiters wurde festgestellt, dass eine erhöhte

Expressionsrate von OATP4A1 in Immunzellen mit einer besseren Prognose korreliert (kein Rezidiv innerhalb von 5 Jahren). Es scheint daher, dass OATP4A1 in Immunzellen zu einer spezifischen Abwehrreaktion gegen den Tumor beitragen kann. Ob dies mit einem veränderten Transport von inflammatorischen Eicosanoiden (Leukotrienen, Prostaglandinen) einhergeht, muss noch untersucht werden. Zusätzlich müsste geklärt werden, ob OATP4A1 einen potentiellen Entzündungsmarker darstellt und als neuer Angriffspunkt für immunstimulierende Wirkstoffe in Frage kommt.

English

Organic anion transporter polypeptides (OATPs) are Na-independent transporters for a variety of endogenous and exogenous substrates. They belong to the *SLC* gene superfamily of transporters. Although OATPs play an important role in tumor progression and therapeutic response by regulating cellular levels of hormones, cyclic nucleotides, second messenger proteins and drugs, not all members, e.g. OATP4A1, are studied thoroughly. To assess a potential prognostic value of OATP4A1 in colorectal cancer development, the expression of this OATP was analysed in colorectal cancer specimen. The results in immune, epithelial and stroma cells in tumor areas were compared with adjacent normal and non-malignant tissue from patients with Diverticulitis. For the analysis samples of 148 patients with colorectal cancer with or without relapse in early stages (UICC I-III) and 8 non-cancer patients with Diverticulitis were provided. Using an anti-SLCO4A1 antibody, immunohistochemistry (IHC) and double-immunofluorescence (IF) microscopy were done on paraffin-embedded tissue sections. For analysing the expression of OATP4A1 in immune cells, double-immunofluorescence staining with antibodies against CD20 (B-cells), CD34 (epithelial cells), CD44 (leucocytes), CD45 (lymphocytes), CD68 (macrophages), and Mast cell tryptase (mast cells) were combined with an anti-SLCO4A1 antibody. Indeed, OATP4A1 was detected in CD20+ B-cells and CD45+ lymphocytes. For quantifying the OATP4A1-levels, the HistoQuest image analysis program was done on virtual images created on the TissueFAXS. The results were correlated with clinical parameters and relapses. Importantly, a significant higher expression of OATP4A1 was seen in immune and tumor cells compared to stroma and non-malignant epithelial cells. Moreover, higher OATP4A1 levels in immune cells were found in patients with better prognosis (no relapse within 5years). This leads to the conclusion that higher OATP4A1 levels in immune cells might lead to a more effective defence against the tumor. Whether it is caused by an altered transport of inflammatory lipid mediators (leukotrienes, prostaglandins) has to be established. In summary, OATP4A1 could be a possible inflammation marker in colon cancer and might be suitable as a target for immunostimulatory drugs.

1. EINLEITUNG

1.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist die dritthäufigste Todesursache bei malignen Erkrankungen in Europa, Nordamerika, Australien und Japan. Die weltweit stark variierende Inzidenz erklärt sich dadurch, dass das Risiko der Entwicklung eines solchen Karzinoms neben genetischen Faktoren auch von verschiedensten Umwelteinflüssen, wie übermäßigem Alkohol- und Fleischkonsum, Rauchen, Übergewicht u. v. m., abhängig ist. Bestärkt wird diese Feststellung durch die Beobachtung, dass Migranten aus Inzidenz-schwachen Ländern sich schnell der Inzidenzrate der neuen Heimat anpassen. Fortschritte in Diagnostik, Therapie und dem Verständnis für die Biologie des Tumors haben jedoch dazu geführt, die Überlebenschancen der betroffenen Patienten zu steigern (Böcker W., 2008; Laubert T., 2010).

Physiologisch gesehen, infiltriert das kolorektale Karzinom als epithelialer Tumor die kolorektale Schleimhaut, die Submukosa oder tiefere Wandschichten des Darms und differenziert im Allgemeinen glandulär (Böcker W., 2008; Laubert T., 2010). Da keine bedeutsamen epidemiologischen Unterschiede zwischen einem Kolonkarzinom und einem Karzinom des Rektums bestehen, werden daher beide gemeinsam behandelt (Zielinski C. und Jakesz R., 1999).

1.1.1 Epidemiologie

Nach Brustkrebs bei Frauen, Prostatakrebs bei Männern und Lungenkrebs gehört das kolorektale Karzinom zu den Krebsarten, welche die meisten Todesfälle zu beklagen hat. Jährlich werden weltweit etwa 800.000 Neuerkrankungen diagnostiziert, von denen etwa 450.000 Patienten an den Folgen der Malignität sterben. Die Inzidenz pro 100.000 Einwohner umfasst 19,4 bei Männern und 15,3 bei Frauen. Auch die Sterberate ist bei Männern um das 1,7 fache höher als bei Frauen. In Europa werden etwa 350.000 Neuerkrankungen pro Jahr gezählt, wobei circa 5000 allein in Österreich gemeldet werden. Der Altersgipfel liegt zwischen

dem 60. und 70. Lebensjahr. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt in Entwicklungsländern an die 30 % und in Industrieländern rund 60 %. In Österreich liegt sie sogar bei etwa 65%. Dies wird durch die bessere Versorgung und vorallem mit der Früherkennung begründet, denn wird der Tumor bereits in einem frühen Stadium erkannt, können die Überlebenschancen nach fünf Jahren auf bis zu 90 % steigen. Auch der Rückgang der Inzidenz und der Mortalität, wie in Abbildung 1 veranschaulicht, lässt sich darauf zurückführen (American Cancer Society, 2007; Boyle P., 2004; Haidinger, 2006; Parkin D.M. et al., 1999; Statistik Austria, 2013).

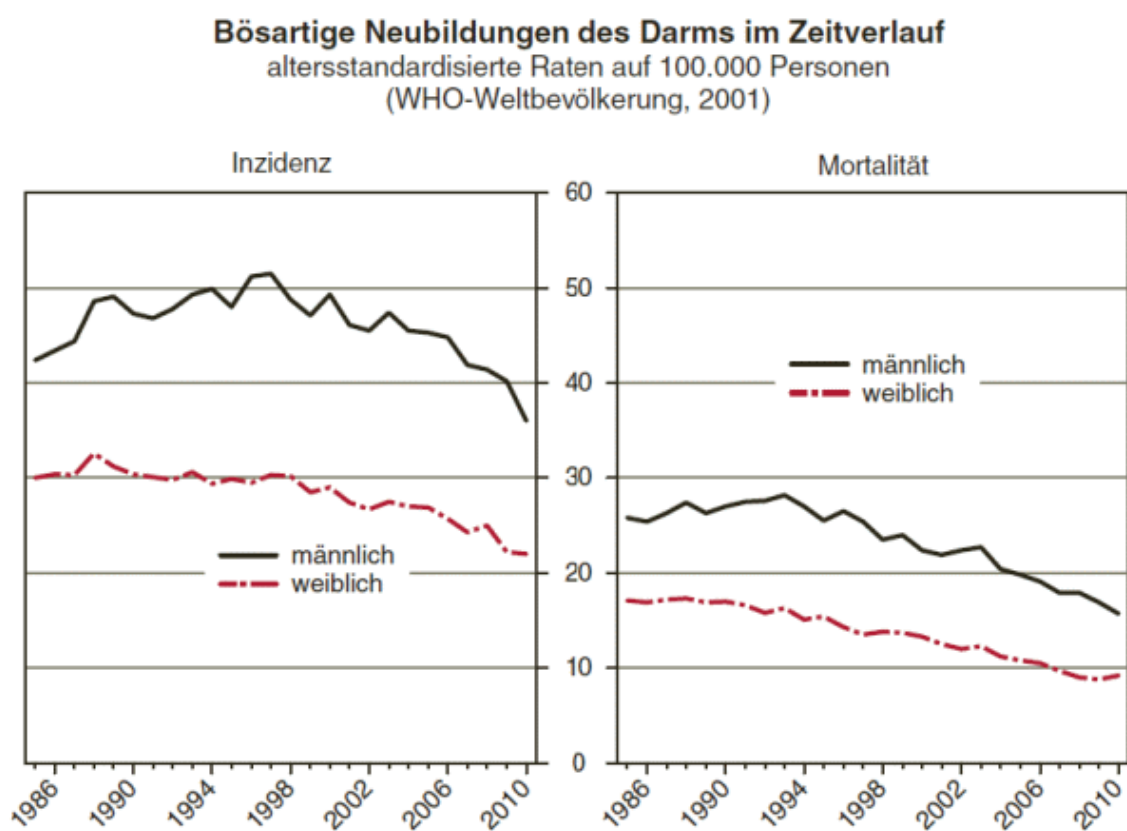


Abbildung 1: Graphik zu Inzidenz und Mortalität des kolorektalen Karzinoms im Zeitverlauf, Österreichisches Krebsregister (Stand: 24.9.2012) und Todesursachenstatistik (Statistik Austria, Stand: 14.6.2013)

1.1.2 Symptome

Symptome machen sich bei der Erkrankung des kolorektalen Karzinoms meist erst in fortgeschrittenem Stadium bemerkbar. Beginnende Symptome sind häufig Müdigkeit, allgemeines Schwächegefühl und Leistungsminderung. Später kommt es zu intestinalen Blutungen, die zu sichtbaren oder auch unbemerkten, okkulten Blutbeimengungen im Stuhl führen. Eisenmangelanämie kann die Folge sein. Des Weiteren beschreiben Patienten Veränderungen der Stuhlgewohnheiten, Diarrhö, Obstipation und Flatulenz. Gewichtsverlust, Ulzerationen, Stenosierungen und Schmerzen im Darm sind bereits Spätsymptome des ausgedehnten Tumors (Böcker W. et al., 2008; Laubert T., 2010; Leischner H., 2007; Wilmanns W. et al., 2000).

1.1.3 Diagnostik

Das Ziel weitläufiger Screeningmethoden ist, die Malignizität in einem frühen Stadium zu erkennen noch bevor das Auftreten klinischer Symptome zu beobachten ist. Ab dem 50. Lebensjahr wird deshalb empfohlen, sich mindestens alle acht Jahre einer Koloskopie, und sich jährlich dem Hämoccult-Test zu unterziehen. Er detektiert fäkales Okkultblut, welches Hinweis auf eine neoplastische Läsion im Kolorektum geben kann. Des Weiteren ist die rektal-digitale Austastung des Rektums sowie die abdominale Palpation durchzuführen, da 30-40% aller gastrointestinalen Tumore tastbar sind. Jedoch lassen sich nur Tumore in bereits fortgeschrittenem Stadium über diese Methode ertasten. Zusätzlich werden durch eine Blutanalyse Tumormarker wie M2-PK (Pyruvatkinase M2), CEA (carcinoembryonic antigen) und CCSA-2 (Colon Cancer specific antigen) bestimmt, die einen Verdacht auf eine maligne Erkrankung untermauern können. Bestätigt sich dieser, ist eine totale Koloskopie mit Biopsie unumgänglich. Ist es bei der Koloskopie in Einzelfällen nicht möglich Einsicht über den gesamten Darm zu bekommen, bedient man sich der Röntgenuntersuchung mit Doppelkontrastmitteleinlauf um auch Zweittumore ausschließen zu können. Bei Bestätigung des Verdachts auf ein kolorektales Karzinom werden zur Ermittlung des Tumorstadiums und eventueller Metastasierung weitere Untersuchungen

durchgeführt: zur Erkennung von Lebermetastasen die Abdomensonographie, von Lungenmetastasen ein Röntgen-Thorax und von Knochenmetastasen eine Skelettszintigraphie. Die Größe und Ausbreitung des Tumors, sowie der Befall der Lymphknoten wird mittels Computertomographie und Magnetresonanztomographie ermittelt (Böcker W. et al., 2008; Laubert T., 2010; Leischner H., 2007; Wilmanns W. et al., 2000).

1.1.4 Ätiologie und Pathogenese

Die meisten kolorektalen Karzinome entstehen sporadisch und zu 90% aus einem Adenom heraus. Nur etwa 10-15% entwickeln sich aufgrund einer genetischen Disposition, wie das hereditäre, nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC oder Lynch-Syndrom) und die familiäre adenomatöse Polyposis Coli (FAP).

Die Risikofaktoren zur Entstehung eines sporadischen kolorektalen Karzinoms sind multifaktoriell. Verschiedenste Umwelteinflüsse werden als potenzielle Faktoren diskutiert. Falsche Essgewohnheiten wie fettreiche Kost, energiereiche Nahrungszufuhr, hoher Fleischkonsum und Übergewicht tragen zur Risikoerhöhung bei. Auch ballaststoffarme Kost, sowie Bewegungsarmut dürfte durch die dadurch induzierte verringerte Darmmotilität und verlangsamte Passage des Nahrungsbreis zu einer verlängerten Einwirkzeit von potenziellen Kanzerogenen auf die Darmwand führen.

Des weiteren sind Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung, wie der Colitis Ulcerosa oder dem Morbus Crohn, stärker gefährdet, besonders wenn die entzündliche Erkrankung bereits in frühen Jahren eintritt und auf einen langen und ausgedehnten Verlauf zurückzublicken ist (Andersen V. et al., 2012; Boeing H., 1991; Böcker W. et al., 2008; Wilmanns W. et al., 2000).

1.1.4.1 Adenom-Karzinom-Sequenz

Die Adenom-Karzinom-Sequenz ist ein Tumorprogressionsmodell, das die Entwicklung vom benignen Adenom zum malignen Karzinom morphologisch und molekulargenetisch kombiniert beschreibt.

Durch Kumulation von Mutationen in den Epithelzellen des Kolorektums entwickeln sich Adenome aus denen nach durchschnittlich 10-15 Jahren ein Karzinom entstehen kann. Diesen Mutationen liegen beim kolorektalen Karzinom grundlegende genetische Fehlbläufe zugrunde:

- a. die mutationsbedingte Aktivierung von Onkogenen wie dem Kirsten rat sarcoma viral Onkogen (K-ras) und die gleichzeitige Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie p53 und dem adenomatösen Polyposis Coli-Protein (APC)
- b. die Mutation von mindestens vier bis fünf Genen
- c. eine Gesamtakkumulation von Mutationen
- d. die Ausübung von biologischen Effekten durch die mutierten Tumorsuppressorgene

Die Abfolge und Kombination der Mutationen kann je nach Tumor stark variieren (Saif M.W., 2010).

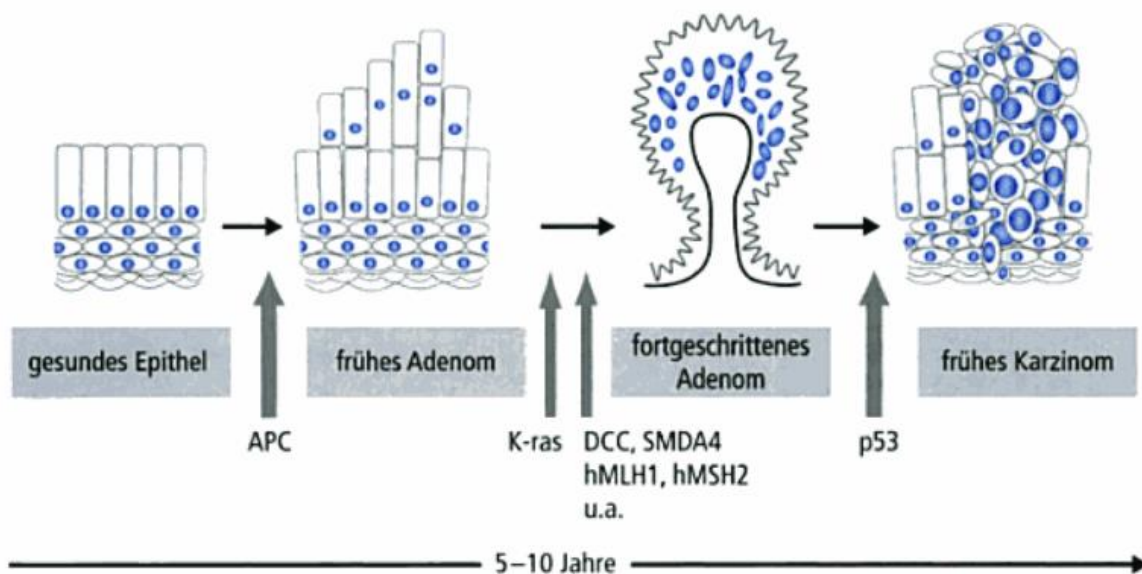


Abbildung 2: Kombination aus den morphologischen und molekulargenetischen Veränderungen vom gesunden Darmepithel bis zum frühen Karzinom (Halle M. et al., 2008)

Das Entartungsrisiko der zunächst gutartigen adenomatösen Polypen ist sehr groß und sie zählen deshalb zu den fakultativen Präkanzerosen beim kolorektalen Karzinom.

Man unterscheidet aufgrund der differenten Erscheinungsform drei Adenomtypen:

1. *Das tubuläre Adenom:* es macht mit 60-65% den größten Anteil aller Adenome aus, hat aber das geringste Entartungsrisiko. Die Basis ist gestielt, selten breit verzweigte Tubuli bilden das Köpfchen.
2. *Das villöse Adenom:* 5-11% der Darmpolypen bilden diese breitbasige und zottenartige Kontur. Sie sind größer als tubuläre Adenome und haben das größte Entartungsrisiko.
3. *Das tubulovillöse Adenom:* 20-26% aller Adenome bilden eine Mischform aus villösem und tubulärem Adenom.

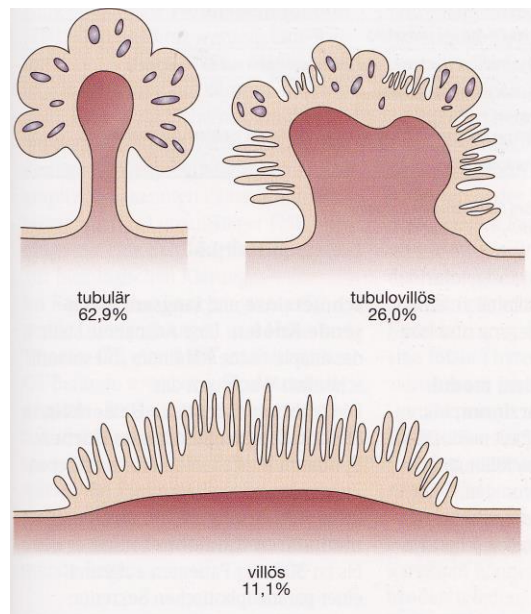


Abbildung 3: schematische Darstellung der drei Adenomtypen: tubuläres, villöses und tubulovillöses Adenom (Böcker W. et al., 2008)

Heute gilt als gesichert, dass aus der Basis eines Adenoms mit den unterschiedlichen Entartungswahrscheinlichkeiten der verschiedenen Formen, ein invasives Karzinom entsteht. Aus diesem Grund sollte die Adenom-Karzinom-Sequenz durch Abtragen des Polyps mittels chirurgisch-endoskopischer Maßnahmen unterbrochen werden (Classen M. et al., 2004; Geißler M. et al., 2005; Halle M. et al., 2008; Nieburgs H. E. et al., 1990; Vogelstein B. et al., 1988).

1.1.4.2 Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)

Die familiäre adenomatöse Polyposis ist gekennzeichnet durch eine Adenomatosis des kolorektalen Darmabschnittes. Es können sich bis zu zehntausend tubuläre bis tubulovillöse Adenome, die in ihrer Größe stark variieren können, über das gesamte Kolorektum verteilen.

Ursache dieser Erkrankung ist eine Keimbahnmutation des auf Chromosom 5q21 befindlichen APC-Gens. Das APC-Protein zählt zu den Tumorsuppressoren und initiiert in proliferierenden Zellen, wie den Darmepithelzellen die Erniedrigung des

Onkoproteins β -Catenin. Auf diesem Wege reguliert es den Expressionslevel von Molekülen, die mit Kolonkarzinomen in Verbindung gebracht werden. Ist dieses Protein nun in der Funktion eingeschränkt oder zur Gänze funktionslos, so kommt es zu unkontrolliertem Wachstum und Wucherung der Epithelzellen. Adenome entstehen bei diesem Gendefekt, der autosomal dominant vererbt wird, in großer Zahl. Bei der FAP wird also die Veranlagung ein kolorektales Karzinom zu entwickeln vererbt, da aus der Vielzahl an Adenomen im Laufe der Zeit Karzinome entstehen. Ist ein Patient familiär vorbelastet und ein molekulargenetischer Test positiv so ist die Therapie der Wahl eine vollständige Kolektomie. Die FAP ist die Ursache für etwa 1% aller kolorektalen Karzinome (Böcker W. et al., 2008; Heinritz W., 2004; Laubert T., 2010; Leischner H., 2007; Wilmanns W. et al., 2000).

1.1.4.3 Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom

Wie die FAP ist auch das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) eine autosomal dominant übertragbare Erbkrankheit, die durch Keimbahnmutation zu einer Prädisposition für kolorektale Karzinome führt. Das HNPCC ist für etwa 1-5% aller kolorektalen Karzinome verantwortlich und tritt bereits ab dem 40. Lebensjahr der Betroffenen gehäuft auf. Zugrunde liegt ein genetischer Defekt auf den Mismatch-repair-Genen hMSH2 und hMLH1. Sind diese fehlgeschaltet kommt es zu Replikationsfehlern und folglich zur Ausbildung von malignen Neoplasien. Diese können neben dem Kolorektum auch das Endometrium, das Ovar, den Magen, den Dünndarm, das Pankreas und die Gallenwege betreffen. Histologisch sind HNPCC induzierte kolorektale Karzinome kaum von sporadischen zu unterscheiden. Um einen klaren Nachweis zu erlangen, bedient man sich hier der Untersuchung des Karzinomgewebes auf Mikrosatelliteninstabilität und der Sequenzierung an Normalgewebe (Böcker W. et al., 2008; Gross M., 1998; Leischner H., 2007; Wilmanns W. et al., 2000).

1.1.5 Klassifikation

Zur Differenzierung der verschiedenen Stadien eines kolorektalen Tumors wird heutzutage weltweit die TNM-Klassifizierung der Union internationale contre le cancer (UICC) verwendet. Durch diese Einteilung kann das Stadium des Primärtumors, der Lymphknoten sowie das Vorhandensein von Metastasen gut erfasst werden. Auch die Beurteilung der Effektivität verschiedener Chemotherapien bei unterschiedlichen Patienten wird dadurch vergleichbar (Sobin L. H., et al., 1997; Wilmanns W. et al., 2000).

T Primärtumor

- T0** kein Anhalt für einen Primärtumor
- Tis** Carcinoma in situ
- T1** Infiltration der Submukosa
- T2** Infiltration der Muskularis propria
- T3** Infiltration der Submukosa bzw. des nicht peritonealisierten perikolischen oder perirektalen Gewebes
- T4** Infiltration direkt in andere Organe/Strukturen oder Tumorperforation des viszerale Peritoneums

N Regionäre Lymphknoten

- N0** keine Metastase in regionären Lymphknoten
- N1** Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
- N2** Metastasen in mehr als 3 regionären Lymphknoten

M Fernmetastasen

- M0** keine Fernmetastasen
- M1** Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation übernommen aus Sobin L. H., et al., 1997; Wilmanns W. et al., 2000)

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium 1	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Stadium 2	T3	N0	M0
	T4	N0	M0
Stadium 3	jedes T	N1	M0
	jedes T	N2	M0
Stadium 4	jedes T	jedes N	M1

Zusätzlich existiert die Stadieneinteilung nach Dukes, die anhand der Tumordinfiltration und des Fortschreitens der Metastasenbildung differenziert (siehe Abbildung 4). Dies ist die ältere Klassifizierung und wird heutzutage seltener verwendet (Leischner H., 2007).

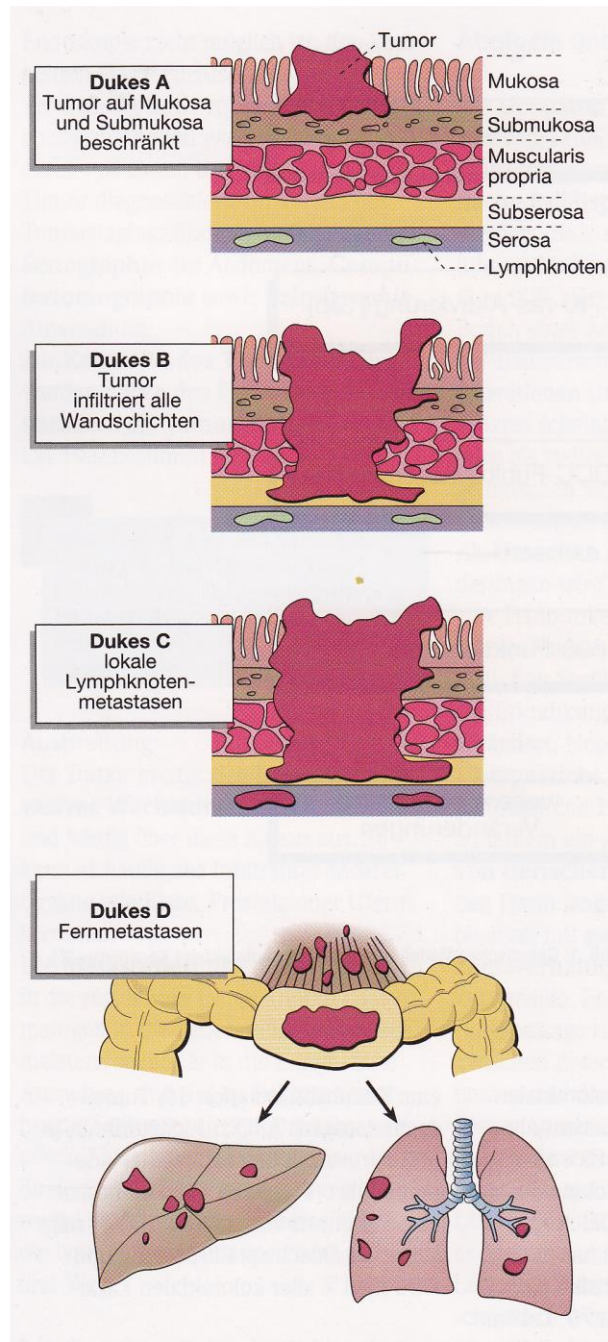


Abbildung 4: schematische Darstellung der Klassifizierung nach Dukes (Leischner H., 2007)

1.1.6 Morphologie

Es gibt bereits viele makroskopische und histologische Unterscheidungsmerkmale, die auf die Malignizität und die Prognose eines kolorektalen Karzinoms schließen lassen. Histologisch unterscheidet man verschiedene Karzinomarten:

- a. Das *Adenokarzinom* (85-90%), bei dem je nach Differenzierungsgrad wiederum vier Untergruppen (G1-G4) entstehen. Den höchsten Differenzierungsgrad weisen hier jene mit der stärksten Drüsenbildung auf. Gut differenzierte Adenokarzinome (G1-G2) haben die geringste Malignizität. Ist eine schwache bis keine Differenzierung (G3-G4) zu erkennen, bedeutet das die höchste Malignizität und die schlechteste Prognose.
- b. Beim *muzinösen Adenokarzinom* (5-10%) ist exrtazellulärer Schleim zu finden.
- c. *Siegelringzellige Adenokarzinome* weisen intrazellulären Schleim auf und werden wie die muzinösen Adenokarzinome mit einem Differenzierungsgrad G3 eingestuft.
- d. Seltene morphologische Formen sind das *adenosquamöse*, das *kleinzellige* und das *Plattenepithel-Karzinom*.

(Böcker W. et al., 2008; Laubert T. et al., 2010; Wilmanns W. et al., 2000)

1.1.7 Immunologische Umgebung beim kolorektalen Karzinom

Die Mehrheit der kolorektalen Karzinome sind Adenokarzinome. Durch Fortschreiten des Wachstums infiltrieren sie nach und nach die einzelnen Schichten der Darmwand. Findet eine Invasion durch die Muscularis mucosa und Submukosa statt, so führen lokale Immunreaktionen zu einer Ansammlung proinflammatorischer Zellen entlang des Tumorrandes. Es bildet sich eine gegen das Karzinom gerichtete immunologische Umgebung (Naito Y., 1998).

Unter normalen Bedingungen geht das Immunsystem sehr effektiv gegen Karzinome vor. Das angeborene Immunsystem vermittelt initial die Antitumor-Aktivität, hauptsächlich mit dem Einsatz von natürlichen Killerzellen und Makrophagen. Zusätzlich wird das adaptive Immunsystem aktiviert. Es ruft eine spezifische Immunantwort hervor, welche B- und T-Zellen bilden lässt (Abbas A.K., 2007).

Das Wachsen eines Karzinoms kann man nun durch das erfolgreiche Umgehen des Tumors vor der Immunantwort des Wirtes erklären. Über hauptsächlich zwei Mechanismen wird diese Immunreaktion übergangen: die Immunoselektion, durch die nicht immunogene Tumorzell-Varianten selektiert werden, oder die Immunosubversion, bei der die Immunantwort aktiv unterdrückt wird (Hanahan D., 2011; Swann J. B., 2007).

Diese Szenarien sind von großem wissenschaftlichem Interesse, da möglicherweise eine starke und effektive Immunreaktion gegen bestimmte Tumor-Antigene ein solches Umgehen verhindern könnte und dies folglich zu einer Ausschaltung der Tumorzellen führen, und die Ausbreitung dieser unter Kontrolle bringen würde (Swann J. B., 2007).

1.1.7.1 Cytotoxisches T-Lymphozyten Antigen (CTLA-4)

Einer der Schlüsselkontrollpunkte in der Immunantwort ist die Erkennung des humanen Leukozytenantigens (HLA) durch T-Zellrezeptoren. In diese komplexe Interaktion sind viele Liganden, wie CD40, ein membrangebundenes Molekül in aktivierten T-Zellen, involviert (de la Cruz-Merino L. et al., 2008). Dieser Ligand ist essentiell bei der Entstehung von T-Zell-induzierten B-Lymphozyten und bei der Aktivierung von den Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), welche die zelluläre Immunreaktion auslösen. Reagiert CD40 mit Rezeptoren auf APCs und B-Zellen so führt dies zu einer erhöhten Regulation von den Oberflächenproteinen CD80 und CD86. Interagieren diese nun mit CD28 auf T-Zellen, so werden diese aktiviert. Zu einer Immuntoleranz oder einer Unempfindlichkeit kommt es dann, wenn sich Antigen-4 mit aktivierten, cytotoxischen T-Lymphozyten (CTLA-4)

verbinden (de la Cruz-Merino L. et al., 2008; Langer L. F. et al., 2007). CTLA-4 ist ein inhibierender Regulator bei der T-Zell-Aktivierung. Die Blockade der Reaktion von CTLA-4 mit dessen Liganden kann daher zu einer Verstärkung der Antigen-spezifischen T-Zellimmunantwort führen und somit zur Verbesserung der Immunität gegen Karzinome (Leach D. R., 1996).

1.1.7.2 Tumor-infiltrierende Lymphozyten

Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs) befinden sich in inflammatorischen Infiltraten in Tumorregionen und im peritumoralen Stroma (de la Cruz-Merino L. et al., 2008). Zu den TILs zählt man cytotoxische T-Lymphozyten (CD8+), natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und T-Helferzellen (CD4+). Zu den T-Helferzellen zählt die Untergruppe der regulatorischen T-Zellen (Tregs), welche die wichtige Rolle der Suppression und Kontrolle des Immunsystems einnehmen, um so vor Reaktionen gegen körpereigene Antigene zu schützen (Nishikawa H., 2010). Bei malignen Neoplasien scheinen sie verstärkt als Immunsuppressoren aufzutreten, dadurch die begünstigende Immunantwort und die Antitumor-Aktivität zu reduzieren und so die immuninitiierte Bekämpfung entarteter Zellen zu verhindern (Vignali D. A. et al., 2008). Die Beziehung zwischen dem CD8/NK-Komplex und den Treg-Zellen in Tumor- und peritumoralem Gewebe könnte erklären, warum sich die Immunantwort im Endeffekt als effektiv gegen den Tumor erweist oder es zu einer immunsuppressiven Reaktion kommt, die zu einer Tumor-Unempfindlichkeit führt (Zou W., 2006).

1.1.7.2.1 Prognostische Aussagekraft der TILs

Bereits seit 1987 ist bekannt, dass Rektalkarzinom-infiltrierende Lymphozyten ein unabhängiger Prognosefaktor für die Überlebensrate sein könnten (Jass J. R. et al., 1987). Durch Quantifizierung von TILs im Tumorstroma und den invasiven Tumorgrenzen wurde festgestellt, dass neben dem histologischen Grad, der TNM-, und der Dukes-Klassifizierung, die Anzahl an TILs eine Vorhersage über die Überlebensrate beim kolorektalen Karzinom zulässt. Zudem wurde eine invasive

Korrelation zwischen der Präsenz von TILs und dem momentanen Tumorstadium bemerkt. Je weiter die Krankheit fortgeschritten war (Dukes C oder D) desto geringer die Anzahl an TILs. Vice versa bei Dukes A und B, bei denen eine signifikant höhere Dichte an TILs beobachtet wurde (Ropponen K. M. et al., 1997).

Die meisten kolorektalen Karzinome sind nur spärlich von Lymphozyten infiltriert. Die höchste Dichte an Lymphozyten und anderen inflammatorischen Zellen, wie neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, findet man an der Tumorgrenze. Die vorherrschenden Lymphozyten sind hier CD4+ oder CD8+ T-Zellen, wobei B-Lymphozyten vorwiegend in Lymphfollikeln vorkommen (Abbas A.K., 2007).

Die individuelle Zusammensetzung an TILs ist entscheidend für den klinischen Verlauf der Krankheit. So wurde bewiesen, dass eine hohe Anzahl an intraepithelialen Lymphozyten, meist CD8+, mit einer höheren Überlebensrate korreliert (Naito Y. et al., 1998; Menon A. G., et al., 2004). Bei der Möglichkeit einer prognostischen Aussage durch die Anzahl der Tregs unterscheiden sich die Resultate der Studien stark. Einerseits wird einer hohen Dichte an Tregs im Tumorgewebe ein besseres Ansprechen auf Chemo- oder Immunochemotherapie bei Patienten in fortgeschrittenem Stadium, und eine höhere Überlebensrate zugeschrieben (Salama P. et al., 2009; Correale P. et al., 2010). Andererseits wurde beobachtet, dass es keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Tregs-Infiltration und einer zuverlässigen Prognose gibt (Sinicrope F. A., 2009; Camus M. et al., 2009). Abhängig sind die Resultate wahrscheinlich von der unterschiedlichen Zusammensetzung der Treg-Populationen und der spezifischen immunologischen Umgebung des Tumors (Ladoire S. et al., 2011).

1.1.8 Metastasierung

Da der Krankheitsverlauf des kolorektalen Karzinoms in den meisten Fällen lange Zeit symptomlos verläuft, sind bei etwa 25% der Patienten bei der Erstdiagnose bereits Metastasen vorhanden.

Anfänglich infiltriert das Karzinom durch invasives Wachstum die Wandschichten des Darms, beginnend mit der Mukosa gefolgt von der Submukosa (Dukes A), der

Muscularis propia, der Subserosa und zuletzt der Serosa (Dukes B). Abhängig von der Lage des Tumors kann es zur Infiltration von benachbarten Organen, wie der Harnblase, dem Uterus, dem Pankreas, der Prostata, kommen. Weiters werden regionäre, sich unter der Serosa befindliche, Lymphknoten und intramurale Lymphgefäße befallen. Lymphknotenmetastasen sind die Folge (Dukes C) (Böcker W. et al., 2008; Leischner H., 2007; Wilmanns W. et al., 2000).

Am Häufigsten sind Metastasen des kolorektalen Karzinoms jedoch in Lunge und Leber vorzufinden. Der Primärtumor verbreitet sich durch hämatogene Metastasierung, welche mit der Intravasation, dem Ausbrechen der Tumorzellen aus dem umgebenen Stroma in die Blutgefäße, seinen Anfang nimmt. Tumorzellen müssen während dieser hämatogenen Verschleppung gegen körpereigene Immunzellen bestehen, um danach durch Extravasation in das Parenchym des Zielorgans emigrieren zu können. Für das Wachstum der Metastase muss eine weitere Umgehung des Immunsystems und ausreichende Blutversorgung ermöglicht werden. Dies ist ein komplexer Prozess, bei dem permanente phenotypische, genetische und transkriptionelle Veränderungen die Basis bilden (Böcker W. et al., 2008; Bird N.C. et al., 2006).

1.1.8.1 Lebermetastasen beim kolorektalen Karzinom

Am Beginn der hepatischen Metastasierungskaskade steht die maligne Entartung von Mucosazellen im Kolon oder Rektum, deren Wachstum und die Loslösung aus der Zell-Zell-Adhäsion aus dem Epithel des Darms. Ab einer gewissen Größe kann der Tumor allein durch Diffusion nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und anderen benötigten Stoffen versorgt werden. Die Ausschüttung verschiedenster Wachstumsfaktoren (z.B.: vascular endothelial growth factor (VEGF), endothelial growth factor (EGF), transforming growth factor- β (TGF- β), etc.) und Enzyme führt zur Vaskularisierung des Tumors. Mit diesem lympho- oder hämatogenen Netzwerk ist der Tumor nun befähigt, sich selbst zu versorgen. Dieser Schritt ist entscheidend für die Entwicklung einer Metastase, da dieses neugewonnene vaskuläre Netz mit der Makrozirkulation in enger Verbindung steht und dadurch den metastasierenden Zellen des Primärtumors den Zutritt in den Kreislauf des

Körpers ermöglicht. Über drei Systeme ist es den Karzinomzellen möglich zu ihrem Metastasierungsorgan, der Leber, zu gelangen (Folkman J., 1984; Gruenberger T. et al., 2008).

- a. *Das Pfortadersystem:* über die Pfortader werden die Tumorzellen hämatogen zur Leber transportiert. Nur wenn sie den Abwehrsystemen der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr standhalten können, ist es ihnen möglich aus dem Kreislauf in das Leberparenchym zu migrieren. Können sie sich auch hier gegen das Immunsystems behaupten, so führt dies letztendlich zur Ausbildung einer Lebermetastase. (Gruenberger T. et al., 2008)
- b. *Das lymphatische System:* Voraussetzung für die Metastasierung über das lymphatische System ist die peritumorale Lymphangiogenese und die Entstehung eines lymphatischen Netzwerkes. Wie auch bei der Angiogenese geschieht dies unter Einfluss verschiedener Zytokine (Schoppmann S. F., 2005; Schoppmann S. F. et al., 2002). Die vom Zellverband des Primärtumors gelösten Zellen können nun in die Lymphgefäße wandern und zum ersten Mal im Sentinellymphknoten metastasieren. Der Weg der Tumorzellen verläuft über die regionären Lymphknoten und die Distanzlymphknoten weiter zum leberassoziierten Drainagegebiet und in die Leber selbst (Gruenberger T. et al., 2008).
- c. *Das Vena-Cava-System:* Hier bewegen sich die Tumorzellen des kolorektalen Karzinoms nach der Invasion in den Lymphsammelstamm, dem Ductus thoracicus, über das venöse System fort. Schließlich gelangen sie über die große untere Hohlvene, die vena cava inferior, in die Leber um dort Metastasen zu bilden (Sugarbaker E. V., 1979; Gruenberger T. et al., 2008).

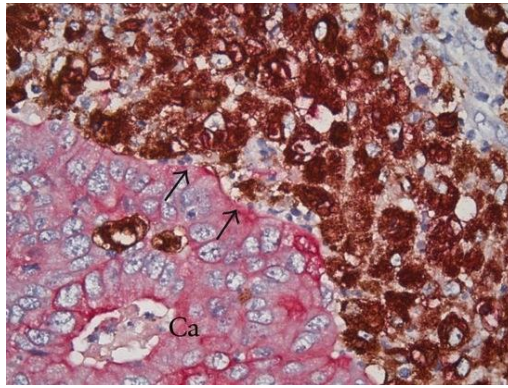
1.1.8.1.1 Histologische Wachstumsmuster als Prognosefaktoren

Es existieren drei verschiedene Wachstumsmuster bei Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms, welche verschiedene angiogenetische Eigenschaften aufweisen.

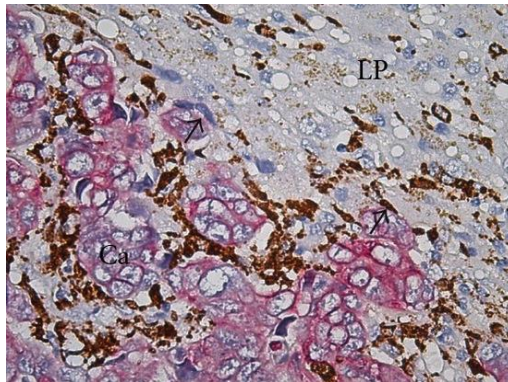
- a. *Desmoplastic pattern*: Die Metastasen sind durch angrenzendes Gewebe, das den direkten Kontakt zwischen Tumorzellen und Hepatozyten verhindert, vom Leberparenchym getrennt.
- b. *Pushing pattern*: Leberzellgruppierungen werden durch den Tumorzellwachstum komprimiert.
- c. *Replacement pattern*: Die Tumorzellen infiltrieren das Leberparenchym, indem sie die Hepatozyten verdrängen.

Lebermetastasen mit *replacement pattern* induzieren keine Hypoxie oder Angiogenese. Die Architektur der Leber wird nur minimal verändert und gestört. Im Gegensatz dazu stehen Metastasen mit *pushing* oder *desmoplastic pattern*, die durch eine erhöhte Expression von Carboanhydrase-9, eine vermehrte Fibrin-Ablagerung am Tumorrand und eine gesteigerte Endothelzell-Proliferation, alles Zeichen einer aktiven, Hypoxie-getriebenen Angiogenese, gekennzeichnet sind (Vermeulen P. B. et al., 2001; Stessels F. et al., 2004).

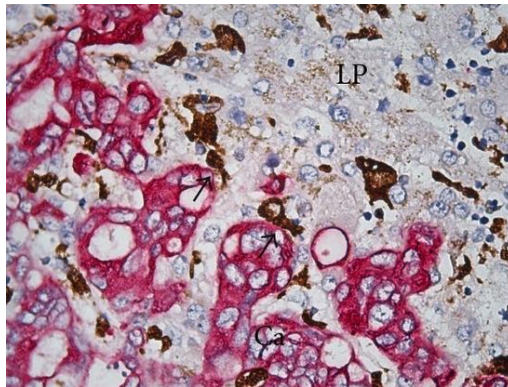
Da Hypoxie und Angiogenese bei den meisten Tumorarten ein Anzeichen für eine aggressivere Verlaufsform, Therapieresistenz und eine schlechte Prognose sind, kann man darauf schließen, dass Unterschiede im histologischen Muster und der Angiogenese auch unterschiedliche Prognosen bedeuten. So scheint ein Tumor mit *pushing pattern* eine schlechtere Prognose über eine 2-Jahres-Überlebenschance zu geben als es bei den anderen zwei Wachstumsmustern der Fall ist (Van den Eynden G. G. et al., 2012).



a



b



c

Abbildung 5: Die drei beobachteten Wachstumsmuster von kolorektalen Lebermetastasen anhand immunohistochemischer Doppelfärbung übernommen von Eefsen R. L. et al. (Immunoreaktivität von Cytokeratin mit Permanent-Red und CD68-gefärbte Makrophagen mit DAB visualisiert; LP: Leberparenchym, Ca: Karzinomzellen): a. *desmoplastic*, b. *pushing* und c. *replacement pattern* (Eefsen R. L. et al., 2012)

1.1.9 Therapie des kolorektalen Karzinoms

1.1.9.1 Chirurgische Therapie

Primäres Ziel nach Diagnosestellung ist die chirurgische Entfernung des kompletten Tumors, welche eine Resektion aller tumortragenden Darmanteile und regionalen Lymphknoten miteinbezieht. Aufgrund der Gefahr der schnellen Ausbreitung und Streuung der Karzinomzellen über den Lymphabfluss, reicht die normal übliche Resektionsgrenze von 2 cm nicht aus und das umliegende Gewebe wird 10 cm über den Tumorrand hinaus entfernt. Demnach hängt der Umfang der Gewebsentfernung hier also nicht nur von der Verbreitung in der Darmwand ab, sondern vielmehr von der möglichen Resektion der Lymphabflussgebiete im Bereich des Dickdarms (Köhne C. H. und Harstrick A., 2001).

1.1.9.2 Adjuvante und palliative onkologische Therapie

Die chirurgische Therapie mit Entfernung des Karzinoms stellt die Basis der Behandlung des kolorektalen Karzinoms dar. Da jedoch ein Großteil der Patienten Gefahr läuft, ein Lokalrezidiv oder eine Metastase zu entwickeln, ist eine Indikation einer adjuvanten Chemotherapie mit oder ohne Kombination einer postoperativen Strahlentherapie oder Immuntherapie gegeben (Zielinski C. und Jakesz R., 1999).

1.1.9.2.1 5-Fluoruracil (5-FU)

5-FU ist ein Pyrimidinanalogon, welches erst nach Aufnahme zu den aktiven Ribosyl- und Desoxyribosylnukleotiden metabolisiert wird. Die zytotoxische Wirkung von 5-FU wird über zwei Wirkungsmechanismen beschrieben.

Zum Ersten hemmt es durch Bindung an das katalytische Zentrum die Methylierungsfunktion der Thymidylatsynthase, was folglich die Synthese von Thymidylatnukleotiden aus Uridin verhindert. Da das gleichzeitige Vorhandensein des Cofaktors N⁵, N¹⁰-Methylenetetrahydrofolat die C-F-Bindung von 5-FU am Enzym festigt, verstärkt es demzufolge auch die Wirkung des Zytostatikums. Aus

diesem Grund wird 5-FU in den meisten Fällen als Kombinationspräparat mit Folsäure an Patienten verabreicht.

Zum Zweiten führt 5-FU nach enzymatischen Umbau durch UMP-Pyrophosphorylase in 5-Fluor-UMP zu einem Falscheinbau in die DNA bzw. RNA und bewirkt infolgedessen eine fehlerhafte Synthese von DNA oder RNA. Das Zellwachstum wird durch beide Mechanismen gehemmt und die zytotoxische Wirkung als Antimetabolit entfaltet (Aktories K. et al., 2009; Zielinski C. und Jakesz R., 1999).

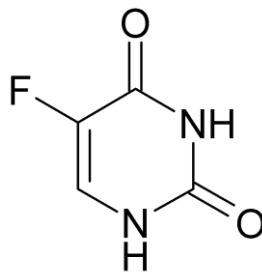


Abbildung 6: Chemische Struktur von 5-Fluoruracil

Die anfängliche Gabe von 5-FU in Kombination mit Folsäure ist sowohl bei der adjuvanten Therapie als auch der palliativen Therapie nach kurativer Operation die erste Wahl. Die Dauer der Therapie erstreckt sich über einen durchschnittlichen Zeitraum von 6 Monaten. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Diarrhö, Übelkeit und Haarverlust, Dermatitis, die Gefahr einer Myelodepression, die Schädigung der Darmschleimhaut mit Stomatitis und Mucositis und das Hand-Fuß-Syndrom (Aktories K. et al., 2009).

1.1.9.2.2 Oxaliplatin

Bei Versagen der Therapie mit 5-FU/Folsäure bringt die Dreifachkombination von 5-FU/Folsäure mit Oxaliplatin (FOLFOX-Schema) bei Patienten in gutem Allgemeinzustand eine deutliche Erhöhung der Lebenserwartung. 1,2-Diaminocyclohexan-Oxalato-Platin gehört nach Cis- und Carboplatin zur dritten

Generation an Platinderivaten und ist ein antineoplastischer und zytostatischer Wirkstoff, dessen Wirkung auf der Interaktion und der Quervernetzung zwischen DNA-Strängen basiert.

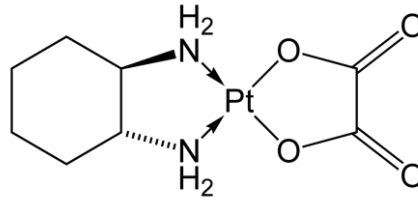


Abbildung 7: Chemische Struktur von Oxaliplatin

Zusätzlich zu den Nebenwirkungen von 5-FU besteht bei der Trippeltherapie die Gefahr der Entwicklung einer transienten peripheren Neuropathie, welche sich durch Parästhesien und Dysästhesien in Armen und Beinen äußert (Aktories K. et al., 2009; Zielinski C. und Jakesz R., 1999).

1.1.9.2.3 Irinotecan

Eine Alternative zur Kombination mit Oxaliplatin bietet eine Dreifachtherapie von 5-FU/Folinsäure mit dem Topoisomerase-I-Inhibitor Irinotecan (FOLFIRI-Schema). Chemisch gesehen, ist Irinotecan ein halbsynthetisches Derivat des natürlichen Alkaloids Camptothecin.

Nach der Aktivierung durch Esterhydrolasen zum aktiven Metaboliten SN-38, stabilisiert Irinotecan den Komplex zwischen dem DNA-Strang und der Topoisomerase I und hemmt auf diesem Weg den Relegationsprozess des DNA-Stranges. Zytotoxisch und irreversibel wirkt dieser Prozess jedoch erst dann, wenn der Topoisomerase-I-DNA-Komplex und die vorgerrückte Replikationsgabel aneinandertreffen und es zu einem Doppelstrangbruch kommt.

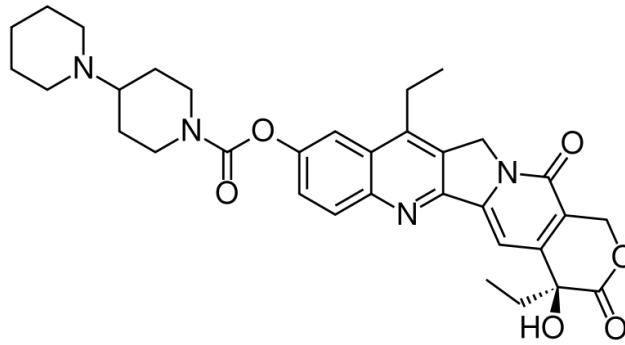


Abbildung 8: Chemische Struktur von Irinotecan

Begleiterscheinungen können bei dieser Therapiewahl das akut-cholinerge-Syndrom, Haarausfall, Diarrhö und Asthenie sein (Aktories K. et al., 2009; Zielinski C. und Jakesz R., 1999).

1.1.9.2.4 Panitumomab

Patienten mit kolorektalem Karzinom entwickeln sehr häufig Resistenzen auf klassische Chemotherapeutika (siehe oben) und können aufgrund dieser Entwicklung bis zu ihrem Tod nur noch palliativ behandelt werden. Aus diesem Grund besteht ein Bedarf an neuen Behandlungsmöglichkeiten um der Resistenzentwicklung entgegenzutreten. Es hat sich herausgestellt, dass monoklonale Antikörper gegen den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Aktivität bei chemorefraktärem Kolonkarzinom zeigen.

EGF ist ein Wachstumsfaktor, der nach Bindung an seinen Rezeptor zu dessen Dimerisierung und damit über eine Signalkaskade zur Signaltransduktion in den Zellkern führt. Folge sind Stimulation des Zellwachstums und Hemmung der Apoptose, weshalb EGF in der Tumorbilogie verschiedenster Tumorarten eine wichtige Rolle spielt. Monoklonale Antikörper, wie Cetuximab und Panitumomab, die sich gegen EGFR richten, sind in der Lage diesen Signalweg zu hemmen und dadurch die Progression zu stoppen. Panitumomab ist im Gegensatz zum chimären monoklonalen Antikörper Cetuximab ein vollständig humaner Antikörper, der keine Fremdproteinanteile mehr enthält und dadurch kaum Immunogenität

aufweist. Dadurch ergeben sich Vorteile im Nebenwirkungsprofil welches am Häufigsten mit schweren entzündlichen Erkrankungen der Haut und des Bindegewebes, Hypomagnesämie und Diarrhoe einhergeht. Im Allgemeinen ist Panitumumab gut verträglich. Eine Phase III Studie konnte zudem zeigen, dass der humane Antikörper eine signifikante Erhöhung der Progressions-freien Überlebenszeit bei Patienten mit chemorefraktärem kolorektalen Karzinom ermöglicht und somit eine neue Behandlungsmöglichkeit bei weit fortgeschrittener Tumorprogression bietet. (Van Cutsem E. et al., 2008; Van Cutsem E. et al., 2007; Oda K. et al., 2005).

1.1.9.2.5 Vorteile der adjuvanten Chemotherapie

Der Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie mit dem Risiko einer beschwerlichen und nebenwirkungsreichen Leidensphase korreliert mit dem Stadium der Krankheit. Wie in der Grafik in Abbildung 9 veranschaulicht, haben Patienten im UICC-Stadium II lediglich eine 3-5% verbesserte Überlebenschance als ohne zusätzliche Therapie. Im Gegensatz dazu, steigt die Chance bei Patienten mit UICC-Stadium III in Behandlung mit Chemotherapeutika auf 15-20%.

In Stadium II sollte bei Vorhandensein von bestimmten klinischen und histopathologischen Risikofaktoren eine adjuvante Therapie mit 5-FU/Folinsäure erfolgen. Eine Kombination mit Irinotecan, Oxaliplatin oder Immuntherapeutika wird aufgrund des erhöhten Nebenwirkungsrisikos und des geringen Nutzens nicht empfohlen. Erst bei Patienten, die sich in UICC-Stadium III befinden oder bereits Metastasen aufweisen, ist eine Kombinationstherapie indiziert und sinnvoll (Messmann H., 2012).

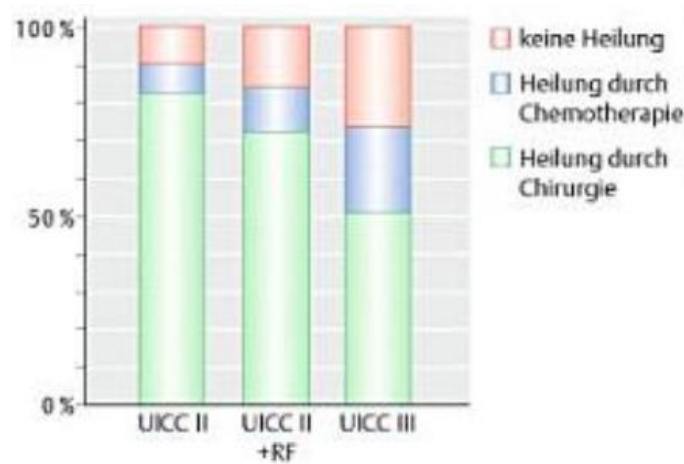


Abbildung 9: Darstellung des Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie, rot: Rezidivrisiko, grün: durch chirurgische Maßnahmen geheilte Patienten, blau: durch adjuvante Chemotherapie geheilte Patienten (Messmann H., 2012)

1.1.9.2.6 Immunologische Effekte bei Chemotherapie

Eine Chemotherapie zeigt Einfluss auf das angrenzende Stroma und die Tumorumgebung im Allgemeinen. Cytostatika zerstören Tumorzellen indem sie eine Art immunogene Apoptose induzieren, ein Prozess der durch die Aktivierung von Kaspasen geleitet wird. Diese Art von Zerstörung könnte die Erkennung von Tumorzellen für das Immunsystem verbessern und fördern (Apetoh L. et al., 2007; Obeid A. et al., 2007; Zitvogel L. et al., 2008).

Lange Zeit dachte man, dass der Apoptose, dem programmierten Zelltod, keine immunogenen Abläufe zugrunde liegen. Nun scheint es aber so, dass Apoptose ein heterogener Prozess ist, bei dem es unter bestimmten Umständen zu immunologischen Effekten kommen kann (Gasser S., 2005; Lake R. A., 2005; Lake R. A., 2006).

1.2 Divertikel

Laut Definition geht ein Divertikel mit einer Ausstülpung der gesamten Wandschichten des betroffenen Hohlorgans einher. Bei Divertikeln im Dickdarm ist in den meisten Fällen jedoch nur die Mukosa ausgestülpt. Aus diesem Grund bezeichnet man Divertikeln im Dickdarm korrekt als Pseudodivertikel, da es sich hier vielmehr um Hernien der Schleimhaut und vorgeformte Muskellücken handelt. Wie beim kolorektalen Karzinom ist die Entwicklung von Divertikeln im Dickdarm besonders in der westlichen Welt eine häufige Krankheitserscheinung. Dieser geographische Unterschied liegt hier wie beim Kolonkarzinom an exogenen Noxen, wie u.a. ballaststoffarmem Essen, Adipositas, zu geringer körperlicher Aktivität und vermehrtem Alkohol- und Zigarettenkonsum (Köhler L. et al., 1999; Kruis W., 2010; Schumpelick V., 2001).

Etwa zwei Drittel der Erkrankten sind zwar Träger von Pseudodivertikel, zeigen aber keinerlei Symptome. Man spricht hier von einer Divertikulose. Leiden Patienten mit Divertikeln an Beschwerden und klassischen Symptomen wie u. a. Obstipation oder Diarrhö, Emesis, Nausea und linksseitigen Bauchschmerzen, so wird dies als Divertikelkrankheit und im Falle einer kombinierten Entzündung als Divertikulitis bezeichnet (Kruis W., 2010).

1.2.1 Ätiologie und Pathogenese der Divertikelkrankheit

Als Ursachen der Divertikelbildung werden vorallem Motilitätsstörungen des Darms und Drucksteigerung genannt. Dafür spricht die in der Divertikelgegend meist verdickte und strukturell beeinträchtigte Muskulatur sowie das gehäufte Auftreten der Divertikel im engsten Abschnitt des Dickdarms, dem Sigma (Schumpelick V., 2001). Des Weiteren haben das Lebensalter, aufgrund der Veränderung der Morphologie und Funktion der Darmwand, genetische Faktoren und Veränderungen in Bindegewebe und Muskulatur der Darmwand einen Einfluss auf die Entstehung von Divertikel (Kruis W., 2010). Zudem wird der Ernährung eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Divertikulitis zugesprochen. Ballaststoffarme Kost scheint eine Veränderung der Mikroflora im Darm zu induzieren. Die gesunde Darmflora wird reduziert und zeitgleich pathogene

Bakterien vermehrt (Finegold S. M. et al., 1974; Floch M. H. und Fuchs H. M., 1978; Tomkins A. M. et al., 1981). Durch den Abbau von Ballaststoffen kann die intestinale Mikroflora verändert, die Immunantwort verringert werden und die bakterielle Produktion von kurzkettigen Fettsäuren abnehmen. So kann eine ballaststoffarme Ernährung eine chronische Inflammation und eine Proliferation der Epithelzellen in und um das Divertikel zur Folge haben. Der Grad der Inflammation hängt von der Schwere der Erkrankung ab (Murini S., 2005; Tursi A., 2006; Floch M. H., 2006; White J. A., 2006; Bogardus S. T. Jr., 2007; Floch M. H., Tursi A., 2007; Tursi A., 2008). Verläuft die Divertikelerkrankung schwer und/oder persistierend kann die Inflammation zu fokalen Nekrosen und letztendlich zur Mikro- oder Makro-Perforation führen. Auch die immunologische Toleranz zu symbiotischen Bakterien wird vermindert und es kann zu einer bakteriellen Überwucherung kommen. Dieses Phänomen ist eng mit der Kolon-Ischämie, der Divertikelinflammation und der verstärkten Belastung von intraluminalen Toxinen und Antigenen verbunden (Ludeman L., 2002; Peppercorn M. A., 2004).

1.2.2 Histologische Inflammationsmuster

Histologisch weisen Divertikel und die interdivertikuläre Mukosa ein besonderes Muster auf. Am Anfang einer Divertikulose sind an den Divertikelspitzen lymphatische Hyperplasien zu erkennen. Im weiteren Verlauf ist zusätzlich die Schleimhaut lymphozytär stark infiltriert. Bei Patienten, die bereits an einer symptomatischen Divertikulose oder einer Divertikulitis leiden, ist die Lymphozytendichte nochmals erhöht und die Schleimhaut mit neutrophilen Infiltraten durchzogen (Tursi A., Brabimarte G. et al., 2008). Diese Tatsachen stützen die Annahme, dass die Divertikelkrankheit eine Art chronisch-entzündliche Darmkrankheit darstellt, jedoch differentialdiagnostisch klar von den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn abzugrenzen ist (Kruis W., 2010).

1.3 Organic Anion Transporting Polypeptides (OATPs)

1994 wurden erstmals OATPs aus der Leber von Ratten identifiziert und isoliert (Jacquemin et al., 1994). OATPs sind Natrium-unabhängige Transportproteine, die auf Epithelzellen in den unterschiedlichsten Geweben von Säugetieren exprimiert werden. Sie gehören der SLCO-Familie (Solute Carrier Organic Anion Transporter-Family) an, welche sich wiederum zur SLC-Superfamilie (Solute Carrier Class-Superfamily) zählt. Humane OATPs sind in Großbuchstaben gekennzeichnet, wobei Oatps anderer Spezies durch Kleinbuchstaben zu erkennen sind (Hagenbuch B. und Meier P. J., 2004). Die Mehrheit der OATPs ist multispezifisch und vermittelt einen Natrium-unabhängigen, aber pH-abhängigen Transport von amphipathischen organischen Anionen, neutralen Stoffen und vereinzelt auch von Kationen. Klassische OATP/Oatp-Substrate sind größer als 450 Dalton und inkludieren eine große Bandbreite an organischen Soluten, wie Gallensalze, organische Farbstoffe, Steroid-Konjugate, Thyroidhormone, anionische Oligopeptide, Toxine, eine Vielzahl an Wirkstoffen und andere xenobiotische Verbindungen.

Von den in Datenbanken enthaltenen 160 verschiedenen OATPs in mindestens 25 Tierspezies wurden bisher elf funktionell und experimentell charakterisiert (Hagenbuch B. und Meier P.J., 2003; König et al., 2006). Diese sind sechs Familien zugeordnet, von denen OATP1 mit ihren Subgruppen, OATP1A, OATP1B und OATP1C, die am besten charakterisierte und größte Familie bildet. OATP1A2 ist ein multispezifischer Transporter, der in mehreren Geweben wie in den Cholangiozyten der Leber, dem Gehirn, der Bürstensaummembran des distalen Nephrons und der apicalen Enterozytenmembran des Dünndarm exprimiert wird (Kullack-Ublick G. A. et al., 1995; Lee W. et al., 2005; Glaeser H. et al., 2007). OATP1B1 and OATP1B3 sind als "Leber-spezifische" Transporter bekannt, da sie bei Gesunden einzig in der basolateralen Membran der Hepatozyten zu finden sind. Sie scheinen eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von amphipathischen exogenen als auch endogenen Verbindungen und bei der hepatischen Clearance zu spielen, indem sie verschiedenste Albumin-gebundene oder ungebundene Moleküle vom Pfortaderblut in die Leberzellen transferieren (Abe T. et al., 1999, 2001; Hsiang B. et al., 1999; König J. et al., 2000a, 2000b). OATP1C1 besitzt

große Affinität zu Thyroidhormonen und ist in der Blut-Hirn-Schranke, den Testes und dem Ziliarkörper-Epithel stark exprimiert (Pizzagalli F. et al., 2002; Gao B. et al., 2005).

OATP2A1 und OATP2B1 gehören der zweiten Gruppe, der OATP2-Familie an. Der OATP2A1 ist ein ubiquitär verteilter Eicosanoid-Transporter, der keine klassischen OATP-Substrate, wie Östron-3-Sulfat oder Bromosulfophthalein (BSP), transportiert und deshalb auch bekannt ist als der Prostaglandin-Carrier. Er scheint bei der Regulation pericellulärer Prostaglandinspiegel involviert zu sein (Schuster V. L., 1998, 2002). Der ebenfalls ubiquitäre OATP2B1 besitzt bei einem pH von 7,4 eine limitierte Substratspezifität, da er in diesem physiologischen Milieu bloß Östron-3-Sulfat, BSP und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) transportiert. Als in neueren Studien die Versuche jedoch in saurem Milieu durchgeführt wurden, konnte das Spezifitätsspektrum auf zahlreiche zusätzliche Substrate, wie Taurocholat, Statine und Glumide, erweitert werden (Nagase T. et al., 1998; Nozawa T. et al., 2004a; Satoh H. et al., 2005). OATP3A1 ist das einzige Mitglied der OATP3-Familie. Seine physiologische Funktion ist noch unklar und seine Substratspezifität beschränkt sich derzeit auf Schilddrüsenhormone, Prostaglandine und einige Oligopeptide (Adachi H. et al., 2003; Huber R. D. et al., 2007). OATP4A1 ist ubiquitär verteilt und scheint für den Thyroidhormontransport wichtig zu sein. OATP4C1 gehört wie OATP4A1 der OATP4-Familie an und ist ein Nieren-spezifischer Carrier mit Substratspezifität auf Digoxin, Oubain, Triiodthyronin, Thyroxin, Methotrexat, zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Sitagliptin (Fujiwara K. et al., 2001; Mikkaichi T. et al., 2004; Hagenbuch B., 2007). Der OATP5-Familie ist OATP5A1 zugehörig, von dem heute lediglich die Sequenz bekannt ist. Auch die Familie der OATP6 hat nur ein einziges Mitglied, den OATP6A1, dessen Vorkommen in Lungen- und Ösophagus-Karzinomen bekannt ist, aber dessen Funktion bis jetzt noch nicht erforscht wurde (Suzuki T. et al., 2003; Hagenbuch B. und Gui C., 2008).

1.3.1 Nomenklatur und Klassifikation

Da die klassische SLC21 Gen-Klassifikation keine eindeutige und Spezies-unabhängige Identifikation aller Gene und Genprodukte zugelassen hat und oft gleiche Namen für unterschiedliche Genprodukte verwendet wurden, kam es 2004 zur Einführung einer neuen Spezies-unabhängigen Klassifikation und Nomenklatur, welche dem Cytochrom-P450-System sehr ähnlich ist.

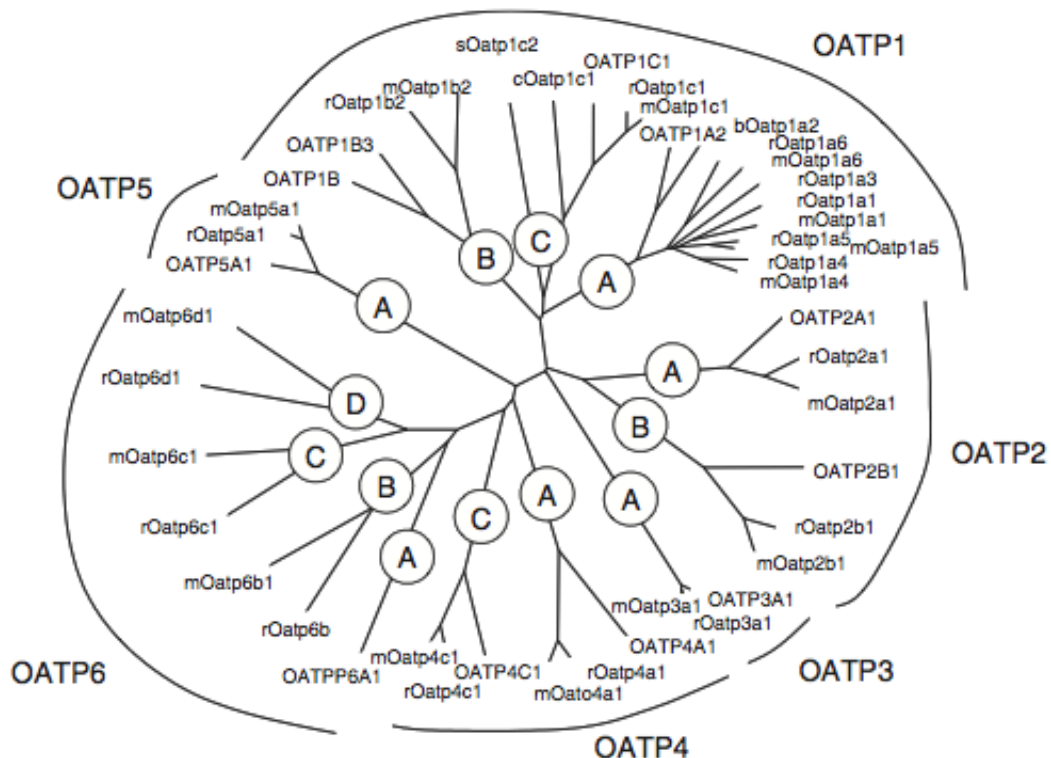


Abbildung 10: Phylogenetische Klassifikation und Nomenklatur der OATP/SLCO-Superfamilie; b: Rind, c: Huhn, m: Maus, r: Ratte, s: Rochen (Hagenbuch B. und Meier P. J., 2004)

OATPs/Oatps werden nach dem aktuellen Nomenklatorsystem, basierend auf der Homologie der Aminosäuresequenz, Oatp/SLCO Superfamilien zugeordnet. Unter Berücksichtigung der phylogenetischen Beziehung und chronologischen Identifikation werden die Superfamilien weiters in Familien ($\geq 40\%$ Aminosäuresequenz-Übereinstimmung) und Subfamilien ($\geq 60\%$ Aminosäuresequenz-Übereinstimmung) unterteilt. Die Zugehörigkeit eines humanen OATP zu seiner Familie kann anhand der arabischen Ziffer, welche der

Namensbezeichnung des Transporters OATP folgt, abgelesen werden. Es gibt sechs Familien mit den Bezeichnungen OATP1, OATP2, OATP3, OATP4, OATP5 und OATP6. Proteine mit einer Übereinstimmung von über 60% in ihrer Aminosäurenabfolge kommen in die gleiche Subfamilie, die durch den Großbuchstaben A, B, C oder D gekennzeichnet ist. Befinden sich Proteine mit individuellen und differenten Genprodukten in derselben Subfamilie, so wird eine weitere arabische Zahl angefügt (Hagenbuch B. und Meier P. J., 2004; Hagenbuch B. und Gui C., 2008). Zusammengefasst am Beispiel des Oatp4a1 in Ratten, beinhaltet die neue Nomenklatur die Bezeichnung der Superfamilie (Oatp), die Familiennummer (Oatp4), den Buchstaben der Subfamilie (Oatp4a) und eine weitere Ziffer zur Kennzeichnung individueller Proteine (Oatp4a1). Das gleiche Prinzip gilt für die Benennung der dazugehörigen Gen-Symbole mit dem Unterschied der Verwendung der Abkürzung SLCO bzw. Slco anstelle von OATP/Oatp (Hagenbuch B. und Meier P. J., 2004).

Tabelle 2: Veranschaulichung des Unterschiedes zwischen alter und neuer Nomenklatur anhand des Oatp4a1 des Nagers *R. norvegicus* (Hagenbuch B. und Meier P. J., 2004).

Neue Protein-Nomenklatur	Neues Gen-Symbol	Alte Protein-Nomenklatur	Altes Gen-Symbol
Oatp4a1	Slco4a1	Oatp12	Slc21a12

1.3.2 Struktur und Aufbau von OATP-Kanälen

Organische Anionen Transporter Polypeptide bestehen aus 12 transmembranären Proteinen von 643-722 Aminosäuren, die über intra- oder extrazelluläre Loops Verbindungen eingehen. Der Amino- als auch der Carboxy-Terminus befindet sich auf cytosolischer Seite. Bei einigen OATPs/Oatps, wie den humanen OATP1A2, OATP4A1 und dem Oatp1a1 von Mäusen und Ratten, wurde eine C-terminale PDZ-Konsensus-Sequenz (P: Postsynaptisches Protein, PSD-95; D: Drosophila Septate Junction Protein, Discs large; Z: Tight Junction Protein, ZO-1) gefunden. Anhand des Oatp1a1 in Ratten konnte gezeigt werden, dass eine Bindung zu

PDZK1 essentiell für die Lokalisation des Polypeptids in der Plasmamembran ist. Es wird ein ähnlicher Mechanismus bei allen OATPs/Oatps mit C-terminaler PDZ-Konsensus-Sequenz vermutet (Wang et al., 2005).

Die OATPs/Oatps aller Familien haben den extrazellulären Loop zwischen Domäne 9 und 10 (extracellular loop E5) gemein, welcher zehn konservierte Cystein-Rückstände enthält, die den Zink-Finger-Domänen der DNA-Bindungsproteine gleichen. Unter normalen Umständen sind sämtliche Cystein-Rückstände über Disulfidbrücken gebunden, welche für die Expression von funktionellen Proteinen in der Plasmamembran essentiell zu sein scheinen (Hakes D. J. und Berezney R., 1991; Hagenbuch B. und Meier P. J., 2003; Hänggi E. et al., 2006). Wie aus Abbildung 11 ersichtlich, gleichen sich OATPs/Oatps strukturell auch in ihren N-Glykosylierungsstellen in den extrazellulären Loops E2 und E5. Anhand des Oatp1a1 in Ratten wurde festgestellt, dass die Position und die Funktion des Transportproteins vom Grad der N-Glykosylierungen mitbestimmt wird (Lee T. K. et al., 2003).

Eine weitere Gemeinsamkeit ist Loop E3 und dessen Verbindungsstelle mit der transmembranären Domäne 6, welche als "OATP superfamily signature" bezeichnet werden (Hagenbuch B. und Meier P.J., 2003). Diese Sequenz beinhaltet drei konservierte Tryptophanreste und wird zur Identifizierung von OATPs/Oatps unterschiedlicher Organismen verwendet (Hagenbuch B. und Gui C., 2008).

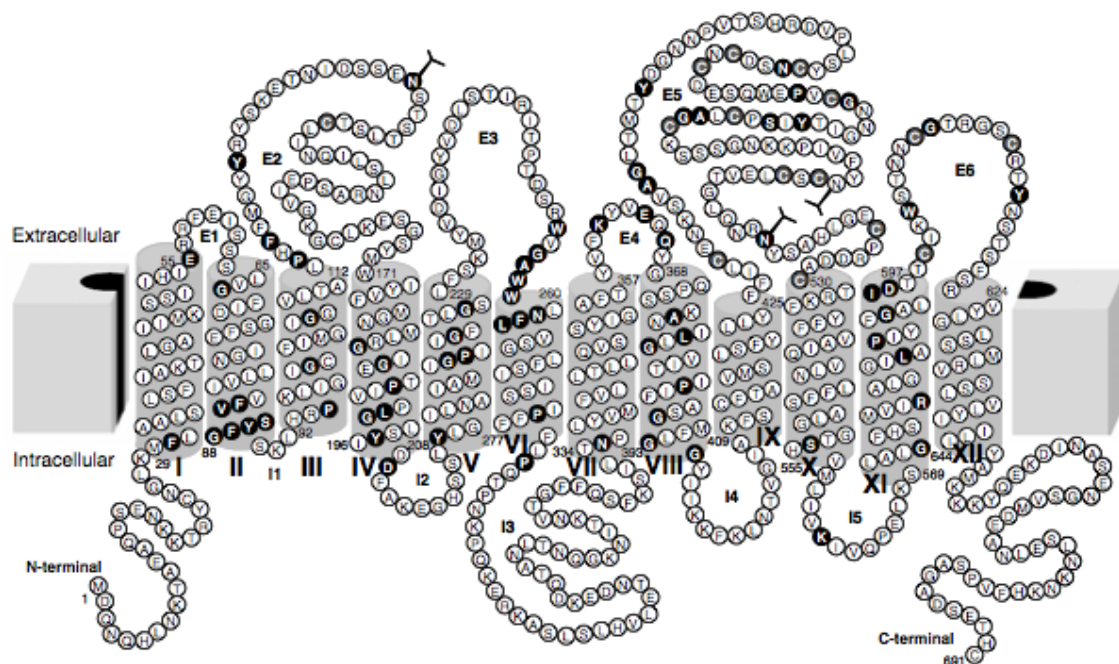


Abbildung 11: Topologisches Modell eines humanen OATP1B1 Transporters, Schwarz: konservierte Aminosäuren; Grau: Konservierte Cysteinreste; Y: 3 N-Glykosylierungsreste in den Loops E2 und E5 (Hagenbuch B. und Gui C., 2008)

1.3.3 Funktion und Mechanismus

OATPs/Oatps repräsentieren Natrium-unabhängige Gallensalz- sowie organische Anionen-Transportsysteme (Jacquemin E. et al., 1994; Kullak-Ublick G. A. et al., 1995; Noé B. et al., 1997; Walter H. C. et al., 2000). Als Influx- und Efflux-Transporter spielen sie mit einer Vielfalt an organischen Anionen und deren Konjugaten eine wichtige Rolle bei der hepatischen Detoxifikation, der Wirkstoffverteilung, der renalen Clearance und der Entwicklung von Resistenzen in Krebszellen gegenüber Therapeutika (Hagenbuch B. und Meier P. J., 2003; Hagenbuch B. und Meier P. J., 2004; Haimeur A. et al., 2004; König J. et al., 2006; Higgins F., 2007).

Das Transportsystem von OATPs basiert auf einem Anionenaustausch, was durch die Forschung an Oatp1 exprimierenden HeLa-Zellen und deren Taurocholat/ HCO_3^- -Austausch bewiesen wurde (Satlin L. M. et al., 1997). Die treibende Kraft für OATP/Oatp-vermittelten Transport wurde noch nicht für jeden Transporter im Detail ermittelt, aber für Oatp1 und Oatp2 ist gesichert, dass der

intrazelluläre Glutathion-Spiegel dabei eine wichtige Rolle spielt. Ein erhöhter intrazellulärer Glutathion-Spiegel in Oatp1 und Oatp2 exprimierenden Oozyten induziert im Versuch einen erhöhten Efflux von Glutathion sowie, als Folge des Austauscherprinzips, einen gesteigerten Influx von Taurocholat im Verhältnis 1:1 (Li L. Q. et al., 1998). Ein simultaner Wechsel des extrazellulären Glutathion-Spiegels hingegen wirkte sich nicht auf die Oatp1 bzw. Oatp2-vermittelte Taurocholataufnahme aus. Dies lässt darauf schließen, dass eine gesteigerte intrazelluläre Glutathion-Konzentration einen bedeutenderen Einfluss auf den Transport besitzt als ein von intra- nach extrazellulär wirkender Gradient. Ein weiterer Beweis für die Annahme eines asymmetrischen Transportmechanismus wurde mit Tests an Oatp2 exprimierenden Oozyten geliefert, welche nicht befähigt waren, radiomarkiertes Dinitrophenyl-Glutathion (DNP-Glutathion) aus dem Extrazellularraum zu akkumulieren, wohingegen eine hohe intrazelluläre Konzentration an DNP-Glutathion den Oatp2-induzierten Taurocholatinflux stimulierte (Li L. et al., 2000).

1.3.3.1 Exo- und endogene Substrate der OATPs

Tabelle 3: Zusammenfassung der wichtigsten exo- und endogenen Substrate der OATPs
(Hagenbuch B. und Gui C., 2008)

Arachidonsäure-Metaboliten	Arachidonsäure, Prostaglandin E1, Prostaglandin E2, Prostaglandin D2, Prostaglandin F2 α , Thromboxan B2, Leukotrien C4, Leukotrien E4
Hormone und endogene Substrate	Östradiol-17 β -Glucuronid, Östron-3-Sulfat, DHEAS, reverses Triiodothyronin (rT3), Taurocholat, Thyroxin (T4), Triiodthyronin (T3), Bilirubin, Mikrocystein, Gallensäuren
Xenobiotika	Methotrexat, Irinotecan, Docetaxel, Paclitaxel, Rifampicin, Digoxin, Benzylpenicillin, Atorvastatin, Fluvastatin, Enalapril

1.3.4 OATP4A1

OATP4A1 ist ein Protein aus 722 Aminosäuren und besitzt eine molekulare Masse von etwa 65 kDa (Sato K. et al., 2003). Ursprünglich wurde es aus der Niere und dem Gehirn isoliert. Später wurde dessen mRNA auch in Herz, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskeln, Niere und dem Pankreas nachgewiesen. Zu den Substraten des OATP4A1-Transporterproteins zählen: Benzylpenicillin, Östradiol-17β-Glucuronid, Östron-3-Sulfat, Prostaglandin E2 (PGE₂), reverses Triiodthyronin (rT3), Taurocholat, Thyroxin (T4) und Triiodthyronin (T3) (Tamai et al., 2000; Fujiwara et al., 2001).

Aufgrund der starken Expression in der Plazenta und der Fähigkeit Thyroidhormone zu transportieren, wird angenommen, dass OATP4A1 eine wichtige Rolle bei der Versorgung des Fötus mit Schilddrüsenhormonen einnimmt (Hagenbuch B. und Gui C., 2008). Des Weiteren ist man der Meinung, dass das Risiko an Darmkrebs zu erkranken durch eine gesteigerte OATP4A1-Expression im Colon erhöht wird. Grund zu der Annahme liefert ein in der mRNA detektierter, erhöhter Expressionslevel des Transportproteins bei Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung und deren gesteigertes Risiko Darmkrebs zu entwickeln (Ancona N. et al., 2006; Wojtal K. A. et al., 2009). Die Pathogenese einer kolorektalen Neoplasie wird auch mit Veränderungen der epithelialen Clearance von Xenobiotika, Toxinen und metabolischen Stoffwechselprodukten in Verbindung gebracht, da eine Dysfunktion dieses Mechanismus ein zytotoxisches und potentiell onkogenes Milieu schaffen kann (Peddareddigari V.G., et al., 2010). OATP4A1 scheint neben OATP1C1 und OATP4C1 im Exkretionssystem des menschlichen Kolon involviert zu sein und bei der Regulation der intrazellulären Konzentration von cyclischen Nukleotiden wie cAMP und cGMP eine Rolle zu spielen. Vorallem OATP4A1 und OATP2B1, bekannt PGE₂ zu transportieren, sind bei der kolorektalen Neoplasie überexprimiert. Dies könnte eine Erklärung für die geringere PGE₂-Konzentration im Kolon von Patienten mit kolorektaler Neoplasie im Gegensatz zu gesunden Kolonproben liefern. (Kleberg K. et al., 2012).

Neueste Studien verstärken die Annahme des Einflusses von OATP4A1 bei unterschiedlichsten malignen als auch nicht-malignen Erkrankungen. Bei der ovarialen Endometriose können beispielsweise Veränderungen im SLCO4A1 Gen

und der dadurch beeinflusste Steroidhormonmetabolismus zu Duplikationen und Veränderungen auf bestimmten chromosomalen Regionen führen (Yang W. et al., 2013). Die Down-Regulierung des SLCO4A1 in frühem Stadium der humanen Netzhautablösung liefert zusammen mit zwei weiteren Faktoren eine Abschätzung der Dauer des Prozesses der pathologischen Ablösung (Delyfer M. N., et al., 2011). Beim pankreatischen Adenokarzinom konnte, im Gegensatz zu gesundem Gewebe der Bauchspeicheldrüse, eine OATP4A1-Up-Regulierung beobachtet werden. OAT4A1 könnte demnach ein Target für zytostatische Wirkstoffe in der Therapie des Pankreaskarzinoms darstellen (Hays A. et al., 2013).

1.3.5 Regulierung der OATP-Expression

Aufgrund der unterschiedlichen Expression von OATPs in gesundem und malignem Gewebe stellt sich die Frage, welche Mechanismen und Faktoren bei der Regulation dieses Prozesses involviert sind. Angenommen wird ein Zusammenspiel aus der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, DNA-abhängigem Gen-Silencing und posttranskriptionellen Modifizierungen (Svoboda M. et al., 2011b).

In Mauszelllinien wurde gezeigt, dass nukleäre Rezeptoren, die Liganden-abhängig aktiviert werden, bei der Initiierung der OATP-Biosynthese beteiligt sind. Bermerkenswert ist hier die geringe Anzahl an Aktivatoren, welche die Expression steigern, im Gegensatz zu den vielen, die zur Senkung der mRNA-Expression führen. Ein Beispiel für ersteren Fall wäre der nukleäre Pregnan-X-Rezeptor (PXR), dessen Expression mit der des OATP1A2 korreliert und der von Wirkstoffen, wie Rifampicin, aktiviert wird. Der chemosensitive PXR ist in der Lage die Biosynthese des Transporters zu induzieren und somit die Aufnahme von Xenobiotika und die Zellproliferation zu steigern. Durch Applikation eines PXR-Antagonisten kann dieser Vorgang inhibiert werden (Miki Y. et al., 2005; Meyer H. E. et al., 2008; le Vee M. et al., 2011).

Die Auswirkung des von DNA-Methylierung-abhängigem Gen-Silencings wurde anhand des OATP2A1 in Zelllinien von kolorektalen Karzinomen gezeigt. Nach Verabreichung eines demethylierenden Agens oder eines Histon-Deacetylase-

Inhibitors konnte die verminderte Expression von OATP2A1 teilweise wieder aufgehoben werden (Holla V. R. et al., 2008).

1.3.6 Einfluss der OATP-Expression bei Karzinomen

OATPs weisen in Krebszellen eine spezifische Expression auf, welche darauf schließen lässt, dass die Rolle der OATPs in der Tumorbilogie wichtig zu sein scheint und sie mögliche Targets für die moderne Wirkstoffentwicklung von Zytostatika liefern könnten.

Das Vorkommen einiger OATPs beschränkt sich unter physiologischen Bedingungen auf bestimmte Geweberegionen und Organe. In pathologischem Umfeld, wie bei Inflammation oder Tumorwachstum, kann sich das normale Expressionsmuster der OATPs verändern. Gewebsspezifische OATPs konnten unter diesen Umständen vermehrt im Krebsgewebe nachgewiesen werden. So wurde der Leber-spezifische OATP1B1 in Kolonkarzinom-, Mammakarzinom-, Prostatakarzinom-, Lungenkarzinom- und Ovarialkarzinomzellen, detektiert. Ähnlich verhält es sich mit OATP1B3, der in gesundem Lebergewebe, aber auch in zahlreichen Tumorgeweben, wie Lungen- und gastrointestinalen Tumoren, vertreten ist und mit der Resistenzentwicklung gegenüber dem Folsäure-Antagonisten Methotrexat in Verbindung gebracht wird (Marin J. J. et al., 2009). Da OATP1B3 speziell bei Pankreatitis und Adenokarzinomen, welche wiederum zu einem Pankreaskarzinom führen können, die höchste Expression aufweist, ist OATP1B3 ein potentieller Tumormarker zur Diagnose von pankreatischen Adenokarzinomen in frühem Stadium (Hays A. et al., 2012). Der Testes-spezifische OATP6A1 ist in Lungen- und Gehirntumoren stark exprimiert (Buxhofer-Ausch V. et al., 2013).

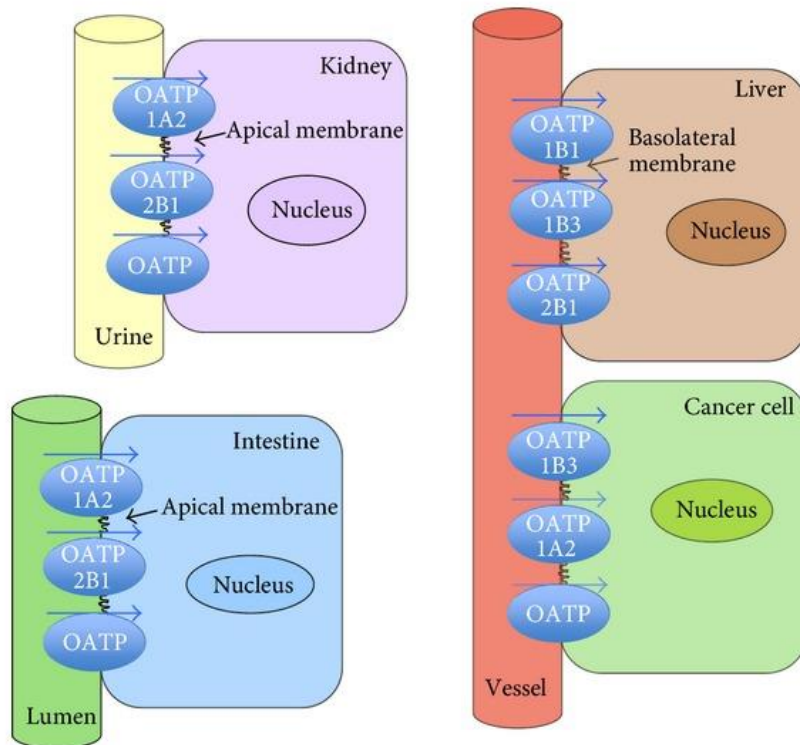


Abbildung 12: Die Expression ausgewählte OATPs in gesundem Gewebe und in Karzinomzellen (Buxhofer-Ausch V. et al., 2013)

Der Einfluss der OATPs beim Fortschreiten von Krebserkrankungen ist vielseitig. Da viele zytotoxische Wirkstoffe (Methotrexat, Irinotecan, Taxolderivate, u. v. m.) Substrate für OATPs sind, werden intrazelluläre Konzentrationen von Chemotherapeutika und die Sensitivität der Zellen auf bestimmte Medikamente von OATPs beeinflusst. Zusätzlich kann die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika durch OATPs gesteigert oder induziert werden. Bei hormonsensitiven Karzinomen wird durch Überexpression der Transporterproteine, welche zahlreiche Steroid-Präkursor-Hormone zu ihren Substraten zählen, die Proliferation gefördert (Buxhofer-Ausch V. et al., 2013).

Die spezifische und klar definierte OATP-Expression in Tumoren könnte von diagnostischem Nutzen sein und Targets zur Wirkstoffentwicklung liefern. Des Weiteren könnten gegen OATP gerichtete Antikörper in der Tumorthherapie zum Einsatz kommen. Aufgrund des Vorkommens in mehreren Geweben ist bei

solchen Therapieansätzen jedoch auch auf die mögliche Gefahr von unerwünschten Nebenwirkungen hinzuweisen (Buxhofer-Ausch V. et al., 2013).

1.3.7 OATP und das kolorektale Karzinom

Anhand von immunohistochemisch gefärbten Gewebeschnitten von Patienten mit kolorektalem Karzinom, wurde die Expression von OATP1B3 evaluiert. Das höchste Vorkommen an OATP1B3 wurde in gut differenzierten Tumoren und in frühen Tumorstadien detektiert. Die erhöhte Expression lässt jedoch keine Vorhersage über die 5-Jahresüberlebensrate zu (Lockhart A. et al., 2008). Allerdings scheint eine OATP1B3-Überexpression nach der Behandlung mit Camptothecin, einem Topoisomerase I-Inhibitor und Oxaliplatin einen Vorteil in Bezug auf die Überlebensrate zu bringen (Lee W. et al., 2008).

1.3.8 OATP-Expression in Immunzellen

In Monozyten, humanen Makrophagen und Dendritischen Zellen (DC) konnte die mRNA für SLCO2B1, SLCO3A1 und SLCO4A1 detektiert werden. Im Gegensatz zu Monozyten und DCs ist die SLCO2B1-Expression besonders in Makrophagen stark erhöht. Dies gibt Grund zur Annahme, dass SLCO2B1 beim Reifeprozess und der Aktivierung von Makrophagen eine Rolle spielen könnte. Darüber hinaus induziert eine mikro-strukturierte Membranoberfläche, die einen physiologischen Stimulus widerspiegelt, eine mehr als 6-fache Steigerung der SLCO1B1-mRNA in Makrophagen. Auch bei SLCO4A1 wurde eine stark erhöhte Expression in Makrophagen und eine weitaus schwächere Expression in dendritischen Zellen im Vergleich mit Monozyten beobachtet. Dies deutet daraufhin, dass Makrophagen Funktionen bei spezifischen Inflammationsmustern zu übernehmen scheinen. (Skazik C. et al., 2008). Skazik C. et al. konnten zeigen, dass Monozyten, Makrophagen und DCs ein spezifisches Transporter-Profil exprimieren und dadurch in Influx- und Effluxprozesse von exogenen als auch endogenen Molekülen, wie inflammatorischen Lipiden, involviert sind (Skazik C. et al., 2008).

2. ZIELSETZUNG

OATPs sind Polypeptide, die in der Plasmamembran verankert sind. Sie transportieren die Substrate aus dem endogenen Metabolismus, wie Gallensäuren, Steroid- und Thyroidhormone, Prostaglandine, zyklische Nukleotide und exogene Verbindungen (Arzneistoffe, Xenobiotika) durch biologische Membranen. OATPs sind an einer Vielfalt an physiologischen Prozessen beteiligt und können durch das Zusammenspiel von Aufnahme, Biotransformation und Efflux die Verteilung und die Wirksamkeit von Wirkstoffen entscheidend beeinflussen (Svoboda M. et al., 2011). Das Expressionsmuster von OATPs ist in einigen malignen Geweben spezifisch verändert. Aus diesem Grund könnten OATPs Targets für eine zielgerichtete Zytostatika-, Hormon- oder Immuntherapie liefern. Dafür fehlen jedoch noch für einige OATPs und maligne Erkrankungen klare Definitionen der Expressionschemata und der physiologischen Gegebenheiten.

Ziel meiner Arbeit am Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung der Medizinischen Universität Wien in Zusammenarbeit mit dem Department für klinische Pharmazie und Diagnostik der Universität Wien ist es, die Lokalisation der OATP4A1-Expression in Gewebeschnitten von Patienten mit kolorektalem Karzinom im Vergleich zur Expression in nicht-malignen Gewebeproben von Patienten mit Divertikulitis festzustellen. Formaldehydfixierte Paraffinschnitte werden immunohistochemisch gefärbt um anschließend nach immunoreaktiven OATP4A1 untersucht zu werden. Dabei wird die Färbeintensität und zelluläre Lokalisation des Transporters quantitativ analysiert. Die Ergebnisse der OATP4A1 Lokalisation in verschiedenen Zellgruppen in malignem und benignem Gewebe sollen statistisch verglichen und auf Signifikanz überprüft werden. Zusätzlich werden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen zur Identifizierung und Lokalisierung der OATP4A1-Expression in Immun- und Endothelzellen durchgeführt und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops beurteilt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen Möglichkeiten zu neuen Ansätzen bei der Entwicklung von Wirkstoffen zur Behandlung von kolorektalen Karzinomen bieten, und einen Anteil zur Aufklärung von physiologischen und pathologischen Wirkungen der OATPs beitragen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patienten

Für die immunhistochemischen und Immunfluoreszenz-Färbungen wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit Gewebeschnitte von 148 Patienten, die an einem kolorektalen Karzinom unterschiedlicher Stadien erkrankt sind, und Gewebeschnitte von 10 Patienten mit Divertikulitis zur Verfügung gestellt. Die Tumore und Divertikelabschnitte wurden den Patienten im Sozialmedizinischen Zentrum-Ost, Donauespital Wien, entfernt. Daraufhin wurden die Gewebeproben in der pathologischen Abteilung mit Paraformaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und histologisch untersucht. Schnitte, welche für die Diagnosestellung nicht benötigt wurden, sind der Forschung überlassen worden. Sowohl die Patienten als auch die Ethikkommission gaben zu diesem Zweck ihre Einwilligung.

3.2 Immunhistochemie

Immunhistochemie ist eine Methode, die zur Lokalisierung und Visualisierung eines Epitops (dh. eine spezifische Antikörperbindungsstelle auf einem Antigen) auf einem bestimmten Gewebe oder bestimmten Zellen bestimmt ist. Sie beruht auf der Spezifität und Affinität von Antikörpern auf ein bestimmtes Antigen.

Prinzipiell wird die Immunhistochemie von zwei Schritten bestimmt. Im ersten Schritt bindet der verwendete Antikörper spezifisch an das Epitop des bestimmten Antigens von Zellen oder Geweben. Im zweiten Schritt wird dann die Bindung zwischen Antigen und Antikörper visualisiert. Für diese Visualisierung kann entweder die direkte oder die indirekte Methode angewendet werden. Bei der direkten Methode ist der primäre Antikörper bereits mit einem sogenannten Marker-Molekül, wie zum Beispiel Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen oder kolloidalem Gold, markiert. Bei der indirekten Methode werden die Antigen-Antikörper Reaktionsstellen mit Hilfe von immunologischen oder chemischen Reaktionen visualisiert. Im Rahmen der Diplomarbeit wurde dafür das Enzym horse radish peroxidase (HRP) verwendet. Dieses konjugiert an den Antikörper

und ist in der Lage das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) in Anwesenheit von H_2O_2 in braune Präzipitate umzuwandeln. Das Problem mit HRP-konjugierten Antikörpern ist, dass endogene Enzyme innerhalb des Gewebes auch positive Signale liefern (zum Beispiel: Erythrozyten). Zusätzlich ist die Intensität und die Qualität der Färbung stark von der Arbeitsweise, den Inkubationszeiten, der Qualität der Gewebeschnitte und der Materialien abhängig. Daher empfiehlt sich, die Methode zu standardisieren (Lloyd R., 2010).

3.2.1 Nachweis des OATP4A1 durch Immunfärbung

Durch die immunhistologischen Färbungen an Schnitten von Colonkarzinom-Patienten und als Vergleich an Schnitten von Patienten ohne Karzinom, konnte eine quantitative Aussage über die Expression von OATP4A1 in Krebszellen im Vergleich zu gesunden Darmepithelzellen, Stroma und Immunzellen getroffen werden. Analysiert wurde mit Hilfe des Imageanalyseprogramms HistoQuest 4.0.4.0122, wobei der Prozentsatz als auch die Intensität der Färbung berücksichtigt wurde.

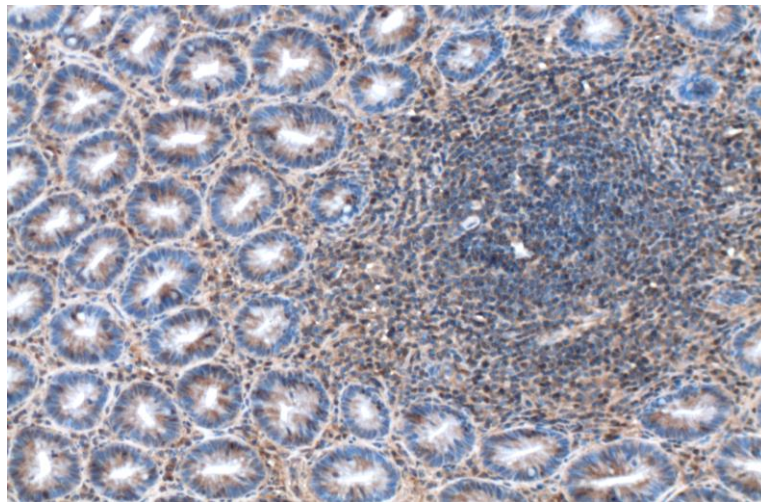


Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung einer Gewebeprobe eines an Divertikulitis erkrankten Patienten. Mit DAB-Chromogen visualisierte OATP4A1-Transportproteine erscheinen braun, die Zellkerne blau. Bild: 10-fache Vergrößerung

3.2.2 Material

- Gewebeschnitte
- Primärantikörper Anti-SLCO4A1 (Lot.:R31219, ATLAS-Antibodies, Stockholm, S)
- Ultravision LP Detection System (HRP Polymer & DAB Plus Chromogen; Thermo Scientific, Fremont, USA)
- Phosphate Buffered Saline (PBS) pH=7,4
- Tween®20 zur Elektrophorese (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)
- Xylol (Merck, Darmstadt, D)
- Ethanol absolut (Merck, Darmstadt, D)
- Epitope Retrieval Solution pH=9 (20x Konzentrat; Eubio Andreas Köck, Wien, A)
- Dako Pen (Dako Cytomation, Denmark A/S)
- Chem Mate™ Hematoxylin (Dako Cytomation, Denmark A/S)
- 10% BSA (Bovine Serum Albumin)/PBS (Blocking Buffer)
- Eppendorf-Gefäße 1,5 ml (Biozym Biotech Trading GmbH)
- Aquatex Einbettmedium (Merck, Darmstadt, D)
- Deckgläser 24 x 50 mm Borosilicate Glass, Thickness No. 1 (VWR International)
- Aqua bidest.
- Vortex Labinco L24
- Mikroskop Zeiss AXIO Imager Z1 (Zeiss, Jena, D)

3.2.3 Durchführung

1. Die in Paraffin eingebetteten Schnitte werden kurz in Xylol und anschließend in 100% Ethanol eingetaucht.
2. Die Schnitte werden in ein Plastikgefäß mit EB-DEPP-9 Buffer (epitope retrieval solution pH=9), der zuvor im Verhältnis 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde, gegeben und für 10 Minuten in der Mikrowelle erwärmt. Dies dient dazu, die bei der Einbettung entstandenen, durch

Formaldehyd induzierten Crosslinks zu brechen und die Antigene für den Primärantikörper frei zu machen.

3. Danach lässt man die Schnitte für 25 Minuten bei Raumtemperatur auskühlen.
4. Man wäscht 3x3 Minuten in PBS Tween 0,1% und umrandet die Gewebezonen mit Dako Pen.
5. Ultra V Block wird für 7 Minuten aufgetragen um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Das Gewebe sollte gleichmäßig und zur Gänze bedeckt sein. Die Menge des dafür verwendeten Ultra V Blocks hängt von der Größe des Gewebeschnittes ab.
6. Der primäre Antikörper wird in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung verdünnt und anschließend gevortext. (die verwendeten Verdünnungen werden in Tabelle 4 angeführt)
7. Nach gründlichem Abtrocknen der Schnitte wird der primäre Antikörper aufgetragen und je nach Antikörper für bestimmte Zeit (jeweilige Inkubationszeiten in Tabelle 4 angeführt) inkubiert.
8. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird 3x3 Minuten mit PBS Tween 0,1% gewaschen.
9. Polymer Detection System:
 - a. Der AB Enhancer, der die spezifische Antikörperaktivität verstärkt, ohne aber die unspezifische Bindung zu stärken, wird für 10 min. aufgetragen und anschließend 3x3 Minuten mit PBS Tween 0,1% gewaschen.
 - b. Ab hier wird im Dunkeln gearbeitet, da das HRP-Polymer Licht empfindlich ist und unnötige Aussetzung mit Licht vermieden werden sollte. Das HRP-Polymer wird für 15 min. aufgetragen und wieder 3x3 Minuten mit PBS Tween 0,1% gewaschen.
10. 1 Tropfen DAB wird zu 2 ml DAB plus Substrat (=H₂O₂) gemischt und diese Chromogensolution für 10 min. aufgetragen (Zeit ist abhängig von der Färbung). DAB wird durch das Enzym HRP, das an das Antigen gebunden ist, in ein unlösliches braunes Reaktionsprodukt umgewandelt und somit sichtbar gemacht.
11. Als nächstes wird 4x kurz mit Aqua bidest. gewaschen.

12. Hämatoxylin, das zur Sichtbarmachung der Zellkerne dient, wird für genau 1 Minute aufgebracht.
13. Die Schnitte werden 5 Minuten in Leitungswasser gespült.
14. Zum Schluß werden 2 Tropfen Aquatex pro Dako Pen-Region aufgetragen und mit einem Deckglas luftblasenfrei bedeckt.

Die gefärbten Schnitte werden mit dem Tissue Faxes (Mikroskop Zeiss AXIO Imager Z1) aufgenommen. Im Rahmen meiner Diplomarbeit verwendete Antikörper werden in den nachfolgenden Tabellen 4 und 5 angeführt.

3.3 Immunofluoreszenz

Immunofluoreszenz wird wie die Immunohistochemie zur Lokalisierung und Visualisierung von Antigenen auf Zellen oder Geweben verwendet. Bei der Immunofluoreszenz wird zusätzlich zu der Antikörper-Antigen-Reaktion die hohe Spezifität der Fluoreszenzmikroskopie genutzt. Wie auch bei der Immunohistochemie wird zwischen der direkten und indirekten Färbemethode unterschieden. Die direkte Methode bedient sich mit Fluorochrom markierten Primärantikörpern, die das Antigen direkt sichtbar machen. Bei der indirekten Methode ist hingegen erst der sogenannte Sekundärantikörper, welcher sich an den Antikörper-Antigen-Komplex bindet, mit einem Fluorochrom markiert.

Fluorochrome sind fluoreszente chemische Verbindungen, die nach optischer Anregung Licht absorbieren, eine gewisse Zeit in diesem angeregten Stadium verbleiben um schließlich durch spontane Lichtemission in den energieärmeren Zustand zurückzukehren. Verschiedene Fluorochrome emittieren unterschiedliche Wellenlängen was die Färbung mit mehreren Antikörpern innerhalb eines Gewebeschnittes und somit Doppel- und Dreifachfärbungen ermöglicht. Durch einen speziellen Filter im Fluoreszenzmikroskop werden nur Strahlen einer bestimmten Wellenlänge durchgelassen um somit die Färbung sichtbar zu machen (Storch et al., 2000; Wilson et al., 2000).

3.3.1 Sudan Black B

Sudan Black B ist ein Farbstoff, der normalerweise zum Färben von Fettablagerungen verwendet wird, aber auch hoch effektiv gegen Lipofuscin, Aldehyd- und Paraffin-induzierte Autofluoreszenz wirkt. Sudan Black B hat sich in verschiedensten Geweben, unter anderem der Niere, Leber und dem Myocard, als effektiv erwiesen.

An dem Arbeitsvorgang der Fluoreszenzfärbung wird nichts verändert, außer dass nach der Inkubation des zweiten Sekundärantikörpers mit einem 0,22 µm Filter die Sudan Black B- Lösung (0,2% in 70% Ethanol) aufgetragen wird und diese dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur einwirken lässt. Anschließend wird vier Mal für fünf Minuten mit PBS gewaschen und mit der normalen Vorgehensweise der folgend beschriebenen Immunofluoreszenzdoppelfärbung fortgefahren (Sun et al., 2011).

3.3.2 Material

- Gewebeschnitte
- Primärantikörper (siehe Tabelle 4)
- Sekundärantikörper (siehe Tabelle 5)
- PBS; pH=7,4
- 10% BSA (PAN Biotech, Aidenbach, D)/PBS (=Blocking Buffer)
- 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (DAPI); Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D)
- Sudan Black B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Spritzen-/ Syringe-Filter 0,22 µm (99722, TRP, Trasadingen, Switzerland)
- Zitratpuffer pH=6,0
- Tween®20 zur Elektrophorese (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D)
- Xylol (Merck, Darmstadt, D)
- Ethanol absolut (Merck, Darmstadt, D)
- Dako Pen (Dako Cytomation, Denmark A/S)
- Eppendorf-Gefäße 1,5 ml (Biozym Biotech Trading GmbH)

- Aqua bidest.
- Trockenschrank (Memmert, TV15u)
- Zentrifuge 5415R (Eppendorf Wesseling-Berzdorf, D)
- Vortex Labinco L24
- Dampfgerar (Braun, Multigourmet Type 3-216)
- Mowiol 4-88 Einbettmedium (Carl Roth, Karlsruhe, D)
- Deckgläser 24 x 50 mm Borosilicate Glass, Thickness No. 1 (VWR International, Radnor, PA)
- Mikroskop Zeiss AXIO Imager Z1 (Zeiss, Jena, D)

3.3.3 Durchführung einer Immunofluoreszenz-Doppelfärbung

1. Die Schnitte für 25 min. in den Trockenschrank (60°) geben um das Paraffin zu schmelzen.
2. Danach wird gewaschen und rehydriert :
 - Xylol 3x10 min.
 - EtOH 100% 2x2 min.
 - EtOH 96% 1x2 min.
 - EtOH 70% 1x2 min.
 - EtOH 50% 1x2 min.
 - EtOH 30% 1x2 min.
3. Man wäscht 2x5 min. in PBS.
4. Die Schnitte werden in ein mit heißem Citratpuffer gefülltes Plastikgefäß gebracht und 15 min. im Dampfgerar erhitzt. Dies dient zur Ag-Demaskierung und somit der Entfernung von den Crosslinks mit dem in der Fixierung verwendeten Formaldehyd.
5. Anschließend läßt man 25 min. bei Raumtemperatur auskühlen.
6. Die Schnitte werden herausgenommen und 1x5 min. in PBS und 1x5 min. in PBS-Tween 0,1% gewaschen.
7. Die Schnitte gut trocknen und die Geweberegionen mit Dako-Pen umranden.

8. Nun wird der Blocking Buffer (BSA 10%) für 30 min. in dunkler feuchter Kammer bei Raumtemperatur aufgetragen um unspezifische Bindungsstellen und die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren.
9. Man verdünnt den 1. primären Antikörper (Ak) mit BSA 10%. Dieser bindet an ein spezifisches Antigen wie zum Beispiel OATP4A1, CD34 und CD45.
10. Die Ak-Verdünnung wird für 1 min. zentrifugiert (4°C, 14000xg)
11. Der 1. primäre Ak wird aufgetragen und für gewisse Zeit (abhängig vom jeweiligen Antikörper) in feuchter dunkler Kammer bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. (jeweilige Inkubationszeiten in Tabelle 4 angeführt)
12. Danach 2x10 min. in PBS-Tween 0,1% und 2x5 min. in PBS waschen. Ab hier wird im Dunkeln gearbeitet.
13. Der 1. sekundäre Ak wird mit BSA 10% verdünnt, auf die gut getrockneten Schnitte aufgetragen und für gewisse Zeit (abhängig vom jeweiligen Antikörper) in feuchter dunkler Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. An diesem ist ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Bestrahlt man den Schnitt mit Licht bestimmter Wellenlänge, beginnt der Fluoreszenzfarbstoff zu leuchten und das zu bestimmende Gewebe bzw. die zu bestimmenden Zellen werden sichtbar.
14. Die Schnitte werden 1x10 min. in PBS-Tween 0,1% und 2x10 min. in PBS gewaschen.
15. Erneut wird Blocking Buffer (BSA 10%) für 30 min. in dunkler feuchter Kammer bei RT aufgetragen um auch den 2. primären Ak zu permeabilisieren und unspezifische Bindungsstellen und die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren.
16. Man verdünnt nun den 2. primären Ak mit BSA 10% und zentrifugiert diesen.
17. Der 2. primäre Ak wird aufgetragen und für gewisse Zeit (abhängig vom jeweiligen Antikörper) in feuchter dunkler Kammer inkubiert.
18. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird 2x10 min. in PBS-Tween 0,1% und 2x10 min. in PBS gewaschen.

19. Der 2. sekundäre Ak wird mit BSA 10% verdünnt, auf die gut getrockneten Schnitte aufgetragen und für gewisse Zeit (abhängig vom jeweiligen Antikörper) in feuchter dunkler Kammer bei RT inkubiert.
20. Es wird 1x10 min. in PBS-Tween 0,1% und 1x10 in PBS gewaschen.
21. Die Schnitte trocknen und mit DAPI in der Verdünnung 1:1000 für 10 min. in feuchter dunkler Kammer inkubieren. DAPI bindet selektiv die DNA im Zellkern und bildet einen stark fluoreszierenden DNA-DAPI-Komplex. Dadurch werden die blau gefärbten Nuclei unter Bestrahlung von Licht einer bestimmten Wellenlänge sichtbar.
22. Es wird abermals 2x10 min. in PBS-Tween 0,1% und 2x10 min. in PBS gewaschen.
23. Die Schnitte kurz in destilliertes Wasser eintauchen, trocknen und mit Mowiol eindecken.

Die gefärbten Schnitte werden mit dem Tissue Faxes (Mikroskop Zeiss AXIO Imager Z1) aufgenommen. Im Rahmen meiner Diplomarbeit verwendete Antikörper werden in den nachfolgenden Tabellen 4 und 5 angeführt.

3.4 Primär- und Sekundärantikörper

Tabelle 4: Primärantikörper, die zur immunhistochemischen und zur Immunfluoreszenzfärbung verwendet wurden. Angegeben sind die Verdünnung, die Antikörperquelle und die Einwirkzeit am Gewebe.

Antikörper	Verdünnung	Host	Hersteller	Inkubationszeit
Anti-SLCO4A1	1:200	Rabbit	Atlas-Antibodies (Lot: R31219)	60 Min./ über Nacht
CD3	1:50	Rat	Serotec (AbD, MCA 1477, Batchno.: 0212)	60 Min.
CD20	1:200	Mouse	Thermo Scientific (Ab-1, L-26)	60 Min.
CD24	1:50	Mouse	Neo Markers (Sn3b, MS-1279-PO)	30 Min.
CD31	1:100	Mouse	Dako, Clone JC70A	30 Min.
CD34	1:100	Mouse	Abcam (QBEND-10, ab8536)	45 Min.
CD44	1:1000	Mouse	Neo Markers (Ab-4, 156-3C11)	30 Min.
CD45	1:200	Mouse	Abcam (MEM-28, ab8216)	60 Min.
CD68	1:100	Mouse	Neo Markers, Ab-3 (KP-1)	60 Min.
CD163	1:1000	Mouse	Serotec, (MCA 1477)	60 Min.
Mast Cell Tryptase	1:2000	Mouse	Neo Markers, (Ab-2, AA1, MS-1216-PO)	20 Min.

Tabelle 5: Sekundärantikörper, die zur Immunfluoreszenzfärbung verwendet wurden. Angegeben sind die Verdünnung, die Antikörperquelle und die Einwirkzeit am Gewebe.

Antikörper	Verdünnung	Host	Hersteller
Anti-Mouse Alexa 568	1:1000	Goat	Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA)
Anti-Rabbit Alexa 488	1:1000	Goat	Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA)
Anti-Rat	1:1000	Goat	Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA)

3.5 TissueFaxs

Die immunohistochemisch- und immunofluoreszenz- gefärbten Gewebeschnitte wurden mit dem TissueFaxs-Gerät der Firma TissueGnostics aufgenommen. Dies ist ein kombiniertes System aus High-Tech-Hardware, einem Multi-Kanal-Mikroskop und einem Multi-Core-Computer. Es liefert eine gesamte Aufnahme des Gewebeschnittes in höchster Qualität und kombiniert morphologische Details mithilfe der Multi-Kanal-Durchflusszytometrie. Die aufgenommenen Bilder können in ein weiterführendes Programm, den HistoQuest für IHC oder den TissueQuest für IF, zur quantitativen Analyse exportiert werden. Es können acht Schnitte gleichzeitig aufgenommen werden, welche zu allererst als Preview-Bilder im Überblick auf dem Bildschirm erscheinen und auf denen nun die Interessensregionen (ROI) eingezeichnet und markiert werden. Diese ROIs werden nach Beschriftung und Einstellung des Fokus, der Sättigung, der TL-Lampe, des Kondensors und der Exposure-Time, aufgenommen. Am Ende erhält man einen Gesamtüberblick eines Schnittes und die Möglichkeit jedes einzelnene aufgenommene Feld (field of view=FOV) in einer höheren Auflösung und Vergrößerung anzusehen.

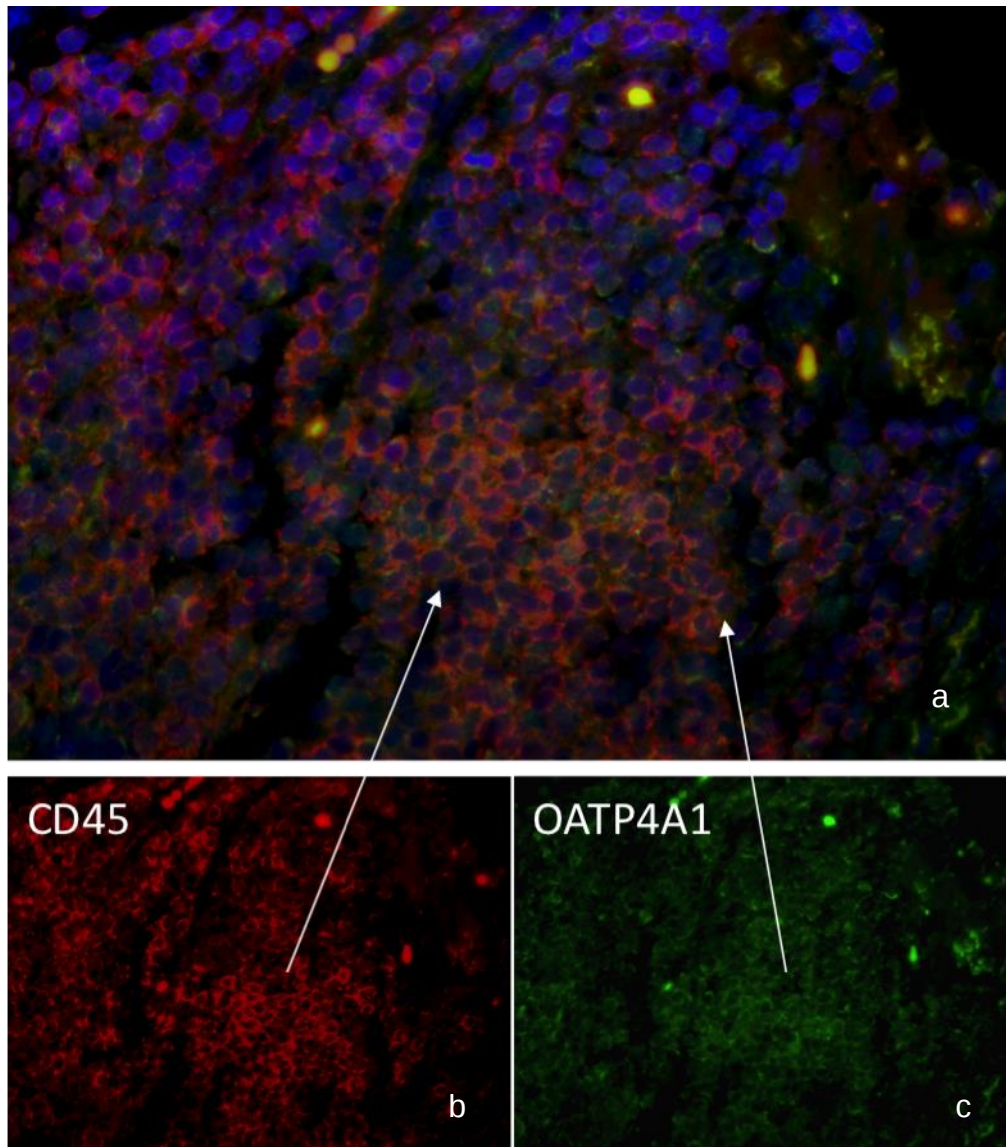


Abbildung 14: Ausschnitt einer Aufnahme mit dem Tissuefaxs-Mikroskop eines doppelt gefärbten Tumorgewebeschnittes. Mithilfe des Programms können immunfluoreszenzgefärbte Aufnahmen in den einzelnen Kanälen gezeigt werden. a: Overlay; b: CD45 markierte Immunzellen (Rot); c: OATP4A1 markierte Immunzellen (Grün) Bild: 10-fache (b,c) und 20-fache (a) Vergrößerung

3.6 Analyse mit HistoQuest 4.0.4.0122

Die Gewebeschnitte können mit Hilfe des Programms "Histo Quest" quantitativ erfasst werden. HistoQuest ist eine Software von TissueGnostics zur statistischen Erfassung von immunohistochemisch gefärbten Zellen und Geweben.

Um mit der Analyse starten zu können wird ein gesamter Bildquerschnittes des Gewebes benötigt, welcher mit TissueFAXS aufgenommen wurde und aus diesem exportiert wurde. Dieser wird als "aqproj" Datei geöffnet. Nun müssen einige Einstellungen getätigt werden, wie die Benennung des Dateinamens und die Auswahl der Master- und Marker-funktion. Im Rahmen meiner Analyse wurden OATP4A1 als Master und der Nucleus als Marker gewählt.

Im Anschluss werden verschiedene Interessensregionen (ROIs) kreiert, die eine differenzierte Analyse zulassen. Die einzelnen Regionen werden nun klassifiziert und vier Gruppen zugeteilt: Tumor, Immunzellen, Stroma und gesundes Gewebe. Patentierte Algorithmen zur Zelldetektion ermöglichen dem Programm anschließend eine automatische Analyse der Farbintensität und der Flächenprozent des zu bestimmenden Antigens. Durch manuelles Setzen des Cut-off's und Einsehen der analysierten Stellen in den verschiedenen Farb- und Schattenkanälen, kann die Analyse nachbearbeitet und kontrolliert werden.

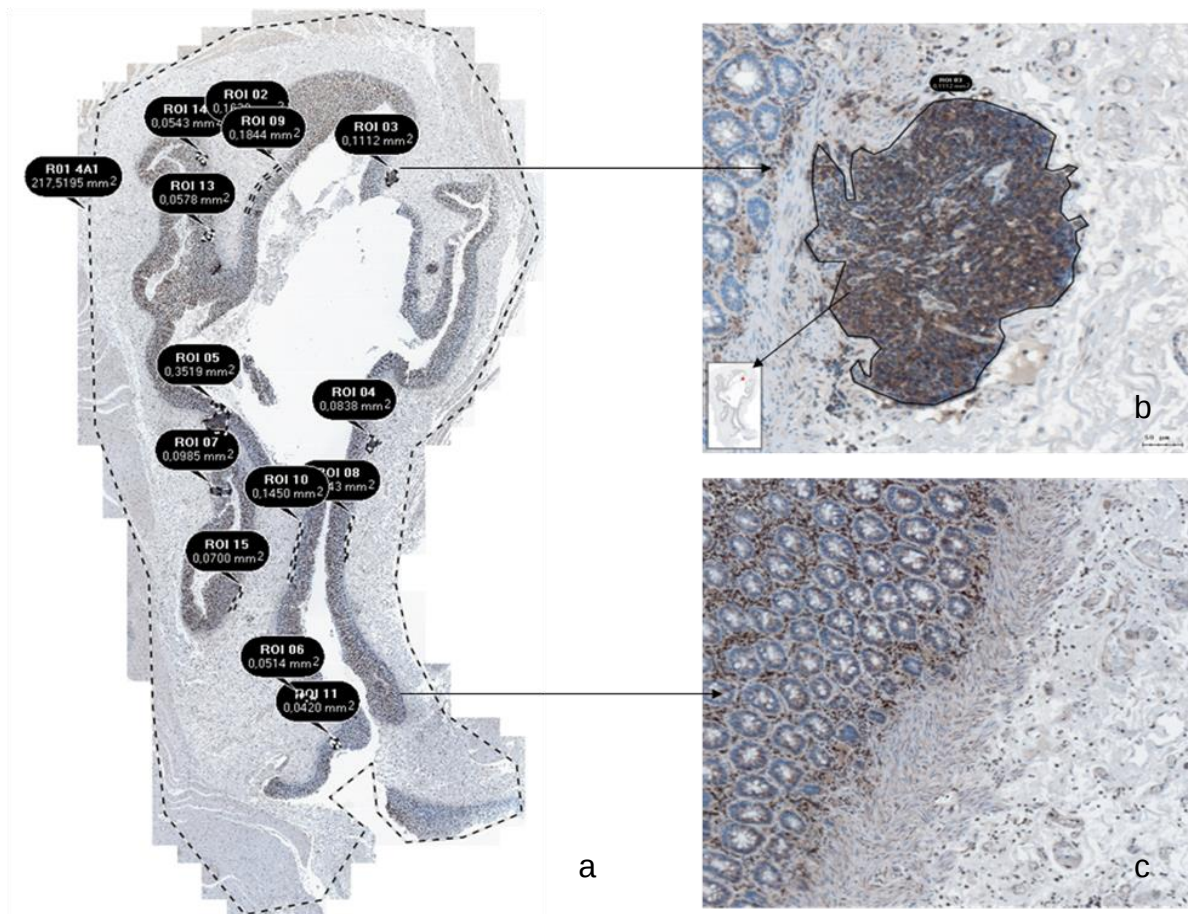


Abbildung 15: a: Übersicht des aufgenommenen Gewebeschnittes (hier: Gewebeschnitt eines Divertikulitispatienten). Die durch schwarze Felder markierten Regionen stellen jene ROIs dar, welche zum Zweck der quantitativen Analyse ausgearbeitet wurden. b: Färbung der Immunzellen durch OATP4A1 (Insert: zeigt jene Stelle im Präparat an, welche hier vergrößert gezeigt ist). c: Bildausschnitt des Darmepithels mit angrenzendem Stroma in höherer Auflösung und Vergrößerung (FOV).

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 OATP4A1-Expression in Immunzellen beim kolorektalen Karzinom

Um die Expression von OATP4A1 in kolorektalen Karzinomen zu untersuchen, wurden Gewebeschnitte von 148 Patienten immunhistochemisch untersucht. Dazu wurde der Antikörper Anti-SLCO4A1 verwendet und als Zweitantikörper wurde ein gegen das IgG des Erstantikörpers gerichteter Peroxidase-markierter Zweitantikörper verwendet. Die immunoreaktiven Proteine wurden durch die enzymatische Umwandlung des DAB Chromogen zum braunen Reaktionsprodukt visualisiert. Die Zellkerne, welche mit Hämatoxylin behandelt wurden, erscheinen blau und dienen zur Erkennung der einzelnen Zellen.

Aufgrund mangelnder klinischer Daten oder unzureichender Qualität der Präparate oder der Färbung mussten 10 der insgesamt 148 Patientenproben aus der Studie ausgeschlossen werden. In die statistische Analyse und Auswertung wurden letztlich 138 Gewebeschnitte miteinbezogen.

Nach der Aufnahme der Schnitte mit dem TissueFAXS-Mikroskop wurden die virtuellen Bilder der gefärbten Schnitte im Programm HistoQuest analysiert, wobei „Tumorzellen“, „Immunzellen“ und „Stroma“ als eigene Gruppen hinsichtlich der Färbeintensität und der Anzahl an OATP4A1-positiven Zellen analysiert wurden.

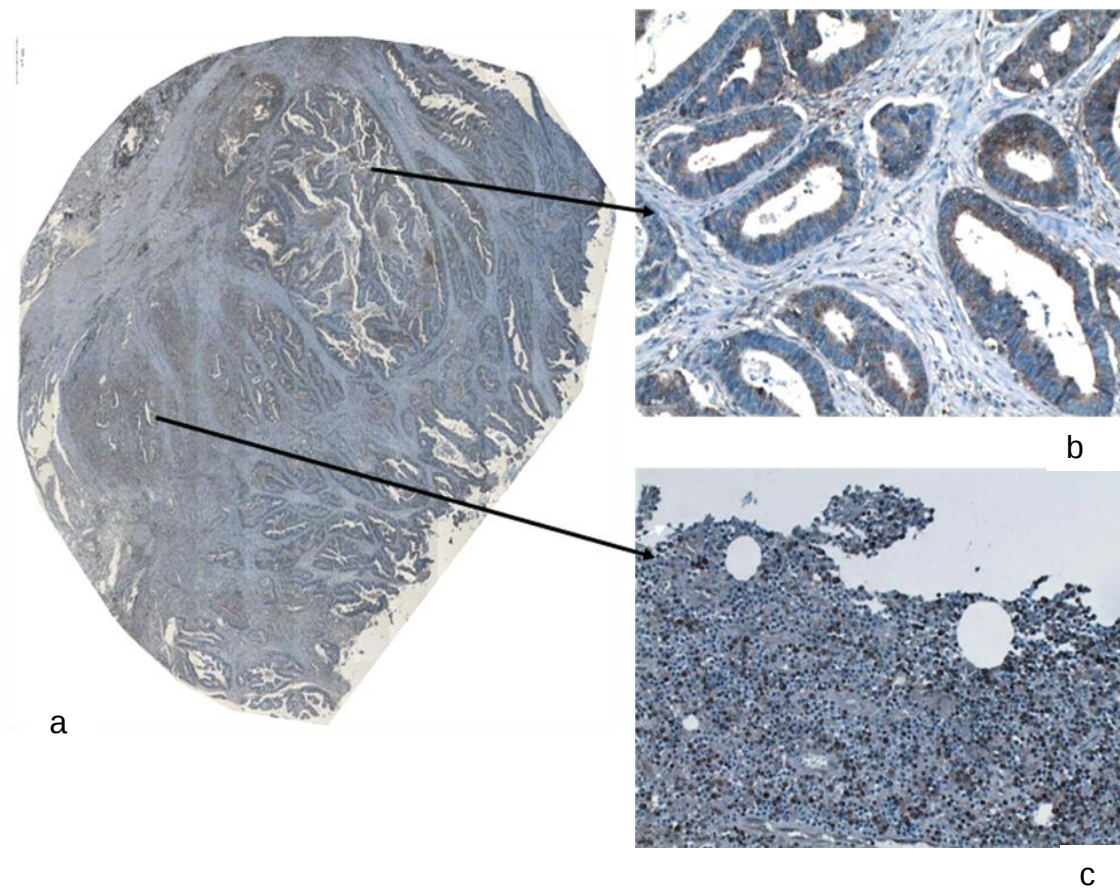


Abbildung 16: IHC-Färbung eines Gewebeschnittes eines gut differenzierten Kolonkarzinoms. Der Gesamtquerschnitt des Präparates ist gezeigt (a) OATP4A1-Expression in glandulär angeordneten Tumorzellen (b) und in Immunzellen (c). Die Pfeile zeigen die Lokalisation der Ausschnitte im Gesamtpräparat an. Bild: 10-fache (a) und 20-fache Vergrößerung (b,c)

Bei der statistischen Auswertung mit dem Programm GraphPad-Prism wurden die Patienten, die ein Rezidiv innerhalb der ersten fünf Jahre nach Erstdiagnose erlitten und die Patienten ohne Rezidiv getrennt analysiert und die Daten der zwei Gruppen verglichen. Die Patientenzahl in der Gruppe der Rezidiv-Patienten fasste 34 und die der Nicht-Rezidiv-Patienten 104 Personen. Nach der Zuordnung wurde auf signifikante Unterschiede zwischen Rezidiv- und Nicht-Rezidiv-Patienten in den einzelnen Zellgruppen geprüft.

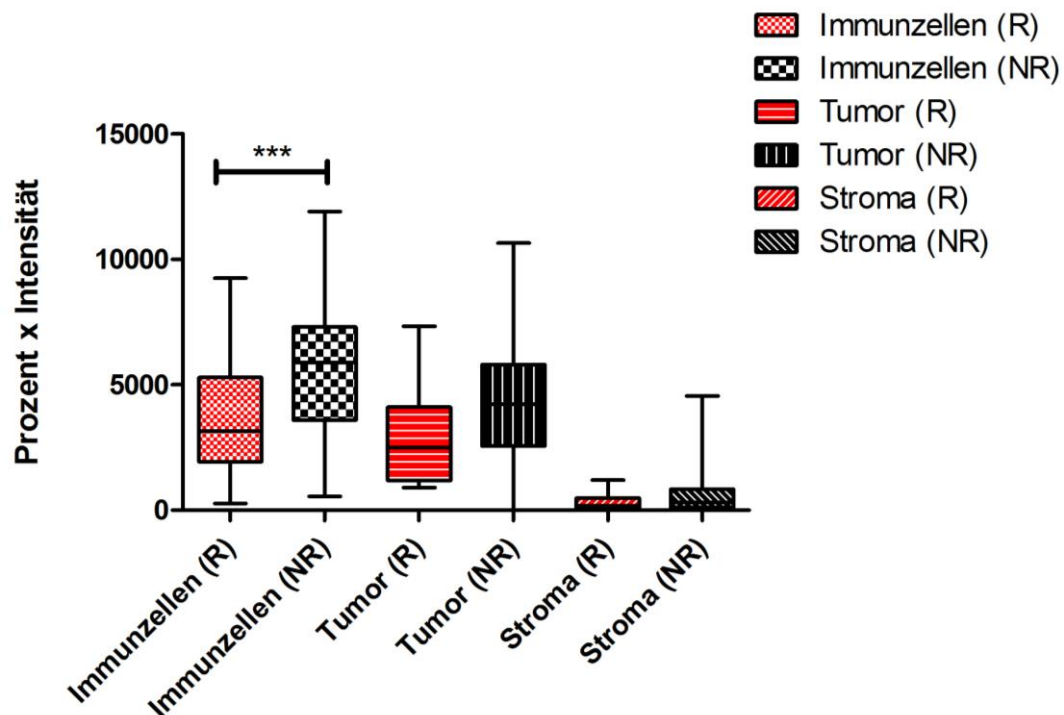


Abbildung 17: Boxplot der OATP4A1-Expression bei Rezidiv- (R) und Nicht-Rezidiv-(NR) Patienten (Boxplot mit Medianen, Intervall von 10-90%). Es besteht ein signifikanter Unterschied der OATP4A1-Expression zwischen Immunzellen in Gewebeproben von R- und NR-Patienten, zusätzlich konnte eine signifikant erhöhte OATP4A1-Expression in Immun- und Tumorzellen im Vergleich zu Stromazellen festgestellt werden.

Tabelle 6: Mittelwerte (Mean) der statistischen Evaluierung der OATP4A1-Expression bei R- und NR-Patienten +/- der Standardabweichung (S.D). Durchgeführt wurde diese mit dem Mann-Whitney-U-Test (Immunzellen: ***p=0,0001), dem One-way Anova und dem Dunn's Multiple Comparison Test (Tumor- und Stromazellen: *p=0,05; **p=0,01; ***p=0,001).

Rezidiv innerhalb von 5 Jahren OATP4A1-Spiegel	Nein Mean ± S.D.	Ja Mean ± S.D.
Immunzellen	5608 ± 2587	3559 ± 2128***
Tumorzellen	4380 ± 2308	3024 ± 2007
Stromazellen	660 ± 865	312 ± 326

Wie aus der Graphik in Abbildung 17 und der Tabelle 6 zu entnehmen, besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der OATP4A1-Expression in Immunzellen der beiden Gruppen. Patienten, die kein Rezidiv entwickelten, haben ein signifikant höheres Vorkommen an OATP4A1-Transportern als Patienten mit Rezidiv. Dies zeigt, dass OATP4A1 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der gegen das Karzinom gerichteten immunologischen Umgebung zu spielen scheint. Die Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv zu entwickeln, wird durch die verstärkte Expression vermindert und die Überlebensrate der Patienten somit erhöht.

Bei Tumorzellen lässt sich zwar eine Tendenz einer höheren Expression in der Gruppe der Patienten ohne Rezidive im Vergleich zur Gruppe der Patienten mit Rezidiven erkennen, jedoch konnte keine Signifikanz im Vergleich der beiden Gruppen durch die beträchtliche Streuung der Werte in den Tumorregionen der einzelnen Präparate erreicht werden.

Ein Unterschied ergab sich in der Expression von OATP4A1 zwischen den Stromazellen und den Immun- und Tumorzellen von Rezidiv- und auch von Nicht-Rezidivpatienten. Der hohe Gehalt an immunoreaktiven OATP4A1 in Tumor- und Immunzellen zeigt einen signifikanten Unterschied zur sehr geringen Expression in den Stromazellen.

4.2 Unterschiede der OATP4A1-Expression in den Tumorstadien UICC I, II und III

Um eventuelle Unterschiede der OATP4A1-Spiegel zwischen den Tumorstadien UICC I, II und III zu erkennen, wurden die Patienten anhand der Daten zur Tumorprogression nach der TNM-Klassifikation unterteilt. Die statistische Analyse des OATP4A1-Vorkommens in den 3 UICC-Stadien lieferte jedoch keine signifikanten Ergebnisse. OAT4A1-Transporter scheinen demzufolge beim Prozess der Tumorprogression unverändert zu bleiben und daher auch in diese Prozesse nicht involviert zu sein.

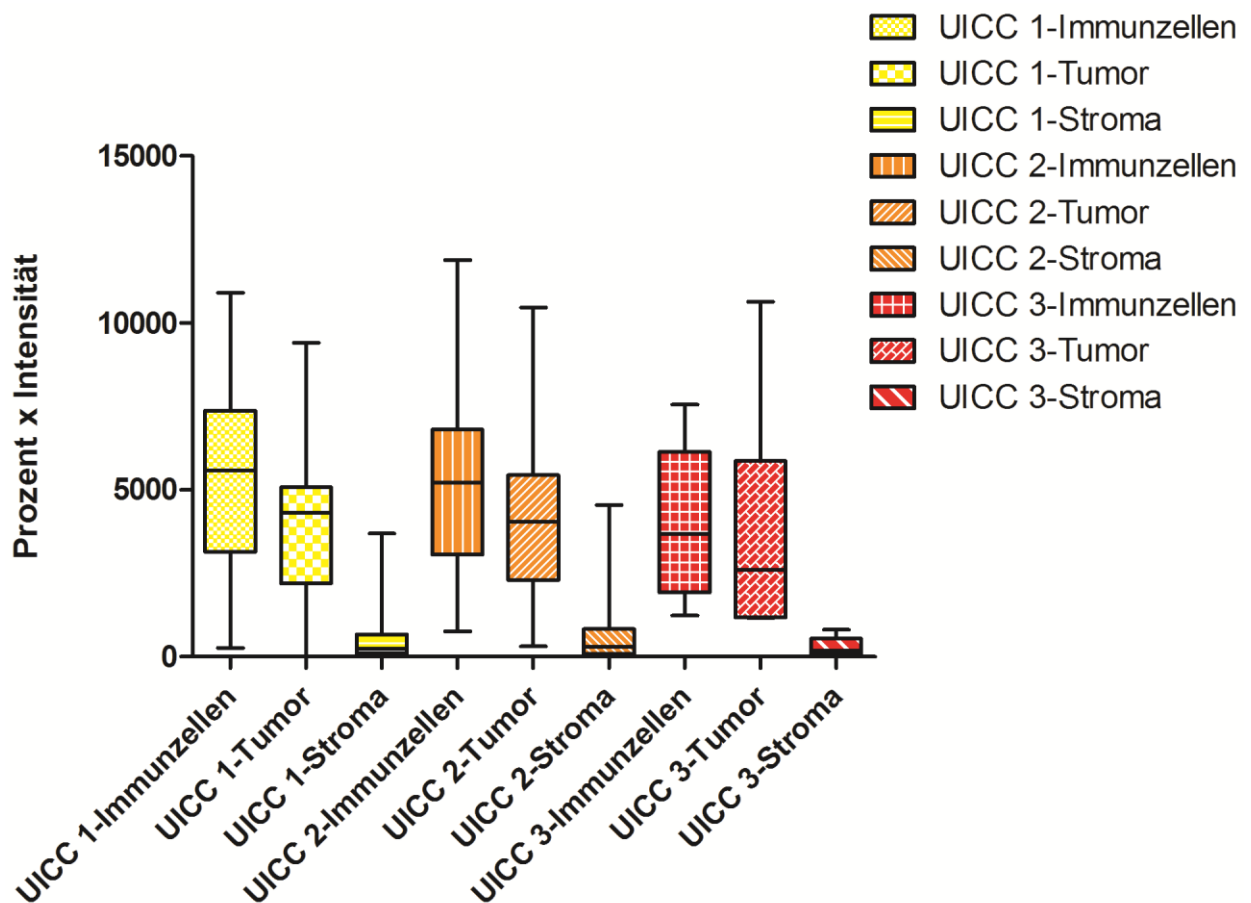


Abbildung 18: Boxplot der OATP4A1-Expression in den Tumorstadien UICC I, II und III (Boxplot mit Medianen, Intervall von 10-90%). Zwischen den drei Stadien besteht kein signifikanter Unterschied der OATP4A1-Expression, obwohl eine Tendenz zu einer abnehmenden OATP4A1 Expression mit einem Gefälle von Stadium I zu Stadium III zu beobachten ist. Innerhalb jedes Tumorstadiums erkennt man auch wieder die geringere Expression in den Stromazellen im Vergleich zu einem signifikant höheren OATP4A1-Spiegel in Tumor- und Immunzellen.

4.3 OATP4A1-Expression bei nicht-maligner Divertikulitis

Um auch den Vergleich der OATP4A1-Expression zwischen nicht-malignen und malignen Erkrankungen des Kolon zu untersuchen, wurden acht Gewebeschnitte von Patienten mit entzündlicher Divertikulitis mit einem Antikörper gegen OATP4A1 geprobt. Es zeigte sich, dass die Epithelzellen der Krypten im nicht-malignen Kolon signifikant geringere Spiegel des Transporters aufwiesen als dies in den Immunzellen dieser Präparate der Fall war. Die niedrigsten Spiegel an OATP4A1 waren im Stroma zu finden.

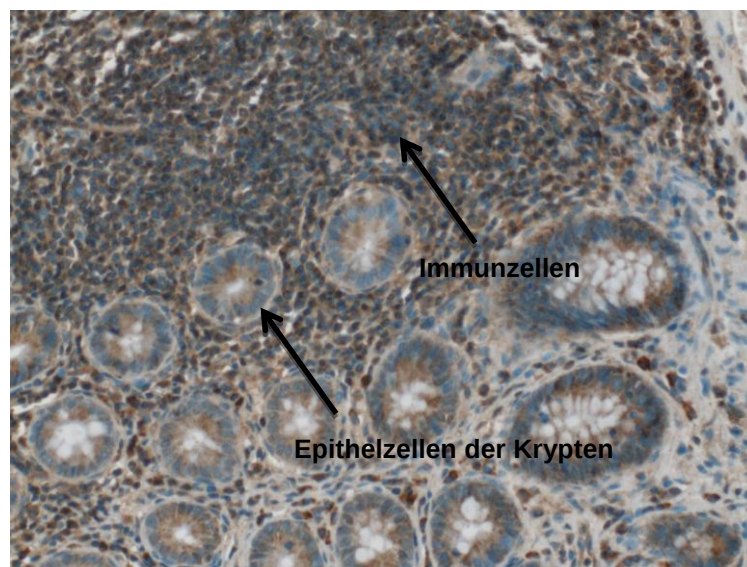


Abbildung 19: Immunhistochemisch gefärbter Gewebeschnitt eines Patienten mit entzündlicher Divertikulitis. Die Epithelzellen der Krypten von Patienten mit Divertikulitis zeigen einen signifikant erniedrigten OATP4A1-Spiegel im Vergleich zu den angrenzenden Immunzellen.

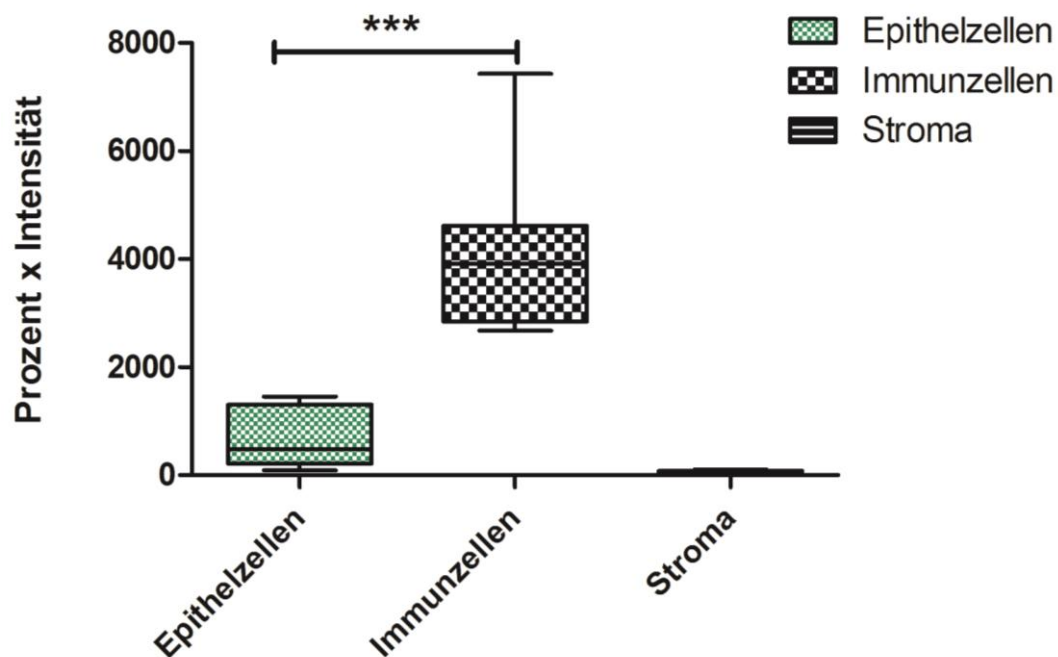


Abbildung 20: Boxplot der OATP4A1-Expression in Epithel-, Immun- und Stromazellen bei Patienten mit entzündlicher Divertikulitis. (Boxplot mit Medianen, Intervall 10-90%). Es besteht ein signifikant erniedrigtes Vorkommen an OATP4A1 in den Epithelzellen der Krypten im Vergleich zu angrenzenden Immunzellen (** $p=0,0002$).

Tabelle 7: Mittelwerte (Mean) der statistischen Evaluierung der OATP4A1-Expression bei Patienten mit entzündlicher Divertikulitis +/- der Standardabweichung (S.D). Durchgeführt wurde diese mit dem Mann-Whitney-U-Test (Epithel- und Immunzellen: *** $p=0,0002$), dem One-way Anova und dem Dunn's Multiple Comparision Test (Epithel-, Immun- und Stromazellen: * $p=0,05$; ** $p=0,01$; *** $p=0,001$).

<u>OATP4A1-Spiegel</u>	<u>Mean $\pm$ S.D.</u>
Epithelzellen	684,9 $\pm$ 535,4
Immunzellen	4124 $\pm$ 1544
Stromazellen	34,50 $\pm$ 45,98

4.4 OATP4A1-Expression in malignem Gewebe im Vergleich zu nicht-malignem Gewebe

Für den Vergleich des OATP4A1-Levels in Immun-, Tumor- und Epithelzellen wurden Gewebeschnitte von 103 Patienten mit kolorektalem Karzinom und acht Schnitte von Patienten mit inflammatorischer Divertikulitis immunhistochemisch gefärbt und analysiert. Die Epithelzellen der Krypten zeigen eine sehr schwache Färbung mit dem Anti-SLCO4A1-Antikörpers (braun), welche im Gegensatz zu den sehr stark gefärbten Immunzellen im Karzinom (Abbildung 22) als auch im nicht-malignen Gewebe (Abbildung 21) steht.

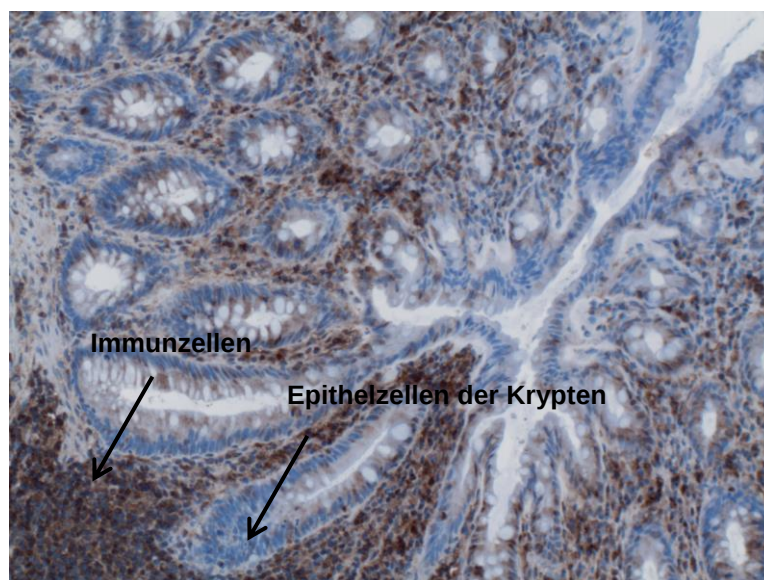


Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung eines nicht-malignen Kolon-Gewebeschnittes eines Patienten mit entzündlicher Divertikulitis. In den Epithelzellen der Krypten ist signifikant weniger OATP4A1 nachweisbar als in den stark braun gefärbten Immunzellen, welche die Krypten umgeben. Bild: 10-fache Vergrößerung

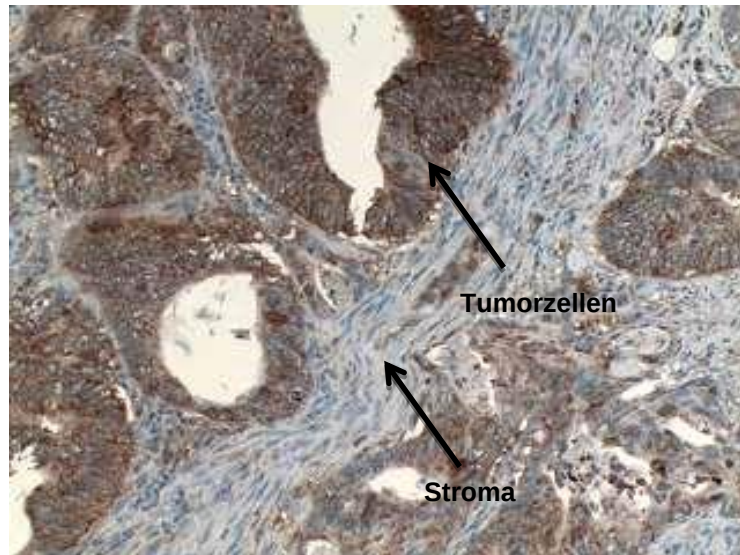


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung eines Tumor-Gewebeschnittes. Es besteht starke OATP4A1-Expression in Tumorzellen. Visualisierung des OATP4A1-Transporters durch Braunfärbung der Tumorzellen in den Krypten. Bild: 20-fache Vergrößerung

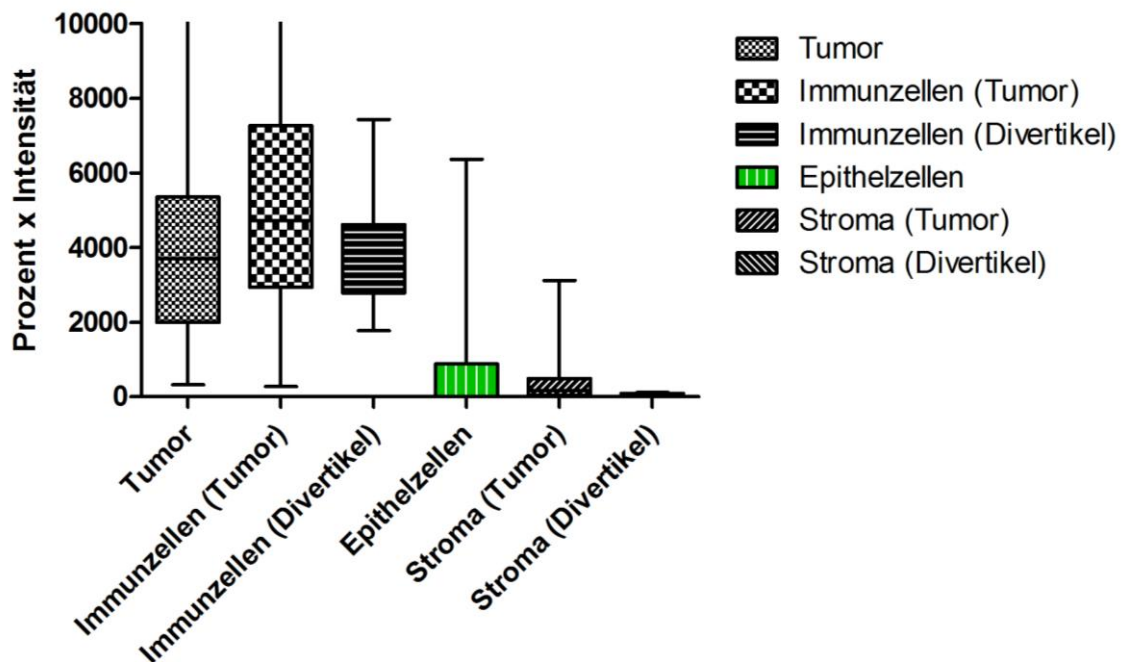


Abbildung 23: Boxplot der OATP4A1-Expression in Tumor-, Immun-, Epithel- und Stromazellen von Patienten mit entzündlicher Divertikulitis im Vergleich mit Gewebeschnitten von Patienten mit kolorektalem Karzinom. (Boxplot mit Medianen, Intervall 10-90%). Die OATP4A1-Expression von Tumorzellen und Immunzellen im Divertikel- und Tumorgewebe ist signifikant höher als die der Epithelzellen der Krypten.

Tabelle 8: Mittelwerte (Mean) der statistischen Evaluierung der OATP4A1-Expression bei Patienten mit entzündlicher Divertikulitis im Vergleich mit Gewebeschnitten von Patienten mit kolorektalem Karzinom +/- der Standardabweichung (S.D). Durchgeführt wurde diese mit dem One-way Anova und dem Dunn's Multiple Comparision Test (*p=0,05; **p=0,01; ***p=0,001).

<u>OATP4A1-Spiegel</u>	<u>Mean ± S.D.</u>
Epithelzellen	692 ± 1346
Tumorzellen	4011 ± 2460***
Immunzellen (Tumor)	5005 ± 2748***
<u>Immunzellen (Divertikulitis)</u>	<u>3999 ± 1702***</u>

4.5 Identifizierung der OATP4A1-exprimierenden Immunzellen

Zur Identifizierung der OATP4A1-exprimierenden Immunzellen wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen durchgeführt. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 7 und 8 des Appendix aufgelistet. Die zellspezifischen Antikörper, Anti-CD20, Anti-CD34, Anti-CD44, Anti-CD45, Anti-CD68 und Mastzell-Tryptase, wurden mit dem rot fluoreszierenden Sekundärantikörper (Anti-Mouse IgG) Alexa-Fluor 568 visualisiert. OATP4A1 wurde mit dem grün fluoreszierenden Sekundärantikörper (Anti-Rabbit-IgG) Alexa-Fluor 488 markiert. Erscheinen gefärbte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit der Farbe Gelb, so bedeutet dies, dass diese Zellen auf beide Antikörper reagiert haben, somit eine Überlappung beider Farbstoffe vorliegt und diese Zellen OATP4A1-Expression aufweisen.

4.5.1 Nachweis von OATP4A1 auf B-Lymphozyten mittels CD20

CD20 ist ein glykosyliertes Phosphoprotein auf der Oberfläche von B-Lymphozyten und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen. Exprimiert wird es auf B-Zellen aller Stadien mit Ausnahme der ersten Entwicklungsstufe, den frühen Pro-B-Zellen und der letzten, den reifen Plasmazellen. CD20 ist somit von den späten Pro-B-Zellen bis zu den Gedächtniszellen als Protein der Zelloberfläche präsent (Liang Y., Tedder T.F, 2001; Tedder T.F. et al., 1988). In der Immunhistochemie ist CD20 daher zur Detektion von B-Lymphozyten in histologischen Gewebeschnitten geeignet.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurden Gewebeschnitte von Divertikulitis- und Karzinompatienten mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung auf OATP4A1 und CD20 exprimierende Zellen untersucht. Sowohl im Tumorgewebe als auch in gesunden Darmabschnitten wurden Zellen mit diesem Expressionsmuster gefunden. Jedoch konnte festgestellt werden, dass im Tumorgewebe selbst kaum B-Lymphozyten vorhanden sind, sondern fast ausschließlich in angrenzendem noch gesundem Gewebe oder am Tumorrand (Abbildung 25). Auch hinsichtlich der Intensität der Färbung und der Häufigkeit des Auftretens von B-Zellen kann man zwischen malignem und nicht malignem Gewebe klare Unterschiede erkennen. B-

Zellen im Tumorgewebe exprimieren nur vereinzelt OATP4A1 (Abbildung 26), wohingegen nahezu alle B-Zellen in Gewebeproben von Divertikulitispatienten das Transporterprotein an ihrer Zelloberfläche tragen (Abbildung 27).

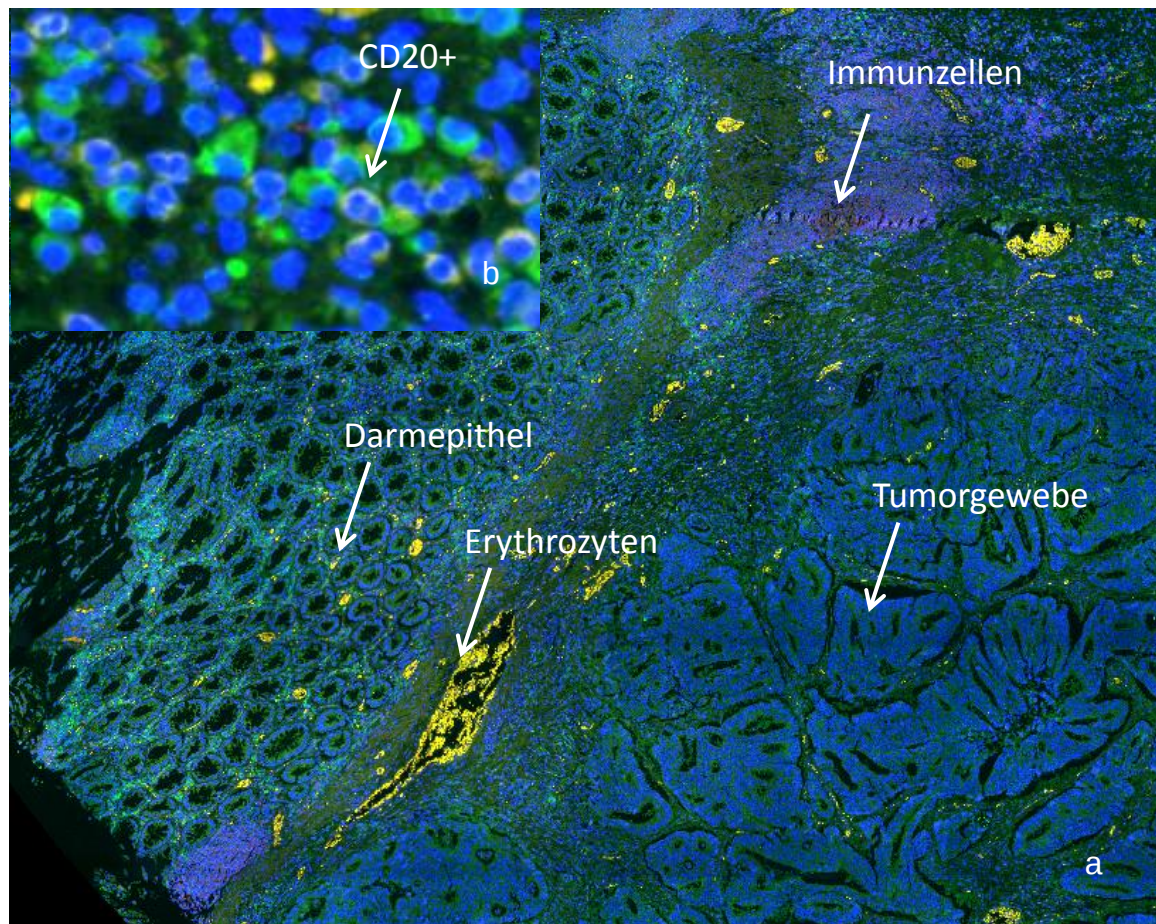


Abbildung 24: Identifizierung von OATP4A1-exprimierenden CD20+ B-Lymphozyten in Gewebeschnitten von Tumorpatienten. Die Pfeile deuten auf die unterschiedlichen Zellgruppen, die Epithelzellen, Tumor- und Immunzellen hin. Bild b zeigt einen Bildausschnitt der an das Tumorgewebe angrenzenden Immunzellanhäufung mit CD20+ B-Zellen, welche OATP4A1 exprimieren. Erythrozyten besitzen eine starke Autofluoreszenz und sind daher auffällig gelb gefärbt. Bild: 10-fache (a) und 20-fache (b) Vergrößerung

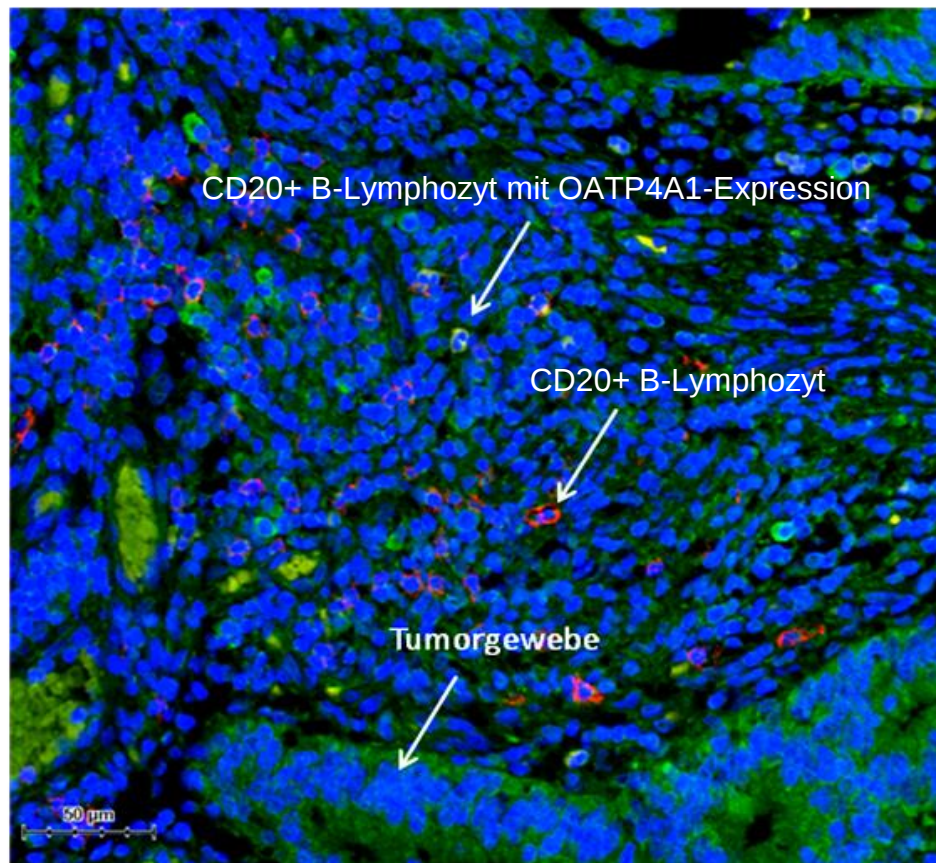


Abbildung 25: Identifizierung von OATP4A1-exprimierenden CD20+ B-Lymphozyten in Gewebeschnitten von Tumorpatienten. Anhand dieser Abbildung kann gezeigt werden, dass im Tumorgewebe nicht alle CD20+ B-Lymphozyten OATP4A1-Expression aufweisen. Bild: 20- fache Vergrößerung

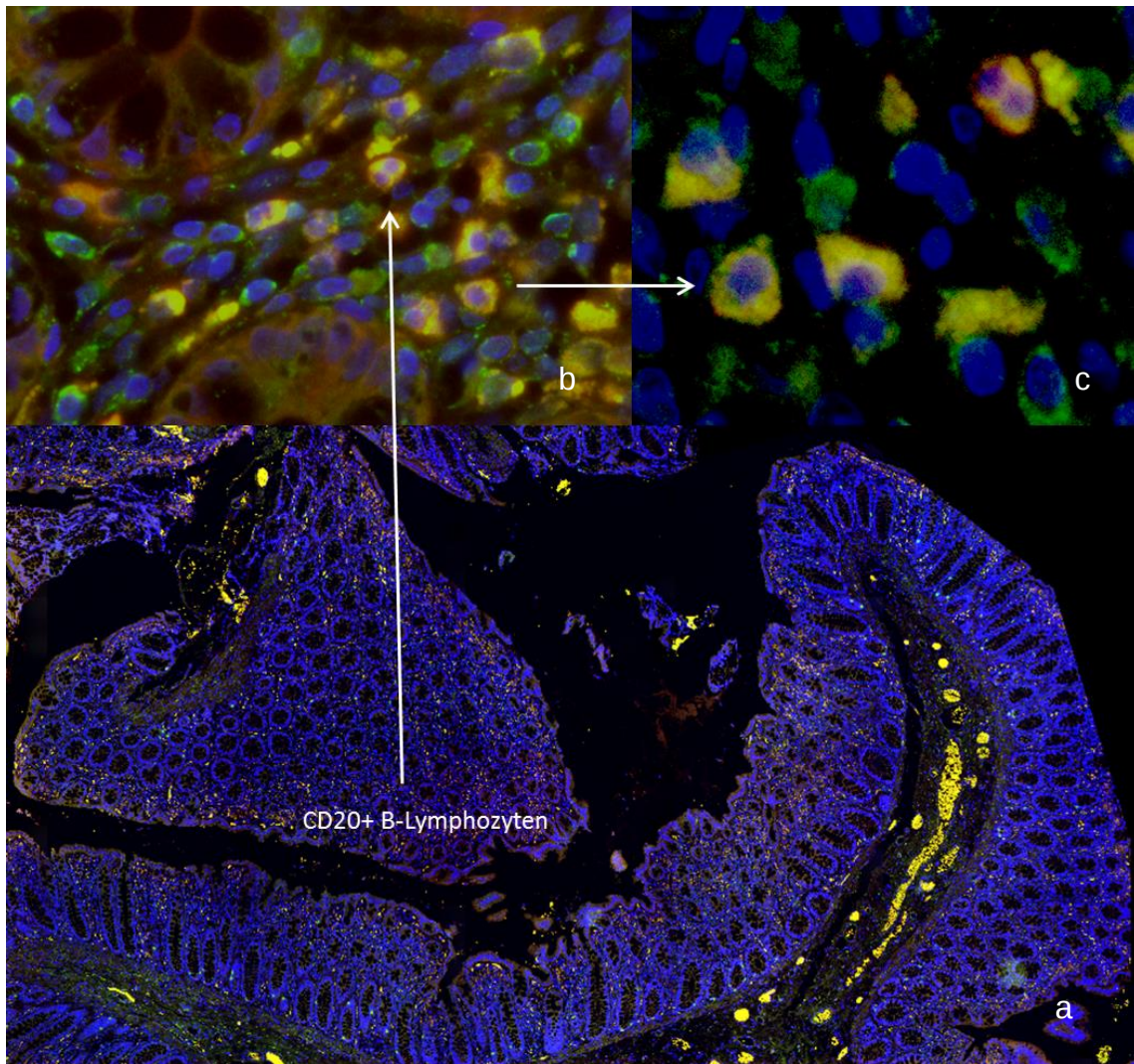


Abbildung 26: Identifizierung von OATP4A1-exprimierenden B-Lymphozyten in gesundem Darmgewebe. In benignem Gewebe weisen beinahe alle CD20+ B-Zellen OATP4A1-Expression auf. Bild: 10-fache (a) 20-fache (b) und 30-fache (c) Vergrößerung

4.5.2 Nachweis von OATP4A1 in Gefäß-Endothelzellen mittels CD34

CD34 wird von Endothelzellen kleiner Gefäße exprimiert, welche aus diesem Grund durch CD34-Antikörper detektiert werden können (www.genecards.org, 10.3.2013). Der durch den Sekundärantikörper Alexa-Fluor 568 visualisierte Primärantikörper scheint unter dem Fluoreszenzmikroskop rot. OATP4A1 ist mit dem grünen Sekundärantikörper Alexa-Fluor 488 markiert worden.

Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, kommt es zu keiner Überlappung der beiden

Farbstoffe, das heißt OATP4A1 zeigt keine Expression in Endothelzellen von Gefäßen.

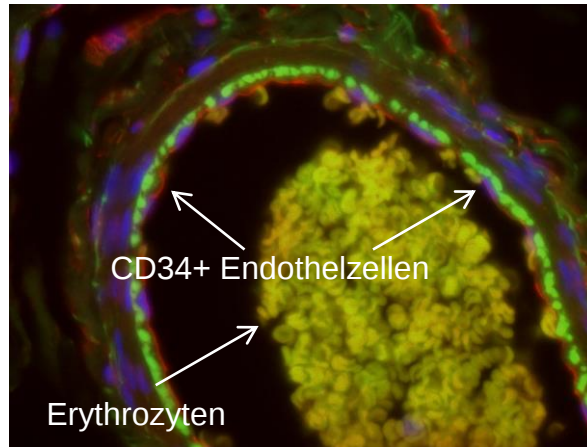


Abbildung 27: Identifizierung von OATP4A1-exprimierenden, CD34+ Endothelzellen in malignen Gewebeschnitten. Die rote Membranfärbung markiert CD34+ Endothelzellen, welche jedoch nicht mit dem OATP4A1-Antikörper reagiert haben. Endothelzellen exprimieren demnach keine Transportproteine vom Typ OATP4A1. Erythrozyten, welche sich im Lumen des Gefäßes befinden, besitzen starke Autofluoreszenz und erscheinen deshalb stark gelb. Die stark grün-gefärbte Schicht unter den Endothelzellen stellt das Myothel dar. Bild: 20-fache Vergrößerung

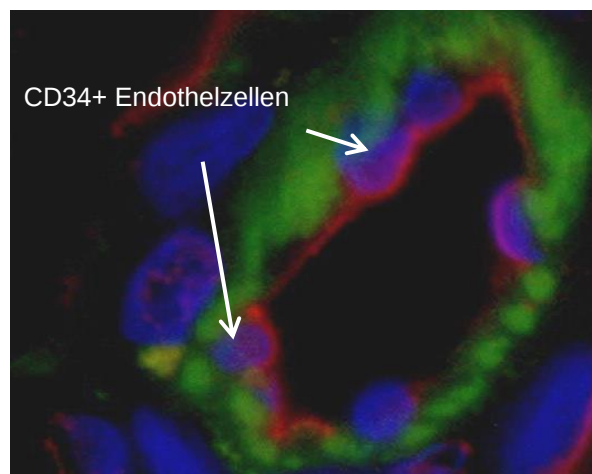


Abbildung 28: Visualisierung von CD34+ Gefäßendothelzellen in malignem Gewebe. Es kommt zu keiner Farbüberlappung mit dem Grün markierten OATP4A1. Die stark grün-gefärbte Gefäßschicht stellt das Myothel dar. Bild: 40-fache Vergrößerung

4.5.3 Nachweis von OATP4A1 auf T-Zellen mittels CD44

CD44 ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche und wird auf Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten exprimiert. Es stellt einen Rezeptor für Hyaluronsäure dar, kann aber auch mit anderen Liganden, wie Osteopontin, Kollagen und Matrix Metalloproteinasen interagieren. CD44 ist in Prozesse der Zell-Zell-Interaktion, der Zelladhäsion und der Migration involviert. Die Expression ist bei der T-Zellaktivierung, besonders bei inflammatorischer Immunantwort, erhöht. In der Immunhistochemie werden CD44-Antikörper zur Visualisierung von Effektor-Gedächtnis T-Zellen verwendet (Naor D. et al., 1997).

Gewebeschnitte von Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden hinsichtlich ihres Auftretens von OATP4A1 exprimierenden T-Zellen überprüft. Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, kommt es zu keiner Farbüberlagerung auf den rot markierten T-Zellen mit den grün erscheinenden OATP4A1-Transportern. Im Gegensatz zu den stark grün gefärbten Tumorzellen exprimieren T-Zellen kein OATP4A1 auf ihrer Zelloberfläche.

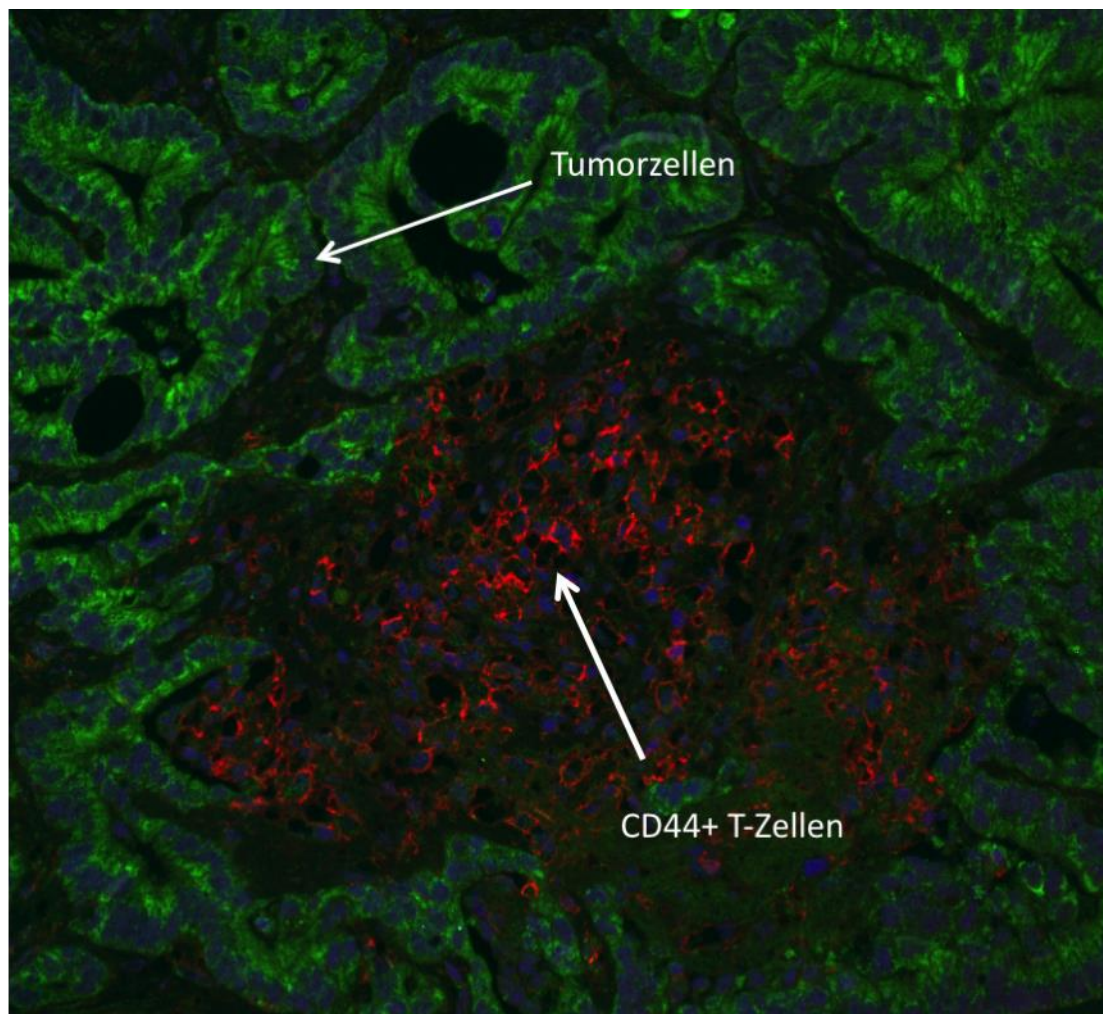


Abbildung 29: Visualisierung von CD44-markierten T-Zellen in malignem Gewebe mithilfe des rot fluoreszierenden Farbstoffes Alexa 568. Es kommt zu keiner Überlappung mit OATP4A1 (grün), welcher hingegen im Tumorgewebe stark exprimiert ist. Bild: 20-fache Vergrößerung

4.5.4 Nachweis von OATP4A1 auf Leukozyten mittels CD45

CD45 ist ein Protein aus der Familie der Protein Tyrosin Phosphatasen, Signalmoleküle, welche eine Vielzahl an zellulären Prozessen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Mitose und onkogene Transformationen regulieren. Es existieren mehrere Isoformen dieses Proteins, welches auf allen hämatopoetischen Zellen mit Ausnahme von Erythrozyten und Plasmazellen exprimiert wird und als Co-Stimulator zu deren Aktivierung führt (Zikherman J. et al., 2013).

Gefärbt wurden Gewebsschnitte von Karzinompatienten zur Detektion OATP4A1 exprimierender Leukozyten. Wie in Abbildung 31 zu erkennen ist, kommt es zur Farbüberlappung der beiden fluoreszierenden Antikörper, was auf ein Vorhandensein von OATP4A1 auf der Zellmembran von Leukozyten schließen lässt. Die markierten Immunzellen sind jedoch, wie auch bei CD20 markierten Lymphozyten, nur am Tumorrand oder in angrenzendem gesunden Gewebe lokalisiert.

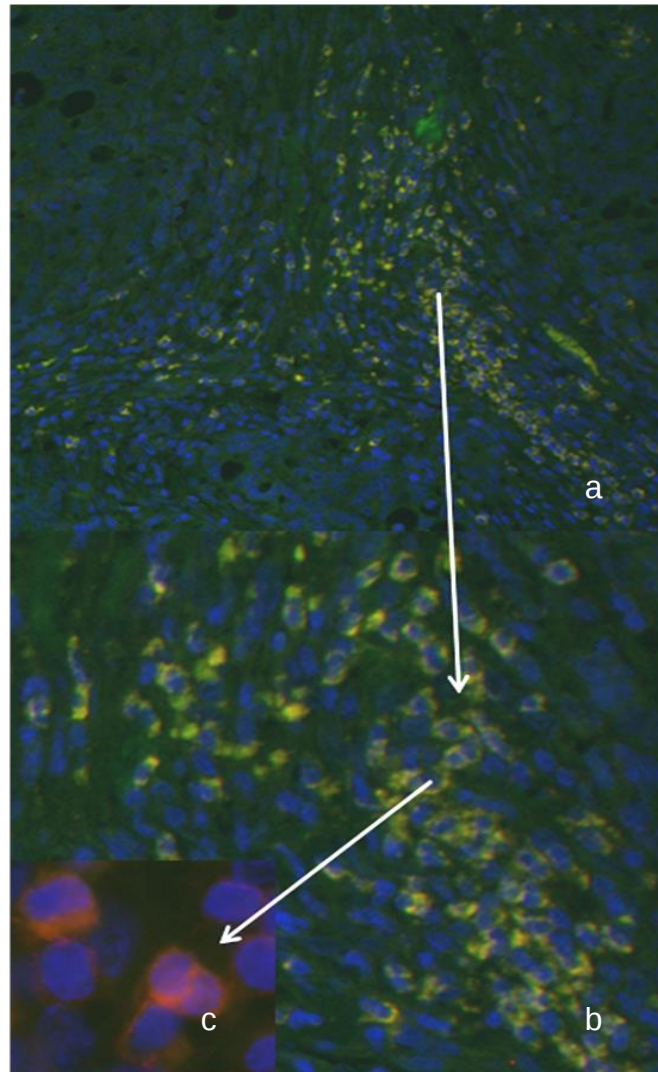


Abbildung 30: Identifizierung von OATP4A1 positiven, CD45 markierten Leukozyten in malignem Gewebe. Die Pfeile zeigen auf die doppelt gefärbten Leukozyten, welche OATP4A1-Expression aufweisen. Dazwischen liegen zahlreiche stark gelb-gefärbte Erythrozyten. Bild: 10-fache (a), 20-fache (b) und 40-fache (c) Vergrößerung

4.5.5 Nachweis von OATP4A1 auf Makrophagen mittels CD68

CD68 ist ein hoch glykosyliertes Typ 1 Transmembranglykoprotein, dessen Funktion noch weitgehend unbekannt ist. Es repräsentiert in der Immunhistologie das klassische Markermolekül für humane Monozyten und Gewebsmakrophagen. Neue immunohistochemische Studien haben jedoch gezeigt, dass CD68 Antikörper auch mit anderen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zelltypen reagieren können. Detektiert wurden diese Reaktionen in Fibroblasten, Endothelzellen, und Tumorzellen, allerdings mit stark variierender und schwächerer Spezifität und Intensität der Färbung (Gottfried E. et al., 2008; Strobl C. et al., 1995).

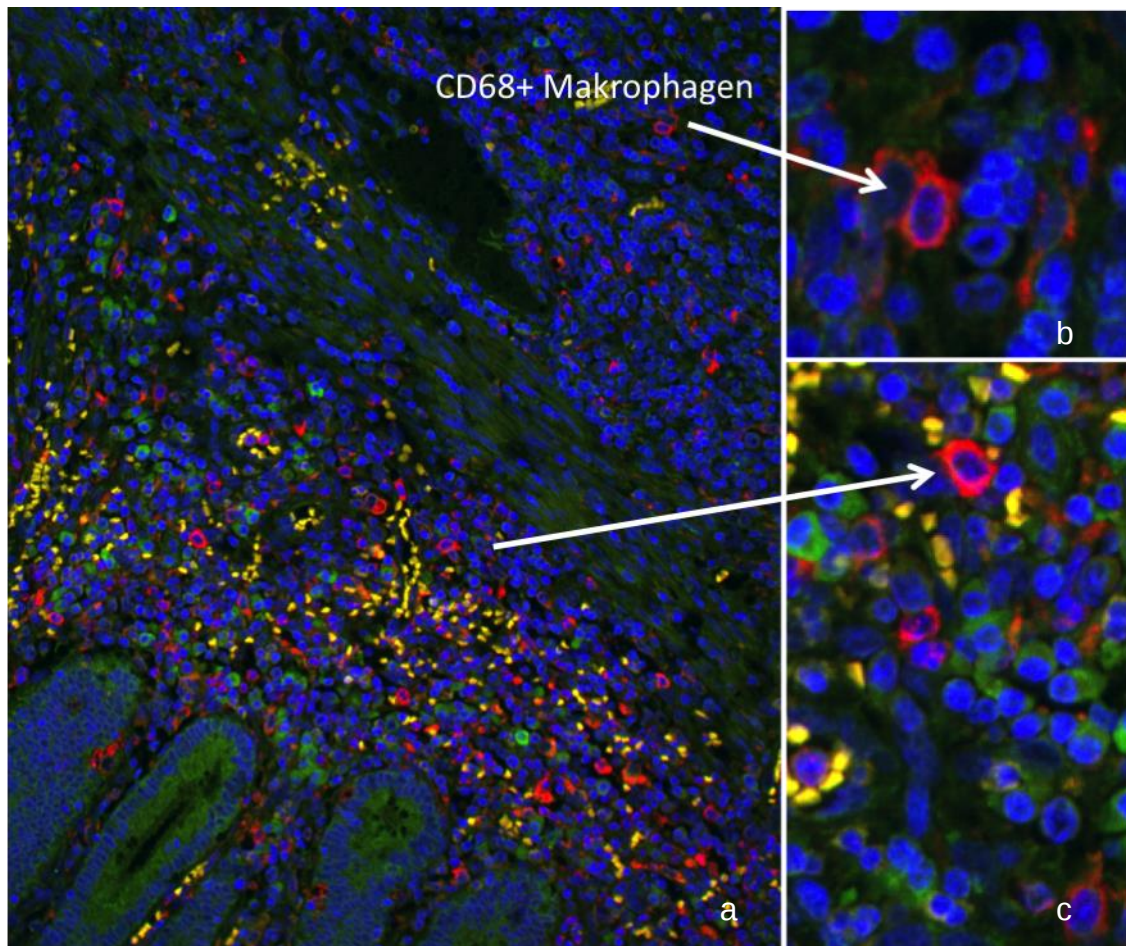


Abbildung 31: Visualisierung von CD68+ Makrophagen in malignem Gewebe. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass CD68+ Makrophagen keine OATP4A1 Expression zeigen, da es zu keiner Überlappung der beiden Fluoreszenzfarbstoffe kommt. Die Pfeile deuten auf Bildausschnitte der CD68+ Makrophagen. Die stark gelb-gefärbten Zellen sind autofluoreszierende Erythrozyten. Bild: 10-fache (a) und 40-fache (b,c) Vergrößerung

Immunfluoreszenz gefärbte Kolongewebeschnitte liefern kaum Hinweise auf OATP4A1-Expression in Makrophagen (Abbildung 32). In den meisten CD68-positiven Zellen kommt es zu keiner Farbüberlagerung der beiden fluoreszenzmarkierten Antikörper.

4.5.6 Nachweis von OATP4A1 auf Mastzellen mittels Mastzell-Tryptase

Mastzellen spielen durch ihre Fähigkeit zur Degranulation eine zentrale Rolle bei entzündlichen allergischen Reaktionen. Die Freisetzung von Beta-Tryptase, einer neutralen Serinprotease, aus den sekretorischen Granula ist ein charakteristisches Merkmal der Mastzelldegranulation. Die biologische Funktion der Mastzell Tryptase konnte noch nicht zur Gänze aufgeklärt werden, jedoch scheint sie entscheidend in inflammatorische Prozesse involviert zu sein und einen geeigneten Marker für aktivierte Mastzellen darzustellen (Payne V. und Kam P.C., 2004).

Durch Immunofluoreszenz-Doppelfärbung an Gewebeschnitten von Divertikulitispatienten konnte festgestellt werden, dass aktivierte Mastzellen an ihrer Zelloberfläche kein OATP4A1 exprimieren. Der grün-markierte OATP4A1-Antikörper reagierte nicht mit den rot-markierten Mastzellen.

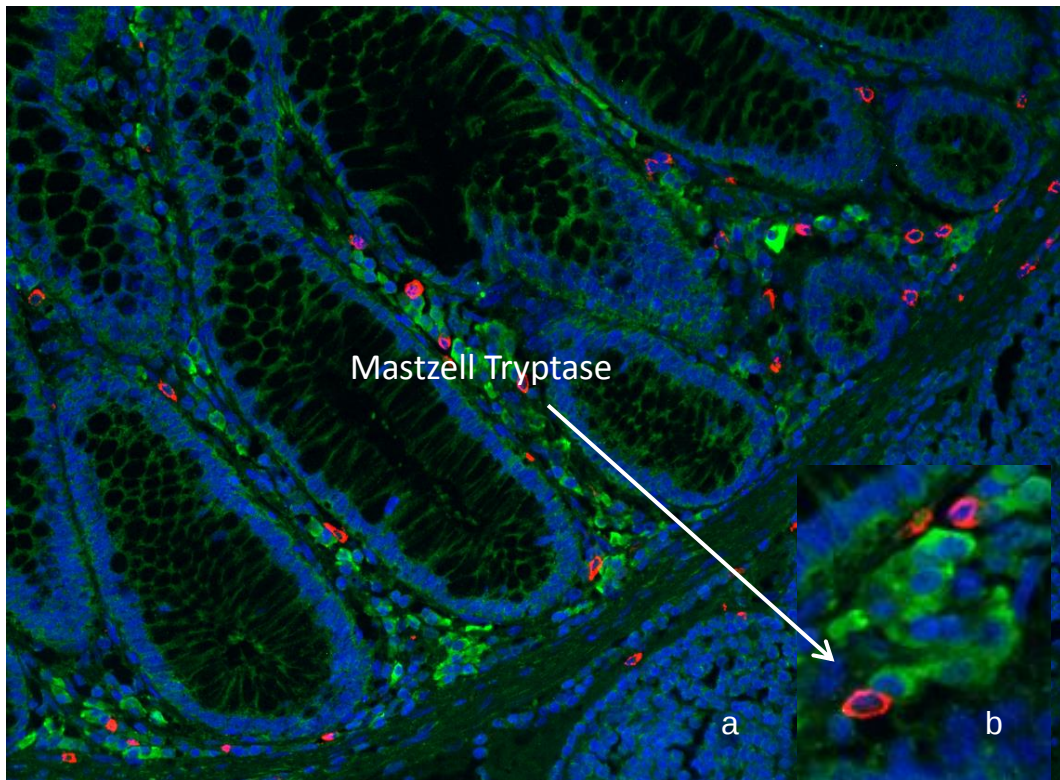


Abbildung 32: Visualisierung von Mastzellen in benignen Geweben. An der rot-markierten Oberfläche von Mastzellen kommt es zu keiner Farbüberlagerung mit dem grün-markierten OATP4A1-Antikörper. Aktivierte Mastzellen exprimieren demnach kein OATP4A1 an ihrer Zellmembran. Bild: 10-fache (a) und 20-fache (b) Vergrößerung

5. ZUSAMMENFASSUNG

OATPs sind membrangebundene Transportermoleküle, die eine wichtige Rolle bei der Absorption von Arzneistoffen und biologisch aktiven Verbindungen im Intestinaltrakt, bei der Regulierung der zellulären Akkumulation von Hormonen, „Second-messenger“-Proteinen und zyklischen Nukleotiden spielen. Die Expression der OATPs in gesundem Gewebe unterscheidet sich von der im pathologisch veränderten Gewebe erheblich. So sind einige OATPs in bestimmten Karzinomen in hoher Konzentration exprimiert, während andere nach maligner Transformation der Zellen nicht mehr exprimiert werden. Diese unterschiedliche Expression einzelner OATPs kann daher die intrazelluläre Konzentration von Zytostatika beeinflussen und deren Effektivität wesentlich verändern. Aber auch die Akkumulation endogener Verbindungen wie Prostaglandinen, Hormonen, Gewebsfaktoren, Peptiden etc. in den Tumorzellen, die über spezifische OATPs transportiert werden, kann das Wachstum der Zellen beeinflussen (Buxhofer-Ausch V. et al., 2013).

Beim kolorektalen Karzinom wurde gezeigt, dass die Expression von OATP1B3, welches im gesunden Organismus nur in der Leber in höherer Konzentration vorkommt, bei diesen Tumoren auch in den Tumorzellen in hoher Konzentration vorhanden ist. Dies scheint zwar nach der Behandlung mit bestimmten Zytostatika die rezidivfreie Überlebenszeit zu verlängern, führt aber insgesamt zu keiner Verbesserung der Prognose hinsichtlich der Entwicklung eines Rezidivs oder einer Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit (Lee W. et al., 2008; Lockhart A. et al., 2008).

Daten zur Expression des OATP4A1 Transporterproteins und dessen Einfluss auf klinische Parameter beim kolorektalen Karzinom sind bis dato kaum vorhanden. Frühere Studien zeigten aber eine erhöhte Expression von OATP4A1 bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Dies scheint mit dem erhöhten Risiko ein kolorektales Karzinom zu entwickeln in Beziehung zu stehen. Man nimmt an, dass es eine Verbindung zwischen der Expression von OATP4A1 und dem Risiko

der Entwicklung eines malignen Tumors im Kolon und Rektum zu geben scheint (Ancona N. et al., 2006; Wojtal K. A. et al., 2009). Dem OATP4A1 Transporter wird auch eine Funktion bei der Clearance von verschiedenen Verbindungen durch das Darmepithel zugeschrieben. Es wird auch zum Teil für die Schaffung eines potentiell onkogenen und zytotoxischen Milieus verantwortlich gemacht (Peddareddigari V.G., et al., 2010).

Ziel der Arbeit war es nun, die Lokalisation und den Gehalt von OATP4A1 in Gewebeschnitten von Patienten mit kolorektalen Karzinomen zu untersuchen. Zum Vergleich wurden nicht-maligne Gewebeproben von Patienten mit Divertikulitis analysiert. Das OATP4A1-Transporterprotein könnte einen potentiell prognostischen Faktor und ein therapeutisches Target für immunstimulierende Arzneistoffe für maligne und nicht-maligne entzündliche Erkrankungen des Kolons darstellen.

Nach immunhistochemischer Färbung ergab die statistische Auswertung einen signifikant erhöhten Gehalt an OATP4A1 in Tumor- und Immunzellen im Vergleich zu den Zellen im Stroma. Auch gegenüber der Expression in Epithelzellen des nicht-malignen Gewebes ist die OATP4A1 Konzentration signifikant erhöht. Dies zeigt, dass große Unterschiede im Expressionsmuster und im Gehalt an OATP4A1 zwischen malignem und gesundem Gewebe bestehen.

Anhand klinischer Daten wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt: i) Patienten, welche innerhalb von fünf Jahren an einem Rezidiv erkrankten und ii) Patienten, bei denen in diesen fünf Jahren kein Rezidiv festgestellt werden konnte. Interessanterweise war der Gehalt an OATP4A1 in den Immunzellen am höchsten. Dieser war in den Immunzellen von Patienten ohne Rezidiv im Vergleich zu den Patienten mit Rezidiv, signifikant erhöht. Dies erlaubt den Schluss, dass OATP4A1 bei der Aktivierung des Immunsystems wichtig ist. Immunzellen, welche sich gegen das Karzinom richten und an der Tumorabwehr entscheidend beteiligt sind, dürften mithilfe von OATP4A1 aktiviert werden. Ob dabei OATP4A1 ein endogenes Substrat, dass für die Immunzellaktivierung wichtig ist, in die Zelle transportiert, bleibt zu untersuchen.

Aufgrund der hohen Expressionsrate von OATP4A1 in den Immunzellen wurden anschließend zur genauen Identifikation der OATP4A1-positiven Immunzellen Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit spezifischen Immunzellmarkern durchgeführt. Auf der Zellmembran von CD44+ T-Zellen, CD68+ Makrophagen und Mastzellen konnten keine OATP4A1 Transporter festgestellt werden. Positive Resultate lieferte die Fluoreszenzfärbung zur Detektion von OATP4A1 auf CD20+ B-Zellen und CD45+ Lymphozyten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass OATP4A1 durch das erhöhte Vorkommen im Tumorgewebe einen prognostischen Marker darstellen könnte. Des Weiteren impliziert der signifikante Unterschied zwischen der Expression von OATP4A1 in den Immunzellen von Rezidiv- und Nicht-Rezidiv-Patienten eine wichtige Funktion des Transporters bei der Tumorabwehr durch Immunzellen. OATP4A1 könnte daher ein potentielles Target in der Immuntherapie von Tumoren und entzündlichen Darmerkrankungen darstellen. Daher könnten die in dieser Studie gezeigten Ergebnisse bei der Entwicklung neuer immunstimulierender Wirkstoffe wichtige Ansatzpunkte liefern.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Antigen-presenting cell
APC-Protein	adenomatöses Polyposis Coli-Protein
Ak	Antikörper
BSA	bovine Serum Albumin
BSP	Bromosulphophthalein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CEA	carcinoembryonic antigen
CCSA-2	Colon Cancer specific antigen-2
CD	Cluster of differentiation
CTLA-4	cytotoxische T-Lymphozyten Antigen-4
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DC	Dendritische Zellen
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DNP-Glutathion	Dinitrophenyl-Glutathion
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
FOV	field of view
HLA	humanes Leukozytenantigen
HNPCC	hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom
HRP	horse radish peroxidase
K-ras	Kirsten rat sarcoma viral Oncogen
M2-PK	Pyruvatkinase M2
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OATP	Organic anion transporting polypeptide
PBS	Phosphate Buffered Saline
ROI	region of interest
RT	Raumtemperatur
SD	Standard deviation

SLCO	Solute Carrier Organic Anion Transporter- Family
SLC-Superfamilie	Solute Carrier Class-Superfamily
TGF- β	transforming growth factor- β
TILs	Tumor-infiltrierende Lymphyozyten
Tregs	regulatorischen T-Zellen
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Graphik zu Inzidenz und Mortalität des kolorektalen Karzinoms	6
Abbildung 2: Kombination aus den morphologischen und molekulargenetischen Veränderungen vom gesunden Darmepithel bis zum frühen Karzinom.....	10
Abbildung 3: schematische Darstellung der drei Adenomtypen	11
Abbildung 4: schematische Darstellung der Klassifizierung nach Dukes	15
Abbildung 5: Die drei beobachteten Wachstumsmuster von kolorektalen Lebermetastasen	23
Abbildung 6: Chemische Struktur von 5-Fluoruracil	25
Abbildung 7: Chemische Struktur von Oxaliplatin	26
Abbildung 8: Chemische Struktur von Irinotecan	27
Abbildung 9: Darstellung des Nutzen einer adjuvanten Chemotherapie	29
Abbildung 10: Phylogenetische Klassifikation und Nomenklatur der OATP/SLCO-Superfamilie	34
Abbildung 11: Topologisches Modell eines humanen OATP1B1	42
Abbildung 13: Immunhistochemische Färbung einer Gewebeprobe eines an Divertikulitis erkrankten Patienten.....	46
Abbildung 14: Ausschnitt einer Aufnahme mit dem Tissuefax-Mikroskop eines doppelt gefärbten Tumorgewebeschnittes	56
Abbildung 15: Gewebeschnitt eines Divertikulitispatienten	58
Abbildung 16: IHC-Färbung eines Gewebeschnittes eines gut differenzierten Kolonkarzinoms	60
Abbildung 17: Boxplot der OATP4A1-Expression bei Rezidiv- (R) und Nicht-Rezidiv-(NR) Patienten	61
Abbildung 18: Boxplot der OATP4A1-Expression in den Tumorstadien UICC I, II und III	63
Abbildung 19: Immunhistochemisch gefärbter Gewebeschnitt eines Patienten mit entzündlicher Divertikulitis.....	64
Abbildung 20: Boxplot der OATP4A1-Expression in Epithel-, Immun- und Stromazellen bei Patienten mit entzündlicher Divertikulitis	65

Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung eines nicht-malignen Kolon-Gewebeschnittes eines Patienten mit entzündlicher Divertikulitis.....	66
Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung eines Tumor-Gewebeschnittes	67
Abbildung 23: Boxplot der OATP4A1-Expression in Tumor-, Immun-, Epithel- und Stromazellen von Patienten mit entzündlicher Divertikulitis im Vergleich mit Gewebeschnitten von Patienten mit kolorektalem Karzinom.....	67
Abbildung 25: Identifizierung von OATP4A1-exprimierenden CD20+ B-Lymphozyten in Gewebeschnitten von Tumorpatienten	70
Abbildung 26: Identifizierung von OATP4A1-exprimierenden CD20+ B-Lymphozyten in Gewebeschnitten von Tumorpatienten	71
Abbildung 27: Identifizierung von OATP4A1-exprimierenden B-Lymphozyten in gesundem Darmgewebe	72
Abbildung 28: Visualisierung von OATP4A1-exprimierenden, CD34+ Endothelzellen in malignen Gewebeschnitten	73
Abbildung 29: Visualisierung von CD34+ Gefäßendothelzellen in malignem Gewebe	73
Abbildung 30: Visualisierung von CD44-markierten T-Zellen in malignem Gewebe	75
Abbildung 31: Identifizierung von OATP4A1 positiven, CD45 markierten Leukozyten in malignem Gewebe	76
Abbildung 32: Visualisierung CD68+ Makrophagen in malignem Gewebe	77
Abbildung 33: Visualisierung von Mastzellen in benignem Gewebe	79

8. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation	14
Tabelle 2: Veranschaulichung des Unterschiedes zwischen alter und neuer Nomenklatur anhand des Oatp4a1	35
Tabelle 3: Zusammenfassung der wichtigsten exo- und endogenen Substrate der OATPS.....	38
Tabelle 4: Primärantikörper	54
Tabelle 5: Sekundärantikörper	54
Tabelle 6: Mittelwerte (Mean) der statistischen Evaluierung der OATP4A1-Expression bei R- und NR-Patienten +/- der Standardabweichung (S.D).....	61
Tabelle 7: Mittelwerte (Mean) der statistischen Evaluierung der OATP4A1-Expression bei Patienten mit entzündlicher Divertikulitis +/- der Standardabweichung (S.D).....	65
Tabelle 8: Mittelwerte (Mean) der statistischen Evaluierung der OATP4A1-Expression bei Patienten mit entzündlicher Divertikulitis im Vergleich mit Gewebeschnitten von Patienten mit kolorektalem Karzinom +/- der Standardabweichung (S.D).....	68

9. LITERATURVERZEICHNIS

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S., Immunity to tumors in cellular and molecular immunology; 2007, Saunders Elsevier, Philadelphia, USA, p. 397-417

Abe T., Kakyo M., Tokui T., Nakagomi R., Nishio T., Nakai D., Nomura H., Unno M., Suzuki M., Naitoh T., Matsuno S., Yawo H., Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1; 1999, J Biol Chem.; 274(24): 17159-17163

Abe T., Unno M., Onogawa T., Tokui T., Kondo T. N., 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 K., Nagura H., Ito S., Matsuno S., LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers; 2001, Gastroenterol.; 120(7): 1689-1699

Adachi H., Suzuki T., Abe M., Asano N., Mizutamari H., Tanemoto M., Nishio T., Onogawa T., Toyohara T., Kasai S., Satoh F., Suzuki M., Tokui T., Unno M., Shimosegawa T., Matsuno S., Ito S., Abe T., Molecular characterization of human and rat organic anion transporter OATP-D; 2003, Am J Physiol Renal Physiol.; 285(6): F1188-1197

Aktories K., Förstermann U., Hofmann F., Starke K., Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Elsevier, Urban&Fischer München, 10. Auflage, 2009, p. 978-980

American Cancer Society (2007): Global Cancer Facts & Figures, <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/globalfactsandfigures2007rev2p.pdf>, Stand: 7.1.2013

Andersen V., Halfvarson V., Vogel U., Colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease: Can we predict risk?; 2012, World J Gastroenterol.; 18(31): 4091-4094

Ancona N., Maglietta R., Piepoli A., D'Addabbo A., Cotugno R., Savino M., Liuni S., Carella M., Pesole G., Perri F., On the statistical assessment of classifiers using DNA microarray data; 2006, BMC Bioinform.; 7:387-401

Apetoh L., Ghiringhelli F., Tesniere A., Obeid M., Ortiz C., Criollo A., Mignot G., Maiuri M.C., Ullrich E., Saulnier P., Yang H., Amigorena S., Ryffel B., Barrat F.J., Saftig P., Levi F., Lidereau R., Nogues C., Mira J.P., Chompret A., Joulin V., Clavel-Chapelon F., Bourhis J., André F., Delaloge S., Tursz T., Kroemer G., Zitvogel L., Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy; 2007, Nat Med.; 13(9):1050-1059

Bird N.C., Mangnall D., Majeed A.W.; Biology of colorectal liver metastases: A review; 2006, J Surg Oncol.; 94(1): 68-80

Böcker W., Denk H., Heitz Ph. U., Moch H.; Pathologie, 4. Auflage 2008, Urban & Fischer, München, Jena, p. 758-773, 167-217

Boeing H., Wahrendorf J., Epidemiologie kolorektaler Karzinome; Internist 32, 1991, p. 306-314

Bogradus S. T. Jr., What do we know about diverticular disease? A brief overview; 2006, J Clin Gastroenterol., 40(3): 108-111

Boyle P., Ferlay J., Cancer incidence and mortality in Europe; 2004, Ann Oncol., 2005; 16(3): 481-488

Buxhofer-Ausch V., Secky L., Wlcek K., Svoboda M., Kounnis V., Briasoulis E., Tzakos A. G., Jaeger W., Thalhammer T., Tumor-specific expression of organic anion-transporting polypeptides: transporters as novel targets for cancer therapy; 2013, J Drug Deliv., Epub 2013 Feb 3

Camus M., Tosolini M., Mlecnik B., Pagès F., Kirilovsky A., Berger A., Costes A., Bindea G., Charoentong P., Bruneval P., Trajanoski Z., Fridman W.H., Galon J., Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence; 2009, Cancer Res., 69(6): p. 2685-2693

Classen M., Tytgat G.N.J, Lightdale C.J., Gastroenterologische Endoskopie; 2004, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p. 530-553

Correale P., Rotundo M.S., Del Vecchio M.T., Remondo C., Migali C., **Ginanneschi** C., Tsang K.Y., Licchetta A., Mannucci S., Loiacono L., Tassone P., Francini G., Tagliaferri P., Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy; 2010, J Immunother.; 33(4): 435-441

de la Cruz-Merino L., Grande-Pulido E., Albero-Tamarit A., Codes-Manuel de Villena M. E., Cancer and immune response: old and new evidence for future challenges; 2008, Oncol.; 13(12): 1246-1254

de la Cruz-Merino L., Henao Carrasco F., Vicente Baz D., Nogales Fernández E., Reina Zoilo J.J., Codes Manuel de Villena M., Pulido E.G., Immune microenvironment in colorectal cancer: a new hallmark to change old paradigms. 2011, Clin Dev Immunol.; Article ID 174149, 9 pages

Delyfer M.N., Raffelsberger W., Mercier D., Korobelnik J.F., Gaudric A., Charteris D.G., Tadayoni R., Metge F., Caputo G., Barale P.O., Ripp R., Muller J. D., Poch O., Sahel J.A., Lévillard T., Transcriptomic analysis of human retinal detachment reveals both inflammatory response and photoreceptor death; 2011, PLoS One, 6(12): e28791

Eefsen R. L., Van den Eynden G. G., Høyer-Hansen G., Brodt P., Laerum O. D., Vermeulen P. B., Christensen I. J., Wettergren A., Federspiel B., Willemoe G. L., Vainer B., Osterlind K., Illemann M., Histopathological growth pattern, proteolysis and angiogenesis in chemo-naïve patients resected for multiple colorectal liver metastases; 2012, J Oncol.; Article ID 907971, 12 pages

Fidler I.J., Randinsky R., Genetic control of cancer metastasis; 1990, J Natl Cancer Inst.; 82(3): 166-168

Finegold S.M., Atteberry H.R., Sutter V.L., Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets; 1974, Am J Clin Nutr., 27: 1456-1469

Floch M.H., Fuchs H.M., Modification of stool content by increased bran intake; 1978, Am J Clin Nutr., 31: 185-189

Floch M.H., White J.A., Management of diverticular disease is changing; 2006, J of Gastroenterol., 12: 3225-3228

Floch M.H., A hypothesis: is diverticulitis a type of inflammatory bowel disease?; 2006, J Clin Gastroenterol., 40(3): 121-125

Folkman J. Angiogenesis: initiation and modulation in Cancer Invasion and Metastasis: Biologic and Therapeutic Aspekts, Nicolson G. and Milas L., Editors. 1984, Raven Press: New York, p.201-208

Fujiwara K., Adachi H., Nishio T., Unno M., Tokui T., Okabe M., Onogawa T., Suzuki T., Asano N., Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner; 2001, Endocrinol.; 142(5): 2005-2012

Gao B., Huber R.D., Wenzel A., Vavricka S.R., Ismail M.G., Remé C., Meier P.J., Localization of organic anion transporting polypeptides in the rat and human ciliary body epithelium; 2005, Exp Eye Res.; 80(1): 61-72

Gasser S., Orsulic S., Brown E. J., Raulet D.H., The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor; 2005, Nature; 436(7054): 1186-1190

Geißler M., Graeven U., Das kolorektale Karzinom; 2005, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p.43-52

Genecards 2013, www.genecards.org, Stand: 10.3.2013

Glaeser H., Bailey D. G., Dresser G. K., Gregor J. C., Schwarz U. I., McGrath J. S., Jolicœur E., Lee W., Leake B. F., Tirona R. G., Kim R. B., Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans; 2007, Clin Pharmacol Ther.; 81(3): 362-370

Gottfried E., Kunz-Schughart L.A., Weber A., Rehli M., Peuker A., Müller A., Kastenberger M., Brockhoff G., Andreesen R., Kreutz M., Expression of CD68 in non-myeloid cell types; 2008, Scand J Immunol.; 67(5): 453-463

Gross M., Holinsky-Feder E., Keller G., Keller G., Vogelsang H., Gross M., Kopp R., Tympner C.; Hereditäre Tumorerkrankungen des Gastrointestinaltraktes; 1998, Tumorzentrum München, p. 261-283

Gruenberger T., Therapiemanagement von Lebermetastasen bei Gastrointestinalen Tumoren; 2008, UNI MED Verlag AG, Bremen, p. 10-98

Hagenbuch B., Meier P.J., The superfamily of organic anion transporting polypeptides; 2003, Biochem Biophys Acta.; 1609(1): 1-18

Hagenbuch B., Meier P.J., Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties; 2004, Pflugers Arch.; 447(5): 653-665

Hagenbuch B., Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides; 2007, Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.; 21(2): 209-221

Hagenbuch B., Gui C., Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family; 2008, *Xenobiotica*; 38(7-8): 778-801

Halle M., Schmidt-Trucksäss A., Hambrecht R., Berg A., Sporttherapie in der Medizin; 2008, Schattauer GmbH, Stuttgart, p. 261-270

Haidinger G., Waldhoer T., Hackl M., Vutuc C.; Survival of patients with colorectal cancer in Austria by sex, age, and stage; *Wiener Med Wochenschrift*; 2006, 156(19-20): 549-551

Haimeur A., Conseil G., Deeley R. G., Cole S. P., The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation; 2004, *Curr Drug Metab.*; 5(1): 21-53

Hakes D.J., Berezney R., Molecular cloning of matrin F/G: A DNA binding protein of the nuclear matrix that contains putative zinc finger motifs; 1991, *Proc Natl Acad Sci USA*; 88(14): 6186-6190

Hanahan D. and Weinberg R.A., Hallmarks of cancer; 2011, *Cell*, 144(5): 646-674

Hänggi E., Grundschober A.F., Leuthold S., Meier P.J., St-Pierre M.V., Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1; 2006, *Mol Pharmacol.*; 70(3): 806-817

Hardcastle J.D., Chamberlain J.O., Robinson M.H., Moss S.M., Amar S.S., Balfour T.W., James P.D., Mangham C.M., Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test; 1996, *Lancet*; 348(9040): 1472-1571

Hays A., Apte U., Hagenbuch B., Organic anion transporting polypeptides expressed in pancreatic cancer may serve as potential diagnostic markers and therapeutic targets for early stage adenocarcinomas; 2013, *Pharm Res.*, Epub 2013 Jan 11

Heinritz W., Molekulargenetische Mutationsanalyse des APC-Gens mittels DHPLC bei Patienten mit Familiärer Adenomatöser Polyposis (FAP); 2004, Tenea Verlag für Medien, Berlin, p. 1-15

Higgins C.F., Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters; 2007, *Nature*; 446(7137): 749-757

Holla V.R., Backlund M.G., Yang P., Newman R.A., DuBois R.N., Regulation of prostaglandin transporters in colorectal neoplasia; 2008, *Cancer Prev Res.*, 1(2): 93-99

Hsiang B., Zhu Y., Wang Z., Wu Y., Sasseville V., Yang W. P., Kirchgessner T.G., A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters; 1999, *J Biol Chem.*; 274(52): 37161-37168

Huber R.D., Gao B., Sidler Pfändler M.A., Zhang-Fu W., Leuthold S., Hagenbuch B., Folkers G., Meier P.J., Stieger B., Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain; 2007, *Am J Physiol Cell Physiol.*; 292(2): c795-806

Jacquemin E., Hagenbuch B., Stieger B., Wolkoff A.W., Meier P.J., Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter; 1994, *Proc Natl Acad Sci USA*; 91(1): 133-137

Jass J.R., Love S.B., Northover J.M., A new prognostic classification of rectal cancer; 1987, *Lancet*, 1(8545): 1303-1306

Kleberg K., Jensen G.M., Christensen D.P., Lundh M., Grunnet L.G., Knuhtsen S., Poulsen S.S., Hansen M.B., Bindselev N., Transporter function and cyclic AMP turnover in normal colonic mucosa from patients with and without colorectal neoplasia; 2012, *BMC Gastroenterol.*, 12: 78-90

Köhler L., Sauerland S., Neugebauer E., Diagnosis and treatment of diverticular disease. Results of a consensus development conference; 1999, *Surg Endosc.*, 13: 430-436

Köhne C.H., Harstrick A., Aktuelle Therapie des kolorektalen Karzinoms; 2001, UNI-MED Verlag AG, Bremen, p. 12-125

König J., Cui Y., Nies A.T., Keppler D., A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane; 2000a, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*; 278(1): G156-164

König J., Cui Y., Nies A.T., Keppler D., Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide; 2000b, *J Biol Chem.*; 275(30): 23161-23168

König J., Seithel A., Gradhand U., Fromm M. F., Pharmacogenomics of human OATP transporters; 2006, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*; 372(6): 432-443

Kronborg O., Fenger C., Olsen J., Jørgensen O.D., Sørensen O., Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test; 1996; 348(9040): 1467-1471

Kruis W., Leifeld L., Divertikelkrankheit, 2010, UNI-MED Verlag AG, Bremen, p. 8-85

Kullak-Ublick G.A., Hagenbuch B., Stieger B., Schteingart C.D., Hofmann A.F., Wolkoff A.W., Meier P.J., Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver; 1995, *Gastroenterol.*; 109(4):1274-1282

Ladoire S., Martin F., Ghiringhelli F., Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer; 2011, *Cancer Immunology, Immunotherapy*; 60(7): 909-918

Lake R.A. and Robinson B. W.W, Immunotherapy and chemotherapy-a practical partnership; 2005, *Nat Rev Cancer*, 5(5): 397-405

Lake R.A. and Van Der Most R.G., A better way for a cancer cell to die; 2006, *N Engl J Med.*, 354(23): 2503-2504

Langer L.F., Clay T.M., Morse M.A., Update on anti-CTLA-4 antibodies in clinical trials; 2007, *Expert Opin Biol Ther.*; 7(8): 1245-1256

Laubert T., Habermann J.K., Bader F.G., Jungbluth T., Esnaashari H., Bruch H.-P., Roblick U.J., Auer G.; Epidemiology, molecular changes, histopathology and diagnosis of colorectal cancer; 2010, *Europ Surg*, 42(6): 252-259

Leach D.R., Krummel M.F., Allison J.P., Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade; 1996, *Science*, 271(5256): 1734-1736

Lee W., Glaeser H., Smith L.H., Roberts R.L., Moeckel G.W., Gervasini G., Leake B.F., Kim R.B., Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2

(OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry; 2005, J Biol Chem.; 280(10): 9610-9617

Lee W., Belkhiri A., Lockhart A.C., Merchant N., Glaeser H., Harris E.I., Washington M.K., Brunt E.M., Zaika A., Kim R.B., El-Rifai W., Overexpression of OATP1B3 confers apoptotic resistance in colon cancer; 2008, Cancer Res.; 68(24): 10315-10323

Leischner Hannes, Basics Onkologie; 2007, Elsevier GmbH, München, p. 78-81

Le Vee M., Jouan E., Moreau A., Fardel O., Regulation of drug transporter mRNA expression by interferon- γ in primary human hepatocytes; 2011, Fundam Clin Pharmacol.; 25(1): 99-110

Li L., Lee T.K., Meier P.J., Ballatori N., Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C₄ as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter; 1998, J Biol Chem.; 273(26): 16184-16191

Li L., Meier P.J., Ballatori N., Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione; 2000, Mol. Pharmacol.; 58(2): 335-340

Liang Y., Tedder T.F., Identification of a CD20-, Fc ϵ RI β -, and HTm4-related gene family: sixteen new MS4A family members expressed in human and mouse; 2001, Genomics; 72(2): 119-127

Lloyd R.V., Endocrine Pathology, Differential Diagnosis and Molecular Advances, Second Edition, 2010, Springer New York Dordrecht Heidelberg London, p.1-5

Lockhart A.C., Harris E., Lafleur B.J., Merchant N.B., Washington M.K., Resnick M.B., Yeatman T.J., Lee W., Organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) is overexpressed in colorectal tumors and is a predictor of clinical outcome; 2008, Clin Exp Gastroenterol.; 1: 1-7

Ludeman L., Warren B.F., Shepherd N.A., The pathology of diverticular disease; 2002, Best Pract Res Clin Gastroenterol., 16: 543-562

Mandel J.S., Church T.R., Ederer F., Bond J.H., Colorectal cancer mortality: effectiveness of biennial screening for fecal occult blood; 1999, J Natl Cancer Inst.; 91(5): 434-437

Marin J.J., Romero M.R., Martinez-Becerra P., Herraiz E., Briz O., Overview of the molecular bases of resistance to chemotherapy in liver and gastrointestinal tumours; 2009, Curr Mol Med.; 9(9): 1108-1129

Menon A.G., Janssen-van Rhijn C.M., Morreau H., Putter H., Tollenaar R.A., van de Velde C.J., Fleuren G.J., Kuppen P.J.; Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis; 2004, Lab Invest.; 84(4): 493-501

Messmann H., Klinische Gastroenterologie; 2012, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, Deutschland; p. 417-456

Meyer zu Schwabedissen H.E., Tirona R.G., Yip C.S., Ho R.H., Kim R.B., Interplay between the nuclear receptor pregnane X receptor and the uptake transporter organic anion transporter polypeptide 1A2 selectively enhances estrogen effects in breast cancer; 2008, Cancer Res.; 68(22): 9338-9347

Miki Y., Suzuki T., Tazawa C., Blumberg B., Sasano H., Steroid and xenobiotic receptor

(SXR), cytochrome P450 3A4 and multidrug resistance gene 1 in human adult and fetal tissues; 2005, *Mol Cell Endocrinol.*; 231(1-2): 75-85

Mikkaichi T., Suzuki T., Onogawa T., Tanemoto M., Mizutamari H., Okada M., Chaki T., Masuda S., Tokui T., Eto N., Abe M., Satoh F., Unno M., Hishinuma T., Inui K., Ito S., Goto J., Abe T., Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney; 2004, *Proc Natl Acad Sci USA*; 101(10): 3569-3574

Morini S., Hassan C., Zullo A., De Francesco V., Burattini O., Margiotta M., Panella C., Ierardi E., Epithelial cell proliferation of the colonic mucosa in diverticular disease: a case-control study; 2005, *Aliment Pharmacol Ther.*, 21: 1385-1390

Nagase T., Ishikawa K., Suyama M., Kikuno R., Hirose M., Miyajima N., Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro; 1998, *DNA Res.*; 5(6): 355-364

Naito Y., Saito K., Shiiba K., Ohuchi A., Saigenji K., Nagura H., Ohtani H., CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer; 1998, *Cancer Res.*, 58(16): 3491-3494

Naor D., Sionov R.V., Ish-Shalom D., CD44: structure, function, and association with the malignant process; 1997, *Adv Cancer Res.*; 71: 241-319

Nieburgs H.E., Ross J.S., Izbic J.R., Wilker D.K., Schweiberer L., Das kolorektale Karzinom und seine Präkanzerosen; 1990, De Gruyter, Berlin, p. 32-72

Nishikawa H. and Sakaguchi S., Regulatory T cells in tumor immunity; 2010, *Int J Canc.*, 127(4): 759-767

Noé B., Hagenbuch B., Stieger B., Meier P.J., Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain; 1997, *Proc Natl Acad Sci USA*; 94(19): 10346-10350

Nozawa T., Imai K., Nezu J., Tsuji A., Tamai I., Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human; 2004, *J Pharmacol Exp Ther.*; 308(2): 438-445

Obeid M., Tesniere A., Ghiringhelli F., Fimia G.M., Apetoh L., Perfettini J.L., Castedo M., Mignot G., Panaretakis T., Casares N., Métivier D., Larochette N., van Endert P., Ciccocanti F., Piacentini M., Zitvogel L., Kroemer G., Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death; 2007, *Nat Med.*; 13(1): 54-61

Obeid M., Tesniere A., Panaretakis T., Tufi R., Joza N., van Endert P., Ghiringhelli F., Apetoh L., Chaput N., Flament C., Ullrich E., de Botton S., Zitvogel L., Kroemer G., Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy; 2007, *Immunol Rev.*; 220: 22-34

Oda K., Matsuoka Y., Funahashi A., Kitano H., A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling; 2005, *Mol Syst Biol.*; Article ID 2005.0010, 17 pages

Parkin D.M., Pisani P., Ferlay J., Global cancer statistics, 1999, *CA Cancer J Clin.*; 49(1): 33-64

Payne V., Kam P.C., Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance;

2004, *Anaesthesia*.; 59(7): 695-703

Peddareddigari V.G., Wang D., Dubois R.N., The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis; 2010, *Cancer Microenviron.*; 3(1): 149-166

Peppercorn M.A., The overlap of inflammatory bowel disease and diverticular disease; 2004, *J Clin Gastroenterol.*, 38: 8-10

Pizzagalli F., Hagenbuch B., Stieger B., Klenk U., Folkers G., Meier P.J., Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter, 2002, *Mol Endocrinol.*; 16(10): 2283-2296

Radinsky R., Fidler I.J., Regulation of tumor cell growth at organ-specific metastases; 1992, *In Vivo.*; 6(4): 325-31

Ropponen K.M., Eskelinen M.J., Lipponen P.K., Alhava E., Kosma V.M., Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer; 1997 Jul., *J Pathol.*; 182(3): 318-324

Saif M.W., Chu E., Biology of colorectal Cancer; 2010, *Cancer J.*, 16(3): 196-201

Salama P., Phillips M., Grieu F., Morris M., Zeps N., Joseph D., Platell C., Iacopetta B., Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer; 2009, *J clin Onco.*, 27(2): 186-192

Satlin L.M., Amin V., Wolkoff A.W., Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO₃⁻ exchange; 1997, *J. Biol. Chem.*; 272(42): 26340-26345

Sato K., Sugawara J., Sato T., Mizutamari H., Suzuki T., Ito A., Mikkaichi T., Expression of organic anion transporting polypeptide E (OATP-E) in human placenta; 2003, *Placenta*; 24(2-3): 144-148

Satoh H., Yamashita F., Tsujimoto M., Murakami H., Koyabu N., Ohtani H., Sawada Y., Citrus juices inhibit the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B; 2005, *Drug Metab Dispos.*; 33(4): 518-523

Schoppmann S.F., Lymphangiogenesis, inflammation and metastasis; 2005, *Anticancer Research*; 25: 4503-4511

Schoppmann S.F., Birner P., Stöckl J., Kalt R., Ullrich R., Caucig C., Kriehuber E., Nagy K., Alitalo K., Kerjaschki D., Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis, 2002, *Am J Pathol.*, 161: 947-956

Schumpelick V., Kasperk R., Divertikulitis: eine Standortbestimmung; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001, p. 1-73

Schuster V.L., Molecular mechanisms of prostaglandin transporter; 1998, *Ann Rev Physiol.*, 60: 221-242

Schuster V.L., Prostaglandin transport. Prostaglandins and other Lipid Mediation; 2002, 68-69: 633-647

Sinicrope F.A., Rego R.L., Ansell S.M., Knutson K.L., Foster N.R., Sargent D.J., Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma; 2009, Gastroentero.; 137(4): 1270-1279

Skazik C., Heise R., Bostanci O., Paul N., Denecke B., Joussen S., Kiehl K., Merk H.F., Zwadlo-Klarwasser G., Baron J.M., Differential expression of influx and efflux transport proteins in human antigen presenting cells; 2008, Exp Dermatol.; 17(9): 739-747

Statistik Austria 2013,

www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/dickdarm_enddarm/index.html, Stand: 14.6.2013

Stessels F., Van den Eynden G., Van der Auwera I., Salgado R., Van den Heuvel E., Harris A.L., Jackson D.G., Colpaert C.G., van Marck E.A., Dirix L.Y., Vermeulen P.B., Breast adenocarcinoma liver metastases, in contrast to colorectal cancer liver metastases, display a non-angiogenic growth pattern that preserves the stroma and lacks hypoxia; 2004, Br J Cancer; 90(7): 1429-1436

Storch W.B., Immunofluorescence in clinical immunology: a primer and atlas; 2000, Basel; Boston; Berlin: Birkhäuser, p.1-3

Strobl H., Scheinecker C., Csmarits B., Majdic O., Knapp W., Flow cytometric analysis of intracellular CD68 molecule expression in normal and malignant haemopoiesis; 1995, Br J Haematol., 90(4): 774-782

Sun Y, Yu H, Zheng D, Cao Q, Wang Y, Harris D, Wang Y., Sudan black B reduces autofluorescence in murine renal tissue, 2011; Arch Pathol Lab Med., 135(10): 1335-1342

Sugarbaker E.V., Cancer metastasis: a product of tumor-host interactions; 1979, Curr Probl Cancer; 3: 1-59

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., Identification and characterization of novel rat and human gonad-specific organic anion transporters; 2003, Mol Endocrinol.; 17(7): 1203-1215

Svoboda M., Riha J., Wlcek K., Jaeger W., Thalhammer T., Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function; 2011a, Curr Drug Metab.; 12(2): 139-153

Svoboda M., Wlcek K., Taferner B., Hering S., Stieger B., Tong D., Zeillinger R., Thalhammer T., Jäger W., Expression of organic anion-transporting polypeptides 1B1 and 1B3 in ovarian cancer cells: relevance for paclitaxel transport; 2011b, Biomed Pharmacother.; 65(6): 417-426

Swann J.B. and Smyth M.J., Immune surveillance of tumors; 2007, J clin Invest., 117(5): 1137-1146

Tamai I., Nezu J., Uchino H., Sai Y., Oku A., Shimane M., Tsuji A., Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family; 2000, Biochem Biophys Res Commun.; 273(1): 251-260

Tedder T.F., Streuli M., Schlossman S.F., Saito H., Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes; 1988, Proc Natl Acad Sci USA, 85(1): 208-212

Tomkins A.M., Bradley A.K., Oswald S., Drasar B.S., Diet and the faecal microflora of infants, children and adults in rural Nigeria and urban U.K.; 1981, J Hyg (Lond), 86: 285-293

Tursi A., New physiopathological and therapeutic approaches to diverticular disease of the colon; 2007, Expert Opin Pharmacother., 8: 299-307

Tursi A., Brandimarte G., Elisei W., Inchingolo C.D., Aiello F., Epithelial cell proliferation of the colonic mucosa in different degrees of colonic diverticular disease; 2006, J Clin Gastroenterol., 40: 306-311

Tursi A., Brandimarte G., Elisei W., Giorgetti G.M., Inchingolo C.D., Danese S., Aiello F., Assessment and grading of mucosal inflammation in colonic diverticular disease; 2008, J Clin Gastroenterol., 42(6): 699-703

Van Cutsem E., Peeters M., Siena S., Humblet Y., Hendlisz A., Neyns B., Canon J.L., Van Laethem J.L., Maurel J., Richardson G., Wolf M., Amado R.G., Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer; 2007, J Clin Oncol., 25(13): 1658-1664

Van Cutsem E., Siena S., Humblet Y., Canon J.L., Maurel J., Bajetta E., Neyns B., Kotasek D., Santoro A., Scheithauer W., Spadafora S., Amado R.G., Hogan N., Peeters M., An open-label, single-arm study assessing safety and efficacy of panitumumab in patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard chemotherapy; 2008, Ann Oncol., 19(1): 92-98

Van den Eynden G.G., Bird N.C., Majeed A.W., Van Laere S., Dirix L.Y., Vermeulen P.B., The histological growth pattern of colorectal cancer liver metastases has prognostic value; 2012, Clin Exp Metastasis; 29(6): 541-549

Vermeulen P.B., Colpaert C., Salgado R., Royers R., Hellemans H., Van Den Heuvel E., Goovaerts G., Dirix L.Y., Van Marck E., Liver metastases from colorectal adenocarcinomas grow in three patterns with different angiogenesis and desmoplasia; 2001, J Pathol., 195(3): 336-342

Vignali D. A., Collison L. W., Workman C. J., How regulatory T cells work; 2008 , Nat Rev Immunol.; 8(7): 523-532

Vogelstein B., Atkin W., Lenz H.J., Lynch H.T., Minsky B., Nordlinger B., Starling N., Genetic alterations during colorectal-tumor development; N Engl J Med., 1988; 31(9): 525-532

Walters H.C., Craddock A.L., Fusegawa H., Willingham M.C., Dawson P.A., Expression, transport properties, and chromosomal location of organic anion transporter subtype 3; 2000, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.; 279(6): G1188-1200

Wang P., Wang J.J., Xiao Y., Murray J.W., Novikoff P.M., Angeletti R.H., Orr G.A., Lan D., Silver D.L., Wolkoff A.W., Interaction with PDZK1 is required for expression of organic anion transporting protein 1A1 on the hepatocyte surface; 2005, J Biol Chem.; 280(34): 30143-30149

Whitemore A.S., Wu-Williams A.H., Lee M., Zheng S., Gallagher R.P., Jiao D.A., Zhou L., Wang X.H., Chen K., Jung D., Diet, physical activity, and colorectal cancer among Chinese in North America and China; J Natl Cancer Inst., 1990; 82(11): 915-926

Wilmanns W., Huhn D., Wilms K.; Internistische Onkologie; 2000, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, p. 560-591

Wilson K., Walker J., Principles and Techniques of Biochemistry and molecular Biology; 2000, Cambridge Uni Press, p. 341-345

Wojtal K.A., Eloranta J.J., Hruz P., Gutmann H., Drewe J., Staumann A., Beglinger C., Fried M., Kullak-Ublick G.A., Vavricka S.R., Changes in mRNA expression levels of solute carrier transporters in inflammatory bowel disease patients; 2009, Drug Metab Dispos.; 37(9): 1871-1877

Yang W., Zhang Y., Fu F., Li R., High-resolution array-comparative genomic hybridization profiling reveals 20q13.33 alterations associated with ovarian endometriosis; 2013, Gynecol Endocrinol.; 29(6): 603-607

Zielinski C., Jakesz R., Onkologie heute: Colorectales Carcinom; 1999, Springer-Verlag, Wien, NewYork, p.5-75

Zikherman J., Parameswaran R., Hermiston M., Weiss A., The structural wedge domain of the receptor-like tyrosine phosphatase CD45 enforces B cell tolerance by regulating substrate specificity; 2013, J Immunol.; 190(6): 2527-2535

Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F., André F., Tesniere A., Kroemer G., The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success?; 2008, J clin Invest., 118(8): 1991-2001

Zou W., Regulatory cells, tumor immunity and immunotherapy; 2006, Nat Rev Immuno., 6(4): 295-307

10. CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name:	Simone Zotter
Geburtsort:	Wien
Nationalität:	Österreich

Ausbildung

Okt. 2012- Juli 2013	Diplomarbeit am Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik der Universität Wien in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung der Medizinischen Universität Wien.
seit Oktober 2006	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
22.6.2006	Matura mit Auszeichnung am Öffentlichen Gymnasium der Stiftung Theresianische Akademie

Berufliche Erfahrung

August 2012	Praktikum im „St. Georg“ Spital, Karakoy/Istanbul
März 2011- Febr. 2012	Tutor am Department für Pharmakognosie der Universität Wien
Februar 2008	Praktikum in der „Agnes Apotheke“ (1190 Wien)