



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss von Tumornekrosefaktor alpha und Interleukin-6
auf die Expression des OATP4A1 Transporters in
kolorektalen Karzinomzellen

verfasst von

Ana Katic

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Walter Jäger

Danksagung

Meinen herzlichsten Dank möchte ich Ao.Univ.-Prof. Dr. Theresia Thalhammer aussprechen. Während meiner Arbeit, die ich am AKH Wien am Institut für Pathophysiologie und Allergieforschung absolvierte, ist sie von Anfang an mit viel Verständnis und Interesse auf alle Fragestellungen eingegangen und hat mir einen umfangreichen Einblick in mehrere Forschungsgebiete im Zuge meiner Diplomarbeit ermöglicht. Für die Gewährleistung einer sehr guten Diplomarbeitsstelle, das Zuvorkommen und das Engagement in jeder Hinsicht, möchte ich mich gerne bei Ao. Univ. -Prof. Mag. Walter Jäger bedanken.

Dem Leiter der Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathophysiologie der Medizinischen Universität Wien, Ao.Prof. MD Peter Pietschmann möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Die Kenntnisse zum praktischen Arbeiten im Labor, die für die Fertigstellung dieser Diplomarbeit nötig waren, habe ich durch Lukas Klameth und Erika Bajna erworben. Sie haben mir ein angenehmes, zügiges Arbeiten ermöglicht.

Ich möchte ihnen aufrichtig für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft während der gesamten Zeit danken.

Ich möchte mich außerdem herzlichst bei allen Kollegen bedanken, die ständig für eine freundliche und motivierende Atmosphäre gesorgt haben und mich jederzeit mit großem Entgegenkommen unterstützt haben.

Vor allem danke ich meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mich während dieser Zeit stets hingebungsvoll unterstützt und motiviert haben.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das kolorektale Karzinom.....	1
1.1.1	Das gesunde Kolon.....	1
1.1.2	Histologie des Dickdarms.....	2
1.1.3	Mukosa	2
1.1.4	Mukosales Immunsystem.....	3
1.1.5	Das Kolonkarzinom - Epidemiologie.....	4
1.1.6	Ätiologie	5
1.1.7	Karzinogenese	8
1.1.8	Morphologisch - histologische Differenzierung	9
1.1.9	Metastasierung.....	10
1.1.10	Symptome	11
1.1.11	Klassifikation und Staging	11
1.1.12	Risikofaktoren und Prävention.....	14
1.1.13	Diagnostik	14
1.1.14	Therapie.....	16
1.2	OATP- Familie.....	20
1.2.1	Allgemeines	20
1.2.2	Klassifizierung und Nomenklatur	21
1.2.3	Expression und Verteilung der OATPs in Normal - und Tumorgewebe	23
1.2.4	Substrate und Transportmechanismen.....	23
1.2.5	SLCO/ OATP4A1	24
1.3	Zytokine und OATPs	25
1.3.1	Immunologische Umgebung in kolorektalen Karzinomen	25
1.3.2	TNF α	26
1.3.3	IL - 6.....	26
1.3.4	Zytokine und Kolonkarzinom	27
1.3.5	Einfluss auf Transporter	27
2	ZIELSETZUNG	29
3	MATERIAL UND METHODEN	31
3.1	Zellkultur.....	31
3.1.1	Zelllinie.....	32
3.1.2	Kultivierung der Zellen.....	32

3.1.3	Behandlung der Zellen	34
3.2	RNA Isolierung	36
3.3	Reverse Transkription	38
3.4	Polymerase – Kettenreaktion (PCR).....	39
3.4.1	Allgemeines	39
3.4.2	Quantitative Real - Time (RT) PCR	40
3.4.3	Quantitative Real - Time TaqMan® PCR	41
3.4.4	Vorbereitung	42
3.4.5	Datenanalyse	42
3.5	Färbung von OATP4A1 in C205 Zellen	43
3.5.1	Immunofluoreszenzfärbung	44
3.5.2	Mikroskopische automatisierte digitalisierte Aufnahme und Auswertung	45
4	ERGEBNISSE	47
4.1	Bestimmung der OATP4A1 mRNA - Expression in der C205 Zelllinie.....	47
4.1.1	OATP4A1 mRNA - Expression in C205 Zellen nach IL - 6 Behandlung.....	48
4.1.2	OATP4A1 mRNA - Expression in C205 Zellen nach TNFα Behandlung.....	49
4.1.3	Hemmung der OATP4A1 mRNA - Expression in C205 Zellen nach Kombinationsbehandlung mit IL - 6 und TNFα	50
4.2	Immunofluoreszenznachweis von OATP4A1 in der C205 Zelllinie	51
4.2.1	Einstellungen für TissueFAXS® und TissueQuest®	51
4.2.2	OATP4A1 - positive C205 Zellen nach IL - 6 Behandlung	52
4.2.3	OATP4A1 - positive C205 Zellen nach TNFα Behandlung	55
4.2.4	Nachweis von immunoreaktiven OATP4A1 in C205 Zellen nach Kombinationsbehandlung mit IL - 6 und TNFα	57
5	DISKUSSION.....	59
6	ZUSAMMENFASSUNG	61
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	63
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	66
9	TABELLENVERZEICHNIS.....	67
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	68
11	CURRICULUM VITAE	81

1 EINLEITUNG

1.1 Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom zählt gegenwärtig zu den häufigsten Krebserkrankungen in industrialisierten Ländern. Es ist als bösartiger, dem Epithel entspringender Tumor definiert, der die Submukosa befällt und des Weiteren mehrere Wandschichten durchdringen kann (Böcker et al., 2012; Ferlay J, 2012). In diesem Kapitel werden relevante Grundkenntnisse besprochen und auf die wichtigsten Aspekte der Erkrankung eingegangen.

1.1.1 Das gesunde Kolon

Das *Kolon* (Dickdarm) mit einer Länge von etwa 1,3-1,5 m schließt an das *Ileum* (Krummdarm) des Dünndarms an und endet mit dem *Anus*. Dieser Darmabschnitt stellt somit den letzten Teil des Gastrointestinaltrakts dar. Seine Funktion besteht hauptsächlich in der Rückresorption des Wassers aus dem Speisebrei und der Entleerung des Stuhls. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zu den anderen Darmabschnitten ist die Anwesenheit einer bakteriellen Besiedlung. Überwiegend aerobe und anaerobe Mikroorganismen befinden sich in dieser Darmpassage. Ihnen werden diverse Funktionen zugeschrieben, darunter die Verdauung von komplexen Kohlenhydraten, die Vitaminsynthese, die Modifikation von primären Gallensäuren, etc.

Der Dickdarm lässt sich in fünf Abschnitte unterteilen: das *Zäkuum* (Blinddarm), der *Appendix wormiformis* (Wurmfortsatz), das *Kolon* (Grimmdarm), das *Rektum* (Mastdarm) und der *Canalis Analis* (Analkanal). Je nach Lage wird das Kolon gegliedert in *Colon ascendens*, *Colon transversum*, *Colon descendens*, sowie *Colon sigmoideum*.

Das *Rektum* schließt an den gebogenen Teil des *Kolons*, dem *Colon sigmoideum* an (Schiebler and Korf, 2007; Zilles and Tillmann, 2010; Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012; Culpepper and Mai, 2013).

1.1.2 Histologie des Dickdarms

An das Lumen grenzt die vierschichtige Darmwand. Direkt an den Hohlraum grenzend ist die sogenannte *Mukosa*, darunter befindet sich die *Submukosa*.

Darauf folgen die *Muscularis mucosae* und die *Serosa*. Longitudinale sowie zirkuläre Bereiche bilden die Muskelschicht. Der longitudinale Teil setzt sich aus drei Bändern zusammen, den *Taeni coli*, die Quermuskulatur trennt die sogenannten *Haustran* voneinander. Die *Haustran* stellen nach außen gewölbte Abschnitte dar, die entsprechenden aus *Mukosa* und *Submukosa* ins Lumen weisenden *Plicae semilunares* sind nicht konstant vorhanden, sondern bilden sich bei Kontraktionen der queren Muskulatur um die Nahrungsweiterleitung zu verbessern (Junqueira, 2005; mephisto,2013).

Die *Serosa* ist eine Bindegewebsschicht, die durch das enthaltende Mesothel eine glatte Oberfläche schafft und somit eine erleichterte Bewegung der Darmwindungen ermöglicht. Außerdem sind hier die *Appendices epiploicae* aufzufinden, welche sich aus Fettgewebe zusammensetzen (Junqueira, 2005).

1.1.3 Mukosa

Die *Mukosa* (Schleimhaut) ist die innerste Schicht der Darmwand. Ein typisches Charakteristikum dieser Schleimhaut im Dickdarm stellen die Krypten dar. Sie sind spezifisch für diesen Darmabschnitt. Im Gegensatz zum Dünndarm sind hier keine Zotten vorhanden (Ulfig, 2005; Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012).

In den Krypten befinden sich dicht aneinander gereihte Epithelzellen, die als ca. 0,5 mm lange *Tubuli* bis zur *Muscularis mucosae* reichen. Auf dem Grund der Krypten liegen Stammzellen, die eine ständige Erneuerung der *Mukosa* ermöglichen. Im Epithel liegen auch viele Becherzellen und endokrine Zellen. Wegen ihrer drüsenanalogen Funktion werden die Krypten auch *Glandulae intestinales* genannt. Der Schleim (*Mucus*), der sich hauptsächlich aus Mucinen zusammensetzt, wird von den Becherzellen produziert und sezerniert.

Es folgt eine Vermischung mit dem Chymus. Elektrolyte und Wasser werden durch verschiedene Transportproteine über die Enterozyten resorbiert (Junqueira, 2005; Zilles and Tillmann, 2010; Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012; Culpepper and Mai, 2013).

Die Darmwand des Rektums ist ähnlich aufgebaut wie jene im Kolon. Die Mukosa ist durchzogen von den *Plicae transversae recti*, die im Kolon vorkommenden *Plicae semilunares*. Die Haustren fehlen in diesem Teil. Außerdem sind die *Glandulae intestinalae* in tieferen Schichten liegend (Zilles and Tillmann, 2010).

1.1.4 Mukosales Immunsystem

Da die Organe des Gastrointestinaltrakts durch Nahrungszufuhr unmittelbar auch im Kontakt mit Bakterien und anderen Krankheitserregern stehen, sind sie mit einem eigenen komplexen Immunsystem ausgestattet.

Dadurch ergibt sich eine spezifische, vielschichtige Immunabwehr, die nötig ist um Antigene von Pathogenen, kommensalen Mikroorganismen, sowie Antigenen aus der Nahrung zu differenzieren und einen ausreichenden Schutz gegen Fremdkörper zu gewährleisten. Ein Großteil der Lymphozyten befindet sich im Verdauungstrakt. Zahlreiche Lymphfollikel sitzen in der Submukosa (Junqueira, 2005).

GALT („gut- associated lymphoid tissue“) ist Teil der adaptiven Immunabwehr. Es zählt zu MALT („mucosa- associated lymphoid tissue“), welches Gewebe in definierten, anatomischen Kompartimenten bezeichnet. Es setzt sich aus Induktorkomponenten, welche die gut organisierten lymphatischen Gewebe mit Lymphozyten einschließen, sowie aus den Effektorkomponenten, denen die *Lamina propria* und die nicht organisierten Zellfraktionen zugeordnet werden, zusammen.

Über membranöse Zellen (M- Zellen) gelangen Antigene aus dem Darmlumen zu den Lymphfollikeln. Dendritische Zellen und Makrophagen sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen, die Pathogene aus ihrer Umgebung aufnehmen, prozessieren und als Peptide über ihren MHC II Rezeptor an T - Zellen präsentieren (Abbas and H., 2005). Die in der Umgebung liegenden Lymphozyten erkennen die Antigene und wandern hämatogen zu den Lymphknoten, wo es zu weiterer Differenzierung und Ausreifungsphasen von T - und B - Zellen kommt.

Letztendlich gelangen sie wieder in die Lamina propria des Darms wo sie nun ihre Aufgabe als Effektorzellen erfüllen.

Die B - Zellen sind verantwortlich für die Ausschüttung von Antikörpern, vor allem Immunoglobulin A, welche im Dickdarm angelangt, die Resorption von Krankheitserregern verhindern (Junqueira, 2005; Jensen-Jarolim et al., 2006; Kim and Shanahan, 2010).

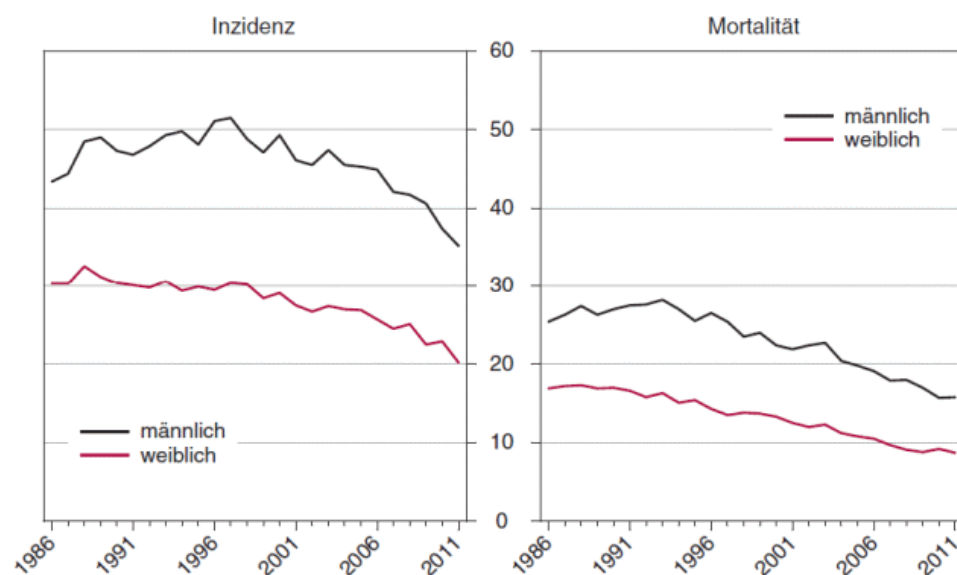
1.1.5 Das Kolonkarzinom - Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom gilt als dritthäufigste maligne Erkrankung bei Männern und als zweithäufigste bei Frauen. Dies macht 10,0% bzw. 9,2% aller Krebsfälle aus. Mehr als die Hälfte der Fälle kommen in Industrieländern vor. Die Sterberate liegt nach Schätzungen in Europa im höchsten Bereich, im Kontrast dazu weist Westafrika die geringste Mortalität auf (Ferlay J, 2012).

Im Laufe des letzten Jahrhunderts stieg die Inzidenzrate für kolorektales Karzinom parallel zur industriellen Entwicklung. Trotz der Tatsache, dass hauptsächlich die westlichen Länder, vor allem Nord – und Westeuropa, Nordamerika und Australien für die statistisch hohen Zahlen verantwortlich sind, erhöhen sich die Inzidenzfälle auch in weniger entwickelten Ländern aufgrund der Anpassung an die westliche Lebensweise. Ein drastischer Anstieg ist vor allem in vielen asiatisch - pazifischen Ländern sowie China, Japan, Korea, Singapur und Taiwan zu beobachten. Studien zeigten außerdem, dass Immigranten aus Ländern mit einer niedrigen Inzidenzrate in Ländern mit hoher Inzidenz ebenfalls eine höhere Inzidenzrate aufweisen als jene, die in den Heimatländern bleiben. Dies weist ebenfalls auf die Bedeutung der Umwelteinflüsse in Bezug auf die Karzinogenese hin (Parkin et al., 2005; Chan and Giovannucci, 2010; Chu, 2011; Wong et al., 2013).



Abb. 1: Veranschaulichung der von der WHO präsentierten CRC - Vorfälle für Männer (links) und für Frauen (rechts), bezogen auf das Alter für das Jahr 2012; die markierten Stellen deuten auf die höchsten Raten hin. Modifiziert nach Ferlay J (2012).



Q: STATISTIK AUSTRIA, Österreichisches Krebsregister (Stand 17.10.2013) und Todesursachenstatistik.
Erstellt am 25.10.2013.

Abb. 2: Inzidenz und Mortalität bei Karzinomen des Dick- und Enddarms

Die Raten sind altersstandardisiert und auf 100.000 Personen bezogen. Ein Rückgang der Inzidenzen im Laufe der Jahre ist ersichtlich. Dies lässt sich vor allem durch die rechtzeitige Erkennung und Behandlung des Tumors erklären (Statistik Austria, 2013).

1.1.6 Ätiologie

Der Großteil der Fälle von CRC ist auf eine sporadische Entstehung zurückzuführen. Umweltfaktoren spielen hier eine entscheidende Rolle.

CRC Fälle in der Familiengeschichte, fleischreiche Ernährung, Fett aus Fleischprodukten, mangelnde Ballaststoffzufuhr, Rauchen, starker Alkoholkonsum, männliches Geschlecht, das Alter, mangelnde physische Aktivität sowie auch entzündliche Erkrankungen des Darms erhöhen das Risiko an CRC zu erkranken (AICR, 2007; Böcker et al., 2012).

Zu den tumorverursachenden, entzündlichen Erkrankungen zählen Morbus Crohn und die Ulzerative Kolitis. Laut Studien sind diese Erkrankungen für zwei Drittel der Fälle verantwortlich (Eaden et al., 2001; von Roon et al., 2007; Cunningham et al., 2010).

30% der auftretenden CRC- Fälle sind durch familiäre Vererbung von mutierten Genen erklärbar, jedoch weniger als 5% beruhen auf abgrenzbaren vererbbaaren Syndromen (Lichtenstein et al., 2000; Grady, 2003; Gatalica and Torlakovic, 2008; Jasperson et al., 2010).

Folglich lassen sich erblich bedingte CRC Tumore in 2 Gruppen einteilen:

1. FAP („familial adenomatous polyposis“) und HPNCC („hereditary nonpolyposis colorectal cancer“): FAP ist, wie der Name schon sagt, charakterisiert durch eine große Anzahl von adenomatösen Polypen. Auf genetischer Ebene wird eine Mutation des Tumorsuppressorgens APC („Adenomatous - polyposis - coli“) auf Locus 5q vermutet. Variationen, wie zum Beispiel das „Gardener – Syndrom“ oder das „Turcot – Syndrom“ sind hier zu erwähnen.

Bei HPNCC, auch „Lynch - Syndrom“ genannt, sind Keimbahnmutationen an mehreren verschiedenen Genen ausschlaggebend: MSH2, MLH1, MSH6, PMS1, PMS2. Diese Gene zählen zur Gruppe der DNA - Reparaturgene. Die Veränderung beruht auf einem „mis-match“ der DNA - Bausteine, den sogenannten *Mikrosatelliten*, welche für die Reparaturproteine der DNA kodieren. Dadurch kommt es zu Instabilitäten und somit zur Entwicklung von Malignitäten (Haydon and Jass, 2002; Brown, 2007).

Die durch das Lynch - Syndrom verursachten Tumore sind proximal lokalisiert. Eine mäßige Zellteilung sowie das Eindringen von Lymphozyten sind ebenfalls typische Kennzeichen (Cunningham et al., 2010).

Die auf diesen vererbaren Dispositionen beruhenden Inzidenzen von CRC (HPNCC, FAP), treten zwar selten auf, weisen aber im Falle von FAP ein Erkrankungsrisiko von 100% auf. Der Prozentsatz bei HPNCC liegt bei 70 - 90% (Sedlacek, 2013).

2. Die Häufung in der Familienanamnese kann als zweite Gruppe der hereditären Faktoren angesehen werden. Die Vererbung ist meist multifaktoriell und erfolgt, wie auch bei HPNCC und FAP, autosomal dominant (Brown, 2007).

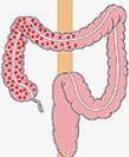
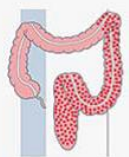
	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
Lokalisation Geschlecht Vorläuferläsion	 rechts > links F > M serratiertes Adenom	 rechts > links F > M serratiertes Adenom	 links > rechts M > F serratiertes Adenom/Adenom	 links > rechts M > F Adenom	 rechts > links F > M Adenom
schlechte Differenzierung (G3)	+++	+++	+	+	++
MSI-Status	H	S/L	S/L	S	H
Methylierung	+++	+++	++	+/-	+/-
Ploidie	2n > Aneuploidie	2n > Aneuploidie	Aneuploidie > 2n	Aneuploidie > 2n	2n > Aneuploidie
Mutationen					
APC	+/-	+/-	+	+++	++
KRAS	-	+	+++	++	++
BRAF	+++	++	-	-	-
TP53	-	+	++	+++	+

Abb. 3: Veranschaulichung der komplexen Entstehungswege von CRC

In der Abbildung sind die verschiedenen Entstehungswege des CRC dargestellt, die möglichen Kombinationen in Bezug auf die Mutationen, den MSI (Mikrosatelliteninstabilität) - Status sowie, die dadurch unterschiedlichen histologisch - morphologischen Erscheinungen und Lokalisationen im Dickdarm. Die ersten beiden Gruppen in der Abbildung folgen der serratierten Karzinogenese, Gruppe 4 und 5 zählen zur Adenom - Karzinom - Sequenz und die Gruppe 3 stellt eine Kombination beider Wege dar. Eine detaillierte Erklärung ist dem Text unter dem Abschnitt Karzinogenese (1.1.7) zu entnehmen. Abbildung aus Tannapfel et al. (2010).

1.1.7 Karzinogenese

Die Tumorgenese beim kolorektalen Karzinom ist ein komplexer mehrstufiger Prozess und weist eine langjährige Entwicklung auf, welcher Jahre bis zu Jahrzehnte andauern kann. Die Entstehungswege, die Vorläuferläsionen miteingeschlossen, sind, wie in den letzten Jahren erwiesen, ein wichtiger Faktor für die Differenzierung als auch für die Früherkennung und damit zugleich für die rechtzeitige und adäquate Behandlung. Die Instabilität im Genom ist einer der zündenden Faktoren der Karzinogenese und tritt beim kolorektalen Karzinom in einigen Variationen auf (Markowitz and Bertagnolli, 2009).

Aufgrund der vorherrschenden Komplexität hat Jass et al. eine Klassifikation erstellt, welche versucht, die Facetten auf allen Ebenen miteinzubeziehen und eine Zuordnung zu erleichtern. Zwei essentielle Vorkommnisse sind hier von Bedeutung, die sich aufgrund weiterer Variationen wiederum in fünf Gruppen unterteilen lassen. Einerseits ist hier die „**DNA- Mikrosatelliteninstabilität**“ zu erwähnen, bei welcher man zwischen hoher und niedriger oder auch nicht präsenter Instabilität differenziert. Auf der anderen Seite steht der die CpG - Inseln betreffende Phänotyp (**CIMP**), mit hohem, niedrigem oder nicht vorhandenem CIMP („CpG - Islands Methylation Phenotype“). In Abbildung 3 sind die 5 möglichen Typen dargestellt, welche aufgrund der Differenzen auf molekularer Ebene auch des Weiteren teilweise morphologisch unterschiedliche Vorläufer (Adenome), unterschiedliche Lokalisationen der Tumorbildung sowie unterschiedliche Überlebensraten zeigen. Eine vollständige Abgrenzung zwischen den Gruppen ist nicht absolut, da es Überlappungen gibt (Jass, 2007; Cunningham et al., 2010; Tannapfel et al., 2010; Böcker et al., 2012).

Nach aktuellem Wissensstand in der Forschung stehen sich zwei Karzinogenesewege gegenüber, welche aber auch zusammen auftreten können: Die Adenom – Karzinom - Sequenz und die serratierte Karzinogenese (Tannapfel et al., 2010).

Adenom – Karzinom - Sequenz: Es ist der am längsten bekannte Entstehungsweg des kolorektalen Karzinoms und beruht in erster Linie auf einer Mutation des Tumorsuppressorgens APC („Adenomatous - polyposis - coli“).

Im weiteren Verlauf ergeben sich Mutationen im KRAS - Gen sowie auch beim p53 Tumorsuppressorgen. Die chromosomale Instabilität zählt hier auch dazu.

Darunter versteht man Veränderungen im Chromosom, was sich in Aneuploidie oder auch in Deletionen, Translokationen etc. in bestimmten Genabschnitten äußern kann. Die Mikrosatelliteninstabilität tritt in diesem Fall nicht auf (Tannapfel et al., 2010; Böcker et al., 2012).

Histologisch betrachtet kommt es nach der Entwicklung von normalem Epithelgewebe über gutartige Polypen zur Entartung in malignes Gewebe.

Oft verändern Adenome mit tubulären Strukturen durch das Wachstum und die Neubildungen ihre Form zu villösen Gebilden.

Je weiter die Proliferation fortschreitet, desto höher wird auch die Anzahl des atypischen Gewebes (Young et al., 2011).

Serratierte Karzinogenese: Hier ist in erster Linie das BRAF - Gen mutiert. Das Auftreten von Hypermethylierungen der Promotorregionen der CpG – Inseln ist üblich und die Mikrosatelliteninstabilität ist hoch. Morphologische Charakteristika sind hier die serratierten Adenome: man unterscheidet zwischen sessil serratierten (SSA) und traditionell serratierten Adenomen (TSA) (Snover et al., 2005; Jass, 2007; Böcker et al., 2012).

Es besteht auch die Möglichkeit, dass beide Wege in Kombination auftreten (Jass, 2007).

1.1.8 Morphologisch - histologische Differenzierung

Adenome

Adenome stellen gutartige Veränderungen der Dickdarmschleimhaut dar.

Durch eine verstärkte Gewebsdifferenzierung des Epithels bilden sich diese Polypen und ragen in den Innenraum des Darms hinein. Der morphologische und histologische Aufbau der Dysplasien zeigt charakteristische Merkmale, welche folgende Unterteilung erlauben: Es können tubuläre Adenome, die sich durch ein schmales Fundament, einen langen Stiel und stark dendritische röhrenförmige Ausbildungen auszeichnen, auftreten, sowie auch die villösen Adenome, deren Fundament im Vergleich ausgedehnter und an den Zotten erkennbar ist.

Die tubulovillösen Adenome vereinen die Merkmale beider Formen. Diese Art der „klassischen Adenome“ tritt vor allem bei der Adenom – Karzinom - Sequenz auf.

Bei dem serratierten Karzinogeneseweg sind wie bereits beschrieben, hauptsächlich die serratierten Adenome vertreten. Bezeichnend für diese beiden Formen sind die histologischen Gebilde, die an Sägeblätter erinnern. Eine erkennbare Häufung des Auftretens im rechten Kolon ist ersichtlich (Thomas and Alexandrakis, 2006; Böcker et al., 2012).

Hyperplastische Polypen, die am öftesten diagnostizierte Form von Polypen im Dickdarm und im Mastdarm, gelten im Gegensatz zu den serratierten Polypen als harmlose Anomalie. Die Differenzierung fällt im Hinblick auf die ähnlichen Merkmale schwer. Es ist dennoch von essentieller Bedeutung zwischen diesen Formen zu unterscheiden, um das Ausmaß der Gefahr eine Malignität zu entwickeln, einschätzen zu können (Böcker et al., 2012; Fleming et al., 2012).

Karzinome

Die Penetration der Tumorzellen durch verschiedene Gewebe ist ein wichtiger Punkt in der Abgrenzung zwischen malignen und benignen Tumoren: Als invasiv gilt ein Karzinom, wenn es zumindest in die Submukosa eindringt. (Böcker et al., 2012).

Adenokarzinome sind die am öftesten auftretende Form des kolorektalen Karzinoms mit einer Häufigkeit von 85- 90% (Chu, 2011; Sedlacek, 2013).

Das muzinöse Adenokarzinom und das Siegelringkarzinom sind weitere Typen des Karzinoms, welches mit extrazellulärer im ersten Fall, oder mit intrazellulärer Schleimbildung im Falle des Siegelringkarzinoms auftreten.

Weit seltener auftretende, erwähnenswerte Formen sind das Plattenepithel -, das adenosquamöse -, das kleinzellige sowie das undifferenzierte Karzinom (Hiddemann and Bartram, 2010; Böcker et al., 2012).

1.1.9 Metastasierung

Metastasen sind bei ca. 20% der CRC - Patienten zu beobachten (Laubert et al., 2010). Eine Streuung erfolgt auf lymphatischem Wege, wobei zuerst die Lymphknoten befallen werden oder über das Blut, wo die malignen Zellen hauptsächlich die Leber befallen.

Über das TNM – Staging System wird das Ausmaß der Invasion bestimmt. Die Überlebensrate der Betroffenen ist durch die Metastasierung stark vermindert. (Cunningham et al., 2010; Böcker et al., 2012).

1.1.10 Symptome

Da die Symptome beim kolorektalen Karzinom sehr unspezifisch sind, vor allem wenn sie einzeln auftreten, und sich sowohl bei benignen, als auch bei malignen Erkrankungen manifestieren, ist es schwierig eine richtige Differenzialdiagnose zu stellen.

Oft kommt es auch vor, dass dadurch die Diagnose für CRC zu spät gestellt wird, vor allem bei Anämien und Schmerzen im Abdominalraum (Singh et al., 2009; Damery et al., 2011; Dominguez-Ayala et al., 2012; Hamilton et al., 2013). Daher versucht man anhand einer Häufung der Symptome eine korrekte Zuordnung zu schaffen. Dazu zählen Anämien, die symptomatisch aber auch ohne Anzeichen auftreten können, rektale Blutungen, Gewichtsverlust, Schmerzen im Unterleibsbereich, Übelkeit, Erbrechen sowie auch ungewöhnlicher Stuhlgang (Tsai and Gearhart, 2011).

Schmerzen im Abdominalbereich und Blutungen aus dem Rektum sind dabei die charakteristisch auftretenden Anzeichen (Garcia Rodriguez et al., 2000).

Die Beschwerden treten grundsätzlich erst relativ spät im Krankheitsverlauf auf, was eine frühzeitige Diagnose erschwert (Schulmann et al., 2002; Laubert et al., 2010).

Es wurde auch erwiesen, dass die 5 - Jahres Überlebensrate bei Patienten mit auftretenden Symptomen ungünstiger im Vergleich zu asymptomatischen Patienten ist (Laubert et al., 2010). Außerdem ist zu erwähnen, dass 90% der mechanisch bedingten Dickdarmverschlüsse auf kolorektale Karzinome zurückzuführen sind (Siegenthaler and Amann-Vesti, 2006).

1.1.11 Klassifikation und Staging

Es bestehen mehrere Klassifizierungssysteme für die Beurteilung des momentanen Befalls durch maligne Wucherungen.

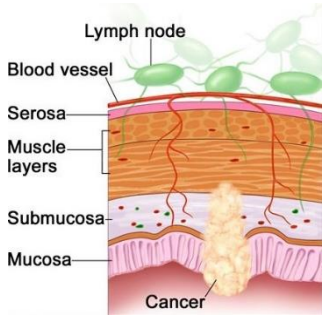
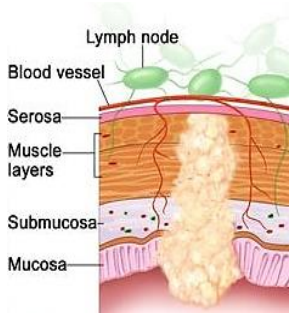
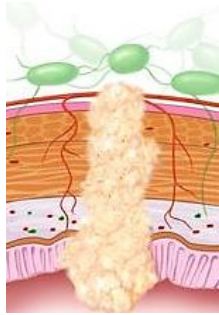
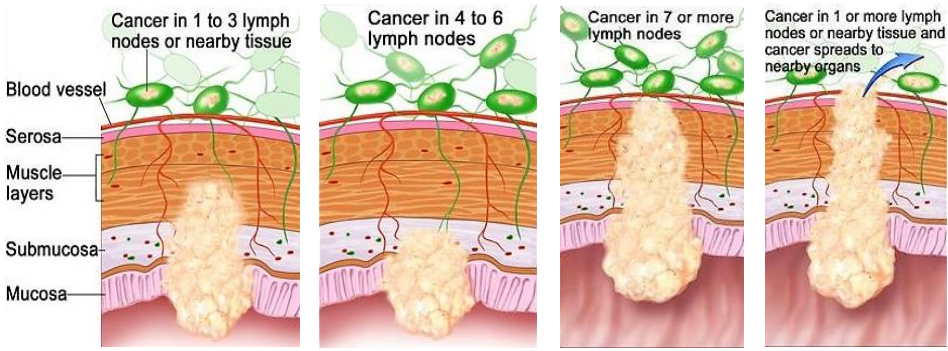
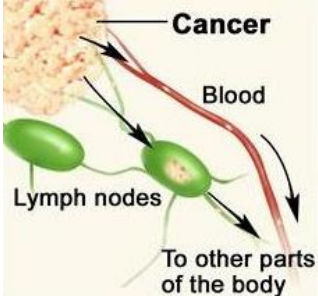
Das am meisten anerkannte und verwendete ist das TNM - System („Tumor Node Metastasis System“) des UICC („Union internationale contre le cancer“) und des AJCC („American Joint Committee of Cancer“). Manche Studien richten sich zusätzlich nach dem anfänglichen Klassifizierungsprinzip, dem Duke's System. Hier wird das Eindringen des Tumors in die Darmwand (Duke A), das Durchdringen durch die Darmwand (Duke B), der zusätzliche Befall der Lymphknoten (Duke C) und die Metastasierung in andere Gewebe (Duke D) zur Bewertung herangezogen (Sedlacek, 2013). Bei der TNM - Klassifikation wird in erster Linie aufgrund der histopathologischen Merkmale, welche klinische Relevanz zeigen und Rückschlüsse ermöglichen, unterteilt. Dieses Ordnungsprinzip ist ein wichtiger Faktor um Prognosen zu stellen sowie zur Eruiierung einer adäquaten Therapie (Cunningham et al., 2010). Zusätzlich wird hier noch die prognostizierte 5 – Jahres - Überlebensrate determiniert (Meyerhardt and Mayer, 2005).

Tab. 1: Kriterien der Unterteilung des TNM- Systems

Modifiziert nach Cunningham et al. (2010)

T	Bezieht sich auf den Fortschritt der Ausbreitung des Tumors. ➤ TX Die Einschätzung des Tumors ist nicht möglich ➤ T0 kein Nachweis für das Vorliegen eines primären Karzinoms ➤ Tis (Tumor in situ) Eindringen in die Lamina Propria oder innerhalb des Epithels ➤ T1 Die Submukosa ist bereits befallen ➤ T2 Invasion der Muscularis propria ➤ T3 Durchdringen der Muscularis propria mit Befall der Subserosa ➤ T4 Andere Organe werden befallen (T4a), Durchdringen des viszeralen Bauchfells (T4b)
N	Beschreibt zunächst die Abwesenheit bzw. die Gegenwart von Metastasen in den Lymphknoten in der Umgebung sowie dessen Streuung. ➤ NX Lymphknoten in der Umgebung können nicht festgelegt werden ➤ N0 Es besteht kein Nachweis der Lymphknotenmetastasierung ➤ N1 Metastasierung begrenzt sich auf einen(N1a), zwei oder drei (N1b) Lymphknoten ➤ N2 betroffen sind vier bis sechs(N2a) oder sieben und mehr (N2b) Lymphknoten in der Umgebung
M	Klassifiziert Metastasierungen außerhalb des umgebenden Bereichs des ursprünglich malignen Gewebes, die Abwesenheit wird wiederum ebenfalls inkludiert. ➤ MX Die peripheren Metastasierungen sind nicht feststellbar ➤ M0 Es sind keine peripheren Metastasierungen präsent ➤ M1 einseitige periphere Metastasierungen (M1a) oder es ist mehr als eine Seite betroffen (M1b)

Tab. 2: Unterteilung der Stadien von CRC nach Fortschritt mit Veranschaulichungen
entsprechende TNM - Klassifizierung und 5 – Jahres - Überlebensrate nach Meyerhardt and Mayer (2005); Die Bilder verdeutlichen die Stadium – abhängige Infiltration der Tumorzellen durch die verschiedenen Gewebsschichten sowie die Streuung in andere Organe. Abbildungen modifiziert nach National Cancer Institute (2014).

Stadium	TNM-Einteilung & 5 Jahres-Überlebens-rate
I 	TNM: I: T1-2,N0,M0 5-Jahresüberlebens-rate: >90%
IIA 	IIB  TNM: IIA: T3,N0,M0 IIB: T4,N0,M0 5-Jahresüberlebens-rate: >60-85%
IIIA IIIB IIIC 	TNM: IIIA: T1-2,N1,M0 IIIB: T3-4,N1,M0 IIIC: T(1-4),N2,M0 5-Jahresüberlebens-rate: 25-65%
IV 	TNM: IV: T(14),N(1,2),M1 5-Jahresüberlebens-rate: 5-7%

Weiters lassen sich CRCs, je nach Differenzierung, in unterschiedliche Stufen einteilen. Die Bandbreite reicht von G1 bis G4, wobei mit G1 die höchste Differenzierung eingestuft wird (Hiddemann and Bartram, 2010).

1.1.12 Risikofaktoren und Prävention

Das kolorektale Karzinom wird als eine umweltbedingte Erkrankung angesehen. Der Großteil der Inzidenzfälle ist auf solche Faktoren zurückzuführen. Die Ernährung trägt hierbei viel bei. Hoher Konsum von rotem Fleisch und tierischen Fetten fördern die Entwicklung von Karzinomen, pflanzliche Fette scheinen keine Effekte zu zeigen. Ballaststoffe, Obst und Gemüse sollen hingegen präventiv wirken.

Mangelnde Bewegung sowie Übergewicht sind ebenfalls Risikofaktoren. Nach Ergebnissen einer Metaanalyse soll ein BMI - Wert von mehr als 30 kg/m² das Risiko für CRC um 20% erhöhen (Moghaddam et al., 2007).

Es gibt Studien, die auch einen Zusammenhang mit unterschiedlichen Hormonleveln beschreiben. Das Risiko soll bei Frauen, die Östrogene substituieren geringer sein (Lin et al., 2013).

Auch beim Alter kann man eine Häufung des Risikos in einem bestimmten Bereich erkennen. Die höchsten Inzidenzraten weisen Patienten zwischen 65 und 74 Jahren auf (SEER, 2014). Eine positive Familienanamnese wird ebenfalls mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko verbunden (Johns and Houlston, 2001).

Bewegung soll hingegen positive Auswirkungen bezüglich der Prävention von CRC gewährleisten.

Bei Männern scheint der risikovermindernde Effekt hier außerdem höher zu sein als bei Frauen (Boyle and Langman, 2000, Calton et al., 2006, Larsson et al., 2006).

1.1.13 Diagnostik

Wie bereits erwähnt, entstehen mehr als 90% aller CRCs als Folge von Adenomen (Böcker et al., 2012).

Daher ist ein rechtzeitiges Screening für die Prävention der Ausartung vom benignen in den malignen Zustand von großer Bedeutung (Loeve et al., 2000, Tappenden et al., 2007). Außerdem ist es wichtig, das richtige Stadium und den Fortschritt des Tumors festzuhalten, um eine adäquate Therapie zu initiieren (Laubert et al., 2010).

Grundsätzlich wird die endgültige Diagnose für CRC anhand der Ergebnisse von Kolonoskopie, Sigmoidoskopie, sowie einer Biopsie gestellt (Cunningham et al., 2010). Um Metastasierungen auszuschließen, sollten computertomographische Untersuchungen (CT) der möglichen befallenen Organe und Gewebe durchgeführt werden (Mauchley et al., 2005).

FOBT(Fecal Occult Blood Test) ermöglicht ein Auffinden von bereits geringen verborgenen Mengen von Blut im Stuhl mithilfe einer chemischen Reaktion. Dabei wird sich die Pseudoperoxidaseaktivität von Hämoglobin zu Nutze gemacht. (Strasinger and Di Lorenzo, 2014). FIT (Fecal immunohistochemical test) ist die auf Immunohistochemie basierende Methode, wodurch gezielt humanes Blut erkannt wird.

sDNA test: Bei diesem Test wird sich die veränderte DNA bei karzinogenen Zellen zu Nutze gemacht. Es werden wiederum Stuhlproben entnommen, worin Zellen von Karzinomen oder großen Polypen enthalten sein können (American Cancer Society, 2011).

Die fixative Sigmoidoskopie ist weit weniger invasiv als die Kolonoskopie und die Notwendigkeit der Sedierung fällt hier weg (Schoen et al., 2012). Ein dünner 60 cm langer Schlauch wird dabei in das Rektum eingeführt. Der untere Teil des Kolons, also der sigmoidale Teil, sowie das Rektum können durch diese Methode diagnostisch erfasst werden. Wird ein Polyp oder Karzinom entdeckt, folgt darauf die Untersuchung des gesamten Darms mithilfe der Kolonoskopie.

Kolonoskopie: Dieses Verfahren funktioniert nach einem ähnlichen, komplexeren Prinzip als die Sigmoidoskopie.

Es ist eine höchst sensible Methode, die es ermöglicht ein exaktes klinisches Bild des ganzen Darms zu erhalten und ermöglicht bei Bedarf auch die Entfernung von Polypen. Es erfolgt in den meisten Fällen eine Sedierung des Patienten. Der Nachteil ist die Invasion des Eingriffs, es kann zu Blutungen und Perforationen führen, vor allem nach Entfernung von Polypen.

Doppelkontrastbariumeinlauf: Hier wird ein Einlauf mit Bariumsulfat gemacht, um den Kontrast für die Röntgenbilder zu ermöglichen, außerdem wird Luft hineingepumpt um den Darm möglichst gut sichtbar zu machen (American Cancer Society, 2011).

CT (computertomographische) Kolonographie: Diese kommt bei Patienten zum Einsatz, bei denen das Karzinom mithilfe der geläufigen Verfahren nicht erreichbar ist (Laubert et al., 2010).

Es wird ein dreidimensionales Röntgenbild erstellt, der Patient muss nicht sediert werden und der Eingriff ist im Allgemeinen kaum invasiv. Wird eine bestimmte Größe der Polypen überschritten, wird im Normalfall zusätzlich eine Koloskopie angeordnet.

Während FOBT und der sDNA Test vor allem für die Krebsuntersuchung geeignet ist, sind die anderen erwähnten Methoden wie die Koloskopie und Sigmoidoskopie zusätzlich für das Erkennen von Polypen einsetzbar (American Cancer Society, 2011).

1.1.14 Therapie

Für lokale solide Tumore wird standardmäßig eine chirurgische Entfernung durchgeführt (Cunningham et al., 2010).

Zur adjuvanten Behandlung haben sich Arzneimittelkombinationen als günstig erwiesen: FOLFOX (5-Fluorouracil, Folinsäure, Oxaliplatin) sowie XELOX (Capecitabin, Oxaliplatin) stellen die hauptsächlich angewendeten Therapieschemen dar (Aktories et al., 2013).

Fluorouracil gilt als Grundmedikament bei der adjuvanten Therapie von CRC.

Es ist ein Pyrimidinderivat, welches mit Fluormolekülen substituiert ist. Seine Wirksamkeit beruht auf der Hemmung der Thymidylatsynthase.

Normalerweise wird zu Fluorouracil zusätzlich Leucovorin verabreicht, da es als ein Derivat der Folsäure die Fähigkeit hat, die Bindung des Fluorouracils an das Enzym zu stabilisieren (Meyerhardt and Mayer, 2005).

Die perorale Verabreichung von Fluorouracil allein war nicht immer gängig, da es laut Studien zu einer mangelhaften Aufnahme über den GI - Trakt führte (Hahn et al., 1975). Die Präsenz unterschiedlicher Mengen eines wesentlichen, abbauenden Enzyms von Fluorouracil, der Dihydropyrimidindehydrogenase, könnte eine Erklärung dafür sein. Um dies zu umgehen wurden Prodrugs entwickelt (Pentheroudakis and Twelves, 2002, Meyerhardt and Mayer, 2005). Eine Optimierung in der Wirksamkeit des oralen Präparates gewährt zusätzlich die Kombination mit Oxaliplatin (Porschen et al., 2007, Cassidy et al., 2008).

Hauptsächlich wird Fluorouracil intravenös verabreicht und mit einer Halbwertszeit von 20 Minuten sehr schnell aus dem Plasma eliminiert (Aktories et al., 2013).

Es wurde gezeigt, dass die Kombination mit Leucovorin, neben einem Zurückgehen des Tumors um mehr als die Hälfte, auch eine Erhöhung der Überlebensraten bei Patienten mit metastasierendem kolorektalem Karzinom um 6 Monate erreicht hat (Wolpin and Mayer, 2008).

Neben starken Schädigungen der Mukosa innerhalb des Verdauungstraktes, ist die Myelosuppression eine charakteristische Nebenwirkung. Außerdem ist hier das sogenannte Hand - Fuss- Syndrom zu erwähnen.

Vor allem bei langer Anwendung und bei Verabreichung des oralen Prodrugs (Capecitabin), manifestiert sich diese Konsequenz. Sie äußert sich durch schmerzhaft Ablösungen der Haut an den Innenseiten von Händen und Füßen (Aktories et al., 2013).

Irinotecan ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der Therapie. Es ist ein halbsynthetisch hergestelltes Prodrug aus Camptotecin. Um eine ausreichende Hydrophilie zu erreichen, wurde es über eine Carbonsäure mit einem Dipiperidylrest verestert. Es zählt zur Gruppe der Topoisomerase - 1 Hemmer. Diese Enzyme sind verantwortlich für die Entwindung der DNA während der Replikation. Durch die Hemmung kommt es bei der Zellteilung zu nicht reparierbaren Brüchen in den DNA - Strängen und somit zum Zelltod.

Nach Metabolisierung von Irinotecan in der Leber entsteht das wirksame SN-38, welches eine Halbwertszeit von 10 Stunden aufweist.

Zu den unerwünschten Folgeerscheinungen zählen Myelodepression, nach erst einigen Tagen einsetzender Durchfall, sowie das cholinerge Frühsyndrom. Hierbei handelt es sich um die Auswirkungen einer Blockade des Enzyms Acetylcholinesterase, die sich in erhöhter Sekretion von Speichel und Tränenflüssigkeit äußern, sowie auch Durchfall (Meyerhardt and Mayer, 2005; Aktories et al., 2013).

Oxaliplatin: Es zählt zu jener Zytostatikagruppe, der eine DNA- interkalierende Wirkung zugeschrieben wird und stellt eine planare Molekülverbindung dar, bestehend aus dem Zentralatom Platin und den komplexierenden Komponenten 1,2 Diaminocyclohexan („DACH“) und Oxalat. Die Applikation erfolgt parenteral und verteilt sich schnell im Gewebe. Die Elimination erfolgt hauptsächlich renal. Oxaliplatin wirkt neurotoxisch und kann ebenfalls zu einer peripheren Neuropathie führen. Studien haben erwiesen, dass es die Wirkung in Kombination mit 5 - Fluorouracil signifikant steigert (Raymond et al., 1997). Dies wäre durch eine verringerte Enzympräsenz (Thymidylatsynthase) als Folge der oben beschriebenen Wirkung erklärbar (Raymond et al., 2002; Aktories et al., 2013).

Biologicals

Ein neuerer Ansatzpunkt zur Behandlung der Karzinome ist der Eingriff in die Versorgungs- und Überlebensmechanismen.

Ziel der Antikörpertherapie ist es spezifisch in diese Mechanismen einzugreifen und somit die Tumorprogression und Metastasierung zu verhindern und Nebenwirkungen am Patienten zu minimieren.

Zwei Eingriffspunkte haben sich beim kolorektalen Karzinom als wirksam erwiesen: Der Epidermale Wachstumsfaktor - (**EGF**) Rezeptor und die Angiogenese (**VEGF**).

Cetuximab ist ein monoklonaler chimärer Antikörper, der gegen den EGF - Rezeptor gerichtet ist und durch die Liganden - analoge, aber stärker affine Bindung an den Rezeptor eine Anlagerung des EGFs verhindert und somit die dadurch ausgelösten Signalwege stoppt. Akne-analoge Hautveränderungen sind typische Nebenwirkungen.

Bevazizumab: Der humanisierte monoklonale Antikörper greift in die Gefäßneubildung ein, indem er den VEGF („vascular endothelial growth factor“) bindet und damit die über seine auf dem Endothel situierten Rezeptor - ausgelösten Signalkaskaden verhindert. Die Versorgung der Tumore wird blockiert und das Wachstum somit verringert (Meyerhardt and Mayer, 2005; Aktories et al., 2013).

COX-Hemmer: Das Enzym Cyclooxygenase 2 (COX - 2) scheint in der Karzinogenese ebenfalls von Bedeutung zu sein. Die Expression wird vermutlich durch eine gesteigerte Stimulation von Zytokinen und Wachstumsfaktoren angeregt, welche in tumorösen Gewebe erhöht sind (Smith et al., 2000; Subbaramaiah and Dannenberg, 2003).

Daher wurde der Einsatz von NSAIDs wie Rofecoxib und Celecoxib mit einer verringerten Ausbildung von Neoplasien in Verbindung gebracht (Rahme et al., 2003). Aspirin, ebenfalls ein COX - Hemmer, kann eine Verringerung der Entwicklung von CRC bewirken. Die Mindestdauer der Einnahme sollte dabei bei 5 Jahren liegen (Thorat and Cuzick, 2013).

Behandlung bei metastasierendem CRC

Grundsätzlich gilt die operative Entfernung des befallenen Gewebes, soweit möglich, als Standard (Cunningham et al., 2010).

Kombinationstherapien haben eine starke Optimierung der Überlebensraten bei der palliativen Behandlung von fortgeschrittenen, metastasierenden kolorektalen Karzinomen gebracht (Tournigand et al., 2004).

Neben FOLFOX (Fluorouracil, Folinsäure und Oxaliplatin) gilt FOLFIRI (Irinotecan, Folinsäure und Fluorouracil) als gängige Behandlung (Aktories et al., 2013).

Die zusätzliche Anwendung der bereits beschriebenen Antikörper hat ebenfalls wesentlich zu einer Verbesserung der Ansprech - und Überlebensrate von Metastasierungen von CRC beigetragen (Hurwitz et al., 2004; Van Cutsem et al., 2009; Yang et al., 2010).

Trotz einiger bereits bestehender Behandlungsmöglichkeiten, ist über die dadurch verursachten Nebenwirkungen, die Neuerkrankungen und Überlebensraten bei Patienten mit CRC nicht hinwegzusehen (Ferlay, 2012).

Daher ist man stetig auf der Suche nach optimierten Therapieschemen, die ein genaues Befassen und eine ausgeprägte Kenntnis der komplexen Entstehungswege des CRC und den darin involvierten Faktoren, voraussetzen.

Einen dieser Faktoren stellen Transportproteine dar. Es ist bekannt, dass bestimmte Transporter im Tumorgewebe eine veränderte Expression aufweisen. Eine wichtige, große Gruppe verkörpert dabei die OATP - Familie (Svoboda et al., 2011, Obaidat et al., 2012; Buxhofer-Ausch et al., 2013).

1.2 OATP- Familie

1.2.1 Allgemeines

Die Bezeichnung OATPs oder „Organic Anion Transporting Polypeptides“ umfasst eine große Gruppe von Transportproteinen, welche einen Natrium- unabhängigen Transport von unterschiedlichen endogenen und exogenen Stoffen ermöglichen.

Diese zeichnen sich meist durch hohe Molekulargewichte von über 300 kDa und einer hohen Affinität gegenüber Albumin aus. Hauptsächlich werden anionische amphiphile Substrate transportiert. OATPs scheinen in Abhängigkeit der chemischen Eigenschaften ihrer Substrate und des vorliegenden pH - Wertes jene in beide Richtungen transportieren zu können.

Die Ergebnisse aus Hydrophobizitätsanalysen zeigen, dass sich alle OATPs aus 12 transmembranären Domänen zusammensetzen.

Extrazellulär befinden sich sechs unterschiedlich große Domänen, welche Schleifen ausbilden. Zwischen den Segmenten 9 und 10 liegt zum Beispiel eine große Domäne (Loop 5), außerdem ist auch Loop 3 erwähnenswert, da hier am Übergang zum sechsten transmembranären Segment die für die OATPs typisches Konsensus Sequenz *D-X-RW-(I,V)-GAWW-XG-(F,L)-L* liegt. In der Literatur findet man sie häufig unter dem Synonym „OATP - superfamily signature“.

N - Glykosylierungsstellen und Cysteinreste sind an der Außenseite der Zellmembran präsent (Tamai et al., 2000; Meier and Stieger, 2002; Hagenbuch and Meier, 2003; Hagenbuch and Meier, 2004).

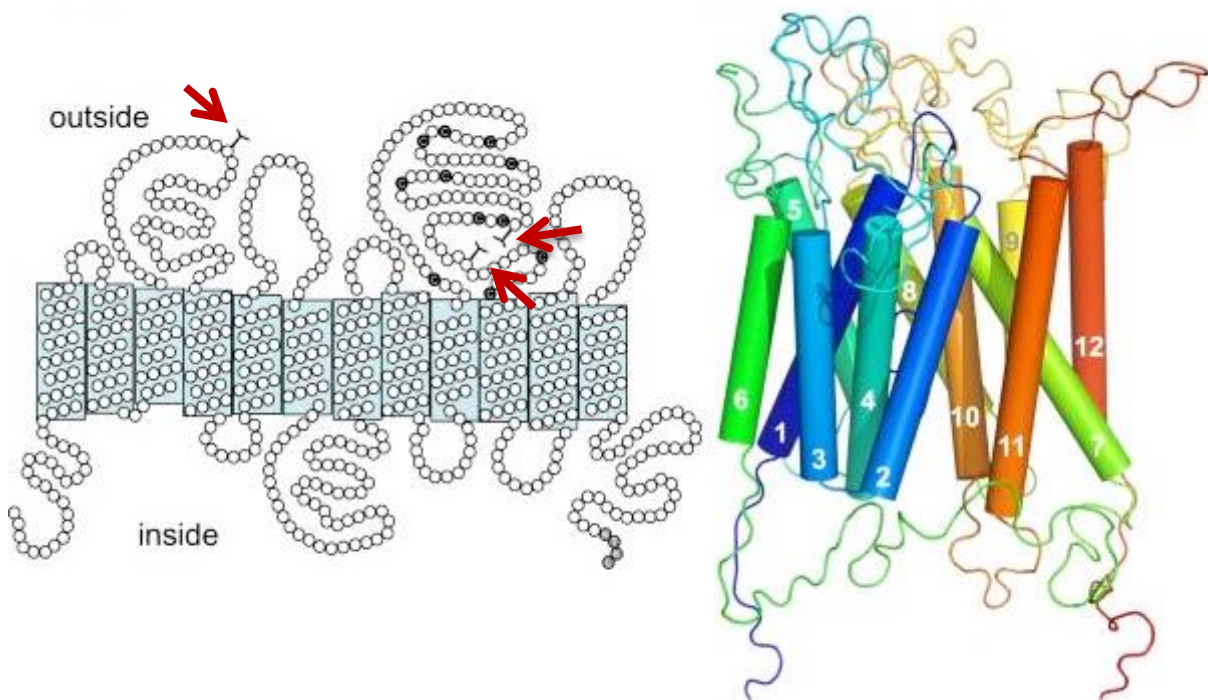


Abb. 4: Graphische Darstellung der Struktur von OATP - Transportern

Links ist der OATP1A2 Transporter mit seiner transmembranären Struktur zu sehen. Auf der inneren und äußeren Seite der Membran sind die Loops ersichtlich. Die Cystein - Bindungsstellen sind mit Pfeilen angedeutet. Rechts ist ein 3 - dimensionales Modell des OATP1B1 - Transporters abgebildet, die transmembranären Segmente sind beziffert. Modifiziert nach Obaidat et al. (2012).

1.2.2 Klassifizierung und Nomenklatur

Das HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) unterteilt die SLCs („Soluble Carriers“) in insgesamt 43 verschiedene Familien.

Um dieselbe Gruppe zu vertreten, müssen sie mindestens 20 bis 25% Identität in der Aminosäuresequenz aufweisen (Hediger et al., 2004).

Hagenbuch et al. hat im Jahre 2004 ein verbessertes Klassifizierungsmodell veröffentlicht, welches von der HGNC anerkannt wurde. SLC21 wurde umbenannt in SLCO, wobei das „O“ OATP signifizieren soll.

Durch diese simple Änderung lassen sich viele Konfusionen ausschließen und eine spezifische und übersichtliche Zuordnung der schnell wachsenden Gruppe der Transporter wird erreicht. „SLCO“ bezeichnet nun die Genfamilie, „OATP“ steht für die entsprechenden Proteine.

Die Zugehörigkeit zu einer Genfamilie wird mithilfe von ansteigender Nummerierung bewerkstelligt (Familie: OATP1, 2, 3, 4, 5, 6), die Subfamilie mithilfe von Buchstaben (A, B, C, D, E, F). Bei unterschiedlichen Proteinen derselben Gensubfamilien wird zur Identifizierung noch eine weitere Zahl hinzugefügt (Bsp.: OATP1A1, OATP1A2). Beim Menschen sind 11 OATPs bekannt. Diese werden in sechs Gruppen, nach der Übereinstimmung der Aminosäuresequenz mit mehr als 40%, geteilt. Bei einer Analogie von mehr als 60% werden sie in weitere Untergruppen bzw. Unterfamilien gegliedert. Die am besten analysierte und bekannte Gruppe ist die OATP1 – Familie. Die Schreibweise „Oatp1“ bezieht sich auf die Transportproteine in Nagern. Die Großschreibung gilt nur für die humanen Proteine (Hagenbuch and Meier, 2003; Hagenbuch and Meier, 2004; Obaidat et al., 2012; Buxhofer-Ausch et al., 2013).

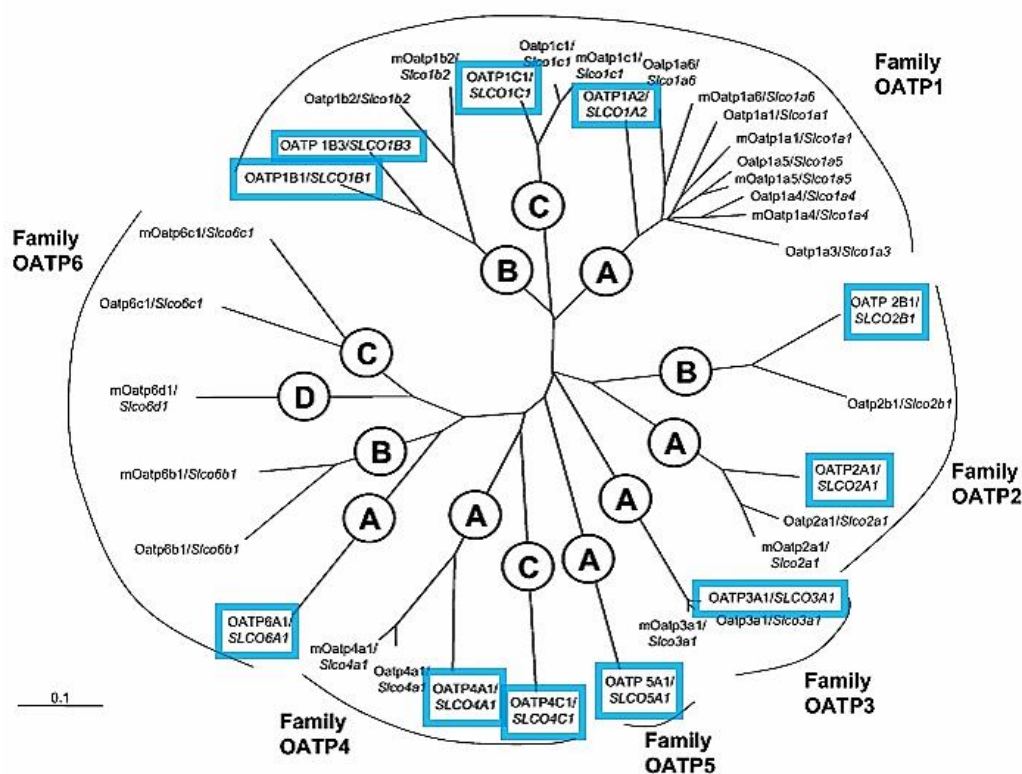


Abb. 5: Familienstammbaum der OATP (Organic Anion Transporting Polypeptide) - Familie
Die blau markierten Stellen sollen die humanen Vertreter der jeweiligen Gruppen hervorheben.
Modifiziert nach Hagenbuch und Meier (2004).

1.2.3 Expression und Verteilung der OATPs in Normal - und Tumorgewebe

Die Verteilung von OATPs im Gewebe unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht. Manche Untergruppen sind nur in bestimmtem Gewebe zu finden (OATP1, OATP2, OATP3, OATP4, OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP1C1), andere treten ubiquitär auf (OATP2A1, OATP2B1, OATP3A1, OATP4A1). Das kann ein Hinweis auf die unterschiedliche Funktionalität der verschiedenen Carrier sein.

In der Leber spielen die OATPs eine besonders wichtige Rolle. In der sinusoidalen Plasmamembran situiert, sind sie zuständig für die Aufnahme und Elimination von Endo - und Xenobiotika. Durch diese Aufgabe sind sie bei der Pharmakodynamik und Pharmakokinetik von großer Relevanz.

Eine Möglichkeit wäre, dass Medikamente, die zu schnell über die OATP Transporter eliminiert werden, durch einen OATP - Inhibitor länger im Körper verweilen, um ihre Wirkung zu erreichen oder umgekehrt, Stoffe, die ineffektiv sind, durch erhöhte OATP Expression schneller eliminiert werden können. In Tumorgewebe ist ein stark verändertes Auftreten ersichtlich. Normalerweise gewebspezifische Carrier verteilen sich hier unterschiedlich. Beispielsweise zeigten OATP1B1 und OATP1B3, im Normalfall leberspezifische Transporter, Expression in Karzinomen verschiedener Organe. Sie wurden unter anderem in Brust – Kolon - oder Pankreaskarzinomen nachgewiesen (Hagenbuch and Meier, 2004; Lockhart et al., 2008; Buxhofer-Ausch et al., 2013).

1.2.4 Substrate und Transportmechanismen

Wie bereits erwähnt (Kapitel 1.2.1, Seite 20), werden vor allem amphiphile, anorganische Substrate transportiert: Gallensäuren, Steroidhormonkonjugate, Thyroidhormone, Steroidhormonsulfate, Bilirubin, Prostaglandine, Glucuronide, aber auch exogene Verbindungen, wie zum Beispiel Arzneistoffe (Statine, ACE- Hemmer, Digoxin etc.)

Diese Substrate besitzen ein hohes Molekulargewicht und bei vielen ist strukturell eine Analogie ersichtlich. Zum Beispiel gehören Steroidverbindungen dazu (Hagenbuch and Meier, 2003; Hagenbuch and Meier, 2004; Hagenbuch and Gui, 2008).

Die Transportmechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. Es existieren einige kontroverse Studien.

Dazu zählt die Annahme, dass beim Transport eine positive geladene Pore, geknüpft an einen Schaltmechanismus, eine Rolle beim Substrattransport bei allen OATPs/Oatps zu spielen scheint (Meier-Abt et al., 2005).

Der pH - Wert als Transportkatalysator scheint ebenfalls eine essentielle Bedeutung zu haben. So wurde zum Beispiel an verschiedenen Transportern die pH - Wert Abhängigkeit in Bezug auf den Substrat-Influx geprüft, wonach ein niedrigerer extrazellulärer pH - Wert die Aufnahme erhöhen soll. Es gibt auch Nachweise, dass dabei gleichzeitig ein HCO_3^- - Ausstrom bewirkt wird.

Demnach könnten OATPs als Anionenaustauscher fungieren. Ebenfalls zu erwähnen sind die Hypothesen, die GSH sowie HCO_3^- als bestehende Gegenionen für einen Substrateinstrom beschreiben, wie es bei Oatp1a1 in Oozyten als Gegenionen für Taurocholsäure oder Sulfobromophtalein nachgewiesen wurde (Satlin et al., 1997).

Wie bei OATP1B1 und OATP1B3 gezeigt wurde, ermöglichen OATPs eine bidirektionale erleichterte Diffusion. Der Einfluss des pH - Wertes auf den Transport wurde hier widerlegt (Nozawa et al., 2004; Mahagita et al., 2007). In allen Studien wird darauf hingewiesen, dass unbedingt weitere Analysen zu diesem Thema erforderlich sind (Satlin et al., 1997; Kobayashi et al., 2003; Nozawa et al., 2004; Mahagita et al., 2007; Leuthold et al., 2009; Svoboda et al., 2011).

1.2.5 SLCO/ OATP4A1

OATP4 ist eine Familie, die sich in OATP4A1 sowie OATP4C1 unterteilen lässt. SLCO/OATP4A1 ist am 20q13.1 Chromosom loziert, und setzt sich aus 722 Aminosäuren zusammen. OATP4A1 ist in allen Geweben nachzuweisen. Auffallend hohe Expressionsraten wurden in Herz, Leber, Pankreas, Niere und in der Plazenta nachgewiesen. Im fetalen Gewebe zeigt sich eine Expression in allen Geweben. Bei Gewebeproben von Erwachsenen konnte man Schwankungen beobachten.

In diversen Krebszelllinien wurden die Expressionsraten geprüft, wobei in Kolonkrebiszelllinien stark erhöhte Werte festgestellt werden konnten. In Brustkrebsgewebe wurde ebenfalls eine erhöhte Expression nachgewiesen (Tamai et al., 2000; Pizzagalli et al., 2003; Nozawa et al., 2005).

Neben Substraten wie Cholaten und Thyroidhormonen (T3, T4, rT3), gilt es auch, wie an einer humanen Nierenzelllinie (HEK 293) gezeigt werden konnte, als Transporter von Prostaglandin E2, Benzylpenicillin und von konjugierten Steroids substraten.

Die Analyse des zweiten Vertreters der Gruppe, OATP4C1 ergab eine nierenspezifische Expression (Tamai et al., 2000; Fujiwara et al., 2001; Hagenbuch and Meier, 2004; Mikkaichi et al., 2004; Kalliokoski and Niemi, 2009).

1.3 Zytokine und OATPs

1.3.1 Immunologische Umgebung in kolorektalen Karzinomen

Die immunologische Umgebung im kolorektalen Karzinom scheint einen wesentlichen Stellenwert in Bezug auf die Steuerung der Karzinogenese zu übernehmen.

Im nicht ausgearteten Zustand wird angenommen, dass ein Gleichgewicht zwischen tumorfördernden und tumorsupprimierenden Immunofaktoren herrscht. In einem weiter fortgeschrittenen Stadium rücken vermehrt tumorfördernde Faktoren in den Vordergrund. (Terzic et al., 2010).

Vor allem die angeborene Immunantwort ist ein wichtiger Faktor in der Tumorpromotion, wohingegen die adaptive Immunabwehr für die gegensätzlichen Wirkungen verantwortlich zu sein scheint. Es gibt Studien, welche aussagen, dass die Infiltration von NK - Zellen in Tumorgewebe mit positiver Prognose bei kolorektalem Karzinom verbunden ist, wohingegen zum Beispiel das Eindringen von Makrophagen oder Mastzellen in verschiedene Tumorgewebe ein schlechter Prognosefaktor sein soll (Coca et al., 1997; Imada et al., 2000; Ribatti et al., 2003; de Visser et al., 2006).

Das Zusammenspiel zwischen den tumoreigenen Zellen, den in Stroma vorhandenen Zellen und dem dadurch bewirkten Eindringen von dendritischen Zellen, T - Zellen sowie auch TAMs („tumor associated macrophages“), lässt auf eine erfolgreiche Tumorprogression rückschließen (Karin and Greten, 2005).

TAMs sind in der Lage eine Vielzahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderen Entzündungsmediatoren zu sezernieren, welche unter anderem auch die für die Tumorausbreitung wichtige Gefäßneubildung anregen (Torisu et al., 2000; Coussens and Werb, 2002; Schoppmann et al., 2002; Chen et al., 2005; Lewis and Pollard, 2006).

Daraus wird ersichtlich, wie präsent Botenstoffe des Immunsystems, sowie TNF α , IL - 6, IL - 1 etc., in der Umgebung von malignem Gewebe sind und somit mitverantwortlich für einen Tumorfortschritt sind. Sie verstärken die Angiogenese und bewirken eine Unterdrückung der Immunsuppression (Balkwill et al., 2005; Terzic et al., 2010).

1.3.2 TNF α

TNF α induziert Signale über den Rezeptor p55, welcher auf allen Zellen exprimiert wird. Auf molekularer Ebene stellt es ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 17 kDa dar (Beutler, 1999). Die Wirkungen von TNF α sind sowohl antikarzinogen, können aber auch proliferationsfördernd für den Tumor sein (Kollias et al., 1999; Balkwill and Mantovani, 2001; Balkwill, 2002).

Die Effekte werden über die Transkriptionsfaktoren NF-kB und AP-1 ausgeübt. Gebildet wird TNF α in Makrophagen, IL - 6 hat neben letzteren auch Endothelzellen oder auch Fibroblasten als Bildungsstätte (Horn, 2009).

Die Ausbreitung eines Karzinoms setzt eine erhöhte Angiogenese, d.h. die Ausbildung eines Gefäßsystems im Tumor, voraus, welche vor allem durch den Einfluss von TNF α gewährleistet wird (Bergers and Benjamin, 2003; Popivanova et al., 2008).

1.3.3 IL - 6

IL - 6 agiert über den JAK/STAT3 - Signalweg. Er bindet an seinen Rezeptor, IL - 6R, genau genommen an die Untereinheit IL - 6R α .

Dieses Polypeptid aktiviert die gp130 Untereinheit, welche nun die Januskinasen (JAK) zu weiteren Phosphorylierungen von STAT3 katalysiert und somit aktiviert. (Bindung an Zielgene) (Kishimoto, 2005; Grivennikov et al., 2009).

IL - 6 wird unter anderem von Makrophagen sezerniert. Im kolorektalen Gewebe, wo viele dieser Immunzellen präsent sind, führt es über den beschriebenen Signalweg zur Förderung der Ausschüttung von IL - 10 durch die Kolonkrebszellen. Diese Tatsache ist deshalb interessant, da IL - 10 einen immunsuppressiven Charakter nach sich zieht, was darauf schließen lässt, dass die Tumorzellen durch diesen Mechanismus dem Immunsystem ausweichen können und so das weitere Wachstum vonstattengehen kann. Ebenso wurde gezeigt, dass diese Krebszellen die Ausschüttung von IL - 6 durch die Makrophagen anregen (Herbeuval et al., 2004).

Nach Stimulierung von Makrophagen mit LPS (Liposaccharid) wurde die Ausschüttung von den Zytokinen TNF α , IL - 6 und IL - 1 β durch diese beobachtet. Sie spielen nicht nur in der Zelldifferenzierung eine Rolle, sie wirken auch anregend für die Wanderung von Krebszellen und verstärken damit ihr invasives Verhalten (Hagemann et al., 2004, Lin et al., 2006; Jedinak et al., 2010).

1.3.4 Zytokine und Kolonkarzinom

In Kolonkrebszellen, welchen eine Darm - entzündliche Erkrankung vorausgeht, wurde gezeigt, dass TNF α über NF κ B die Ausschüttung von IL - 6 stimulieren kann, wohingegen die Kombination aus TNF α und IL - 6 den STAT3 - Signalweg aktiviert (Legrand-Poels et al., 2000; Hamilton et al., 2011).

Die Aktivität von NF κ B kann außerdem über aktives STAT3 verlängert werden, was den Tumorfortschritt durch die synergistische Wirkung auf die Genexpression begünstigt (Bollrath and Greten, 2009; Lee et al., 2009).

1.3.5 Einfluss auf Transporter

Die Resultate von Studien, die sich bis jetzt mit den Auswirkungen von IL - 6 und TNF α im Zuge einer entzündlichen Reaktion befassten, sind zum Teil widersprüchlich. Vor allem die Transporter in der Leber wurden untersucht.

In Mäusen sowie auch in Ratten wurde hauptsächlich eine Hemmung der Expression, wie zum Beispiel bei Oatp1 und Oatp2, nachgewiesen (Hartmann et al., 2002; Geier et al., 2003). Bei Versuchen mit humanen Hepatozyten wurden Down - Regulationen von OATP1B1, OATP1B3 sowie OATP2B1 beobachtet (Le Vee et al., 2009).

Im Kontrast dazu bewirkten Entzündungen, beispielsweise durch eine Hepatitis C Infektion im Gastrointestinaltrakt, eine gesteigerte Expression der Transporter (Ogasawara et al., 2010).

Bei entzündlichen Erkrankungen des Darms konnte außerdem eine signifikant erhöhte Expressionsrate von OATP4A1 und OATP2B1 nachgewiesen werden. In Lebermetastasen von kolorektalem Karzinom konnte ebenfalls eine starke Induktion von OATP4A1 demonstriert werden (Wojtal et al., 2009; Wlcek et al., 2011).

2 ZIELSETZUNG

Das kolorektale Karzinom gilt als eine der häufigsten Karzinomerkrankungen bei Männern und Frauen in den industrialisierten Ländern. Der überwiegende Teil der Tumore entsteht sporadisch und ist zu einem großen Teil auf den Lebensstil zurückzuführen. Zu den wichtigsten Einflussfaktoren zählen übermäßiger Verzehr von rotem Fleisch, ballaststoffarme Ernährung, ein Defizit an physischer Aktivität, regelmäßiger, hoher Alkoholgenuss und Rauchen. Zusätzlich kommen die familiäre Prädisposition und fortgeschrittenes Alter als Risikofaktoren dazu. Entzündliche Erkrankungen des Darms, sowie Morbus Crohn und Ulzerative Kolitis stellen weitere wichtige Risikofaktoren dar.

Beim Fortschreiten der Tumorerkrankungen im Darm spielt die immunologische Umgebung der Darmmukosa eine tragende Rolle. Leukozyteninfiltrationen, veränderte T - und B – Lymphozyten - Differenzierung, Makrophagenaktivität und die damit verbundene Änderung der Zytokinausschüttung tragen unter anderem dazu bei, ein proinflammatorisches Milieu, das wiederum die Tumorausbreitung fördert, zu schaffen. Es ist auch bereits bekannt, dass Entzündungen die Expression von wichtigen Transportern der OATP - Familie, wie OATP4A1, die für das Tumorstadium von Bedeutung sein können, beeinflussen.

OATPs sind Natrium - unabhängige Anionentransporter, welche strukturell durch 12 transmembranäre Segmente sowie intra - und extrazelluläre Loops beschrieben werden können und eine wesentliche Rolle im Transport von essentiellen endogenen und exogenen Substanzen sowie Gallensäuren, Steroidhormonderivaten, Prostaglandinen, aber auch Medikamenten und hier vor allem Statinen und Zytostatika, etc. spielen. Das Expressionsmuster der OATPs, wie zum Beispiel von OATP4A1, verändert sich im Tumorgewebe. OATP4A1 ist in kolorektalem Karzinom vermehrt exprimiert, wobei aber die Faktoren, die das Expressionsmuster bestimmen, nicht bekannt sind.

Ziel dieser Diplomarbeit ist es daher, den Einfluss prominentester Entzündungsmediatoren, wie Interleukin - 6 und Tumor - Nekrosefaktor alpha, auf die Expression des OATP4A1 Transporters in kolorektalem Karzinom zu untersuchen. Studien sollen auf mRNA und Proteinebene durchgeführt werden.

Dazu soll die kolorektale Adenokarzinomzelllinie C205 kultiviert und anschließend mit TNF α und IL - 6 zu unterschiedlichen Zeitpunkten behandelt werden. Nach 6 h, 12 h und 24 h werden die Behandlungen gestoppt und aus den Zellen wird die RNA isoliert und revers transkribiert. Mittels einer qRT - TaqMan[®] PCR werden Modifikationen in der OATP4A1 mRNA Expression untersucht. Immunofluoreszenzfärbungen werden ebenfalls an C205 Zellen unter den gleichen Behandlungsprotokollen durchgeführt. Hier sollen die OATP4A1 - positiven Zellen mit dem TissueFAXS[®] Imaging System aufgenommen werden. Anschließend soll mit der TissueQuest[®] Software die Anzahl der Zellen, die den Transporter exprimieren, quantifiziert und die Intensität der Färbung bestimmt werden. Durch genaues Erforschen der Wirkung von TNF α und IL - 6 auf die Expression des Transporters soll mehr über mögliche Funktionen dieses Transporters im Kolonkarzinom erfahren werden. Die Studien stellen somit die Grundlagen dar, um die Funktion der OATP - Transporter für einen gezielten Therapieansatz zu erforschen.

3 MATERIAL UND METHODEN

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Materialien von Merck (Darmstadt, D) bezogen.

3.1 Zellkultur

Medien, Puffer, Lösungsmittel

RPMI - 1640 Medium mit L - Glutamin und Natriumbicarbonat (SIGMA - ALDRICH, Buchs, CH)

Fetales Bovines Serum FBS superior (Biochrom AG Biotechnologie, Berlin, D)

Calcium - und Magnesiumfreies 1x PBS

10x Trypsin - EDTA Lösung (SIGMA - ALDRICH, Buchs, CH)

Ethanol (EtOH)

DMSO (Dimethylsulfoxid)

Zellkulturmaterialien, Geräte

25 cm² und 75 cm² Zellkulturflaschen mit Filterkappen (TPP, Trasadingen, CH)

10 ml Pipetten (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D)

25 ml Pipetten (Biozym Scientific GmbH)

Eppendorfpipetten (Eppendorf AG, Hamburg, D)

SafeSeal Spitzen (Biozym Scientific GmbH)

Pasteurpipetten (SIGMA - ALDRICH, Buchs, CH)

15 ml Zentrifugengefäße (TPP)

Laminar Air Flow (Thermo Fisher Scientific, Asheville, US)

Hettich Rotante Zentrifuge (HettichBäch, CH)

Inkubator Heraeuscytoperm 2 (Thermo Fisher Scientific)

Olympus CK2 Mikroskop (Spach Optics, Rochester, NY)

Cool cell SV2 alkoholfreie Einfrierbox (BioCision, LLC, USA)

3.1.1 Zelllinie

Es wurde ausschließlich mit der humanen Kolonadenokarzinom - Zelllinie, die von einem 70 - jährigen Patienten mit einem metastasierenden Kolonkarzinom (Dukes Classification Grade D) stammt, verwendet. (ATCC, LGC Standards)

C205 Zellen weisen Berichten zufolge kubische Formen bei der Isolation auf.

In späteren Passagen nehmen die in Suspension vorliegenden Zellen überwiegend runde Gestalt an und treten vermehrt in Aggregaten auf, die adhärierenden Zellen weisen kubische Formen auf (Semple et al., 1978). Während unserer Versuche konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden, die kubischen morphologischen Strukturen waren jedoch gering ausgeprägt.

3.1.2 Kultivierung der Zellen

Allgemeines:

Als Medium wurde RPMI - 1640 von Sigma Aldrich mit 10%igem Zusatz von FBS verwendet. Die Zellen wurden unter folgenden Konditionen inkubiert:

Tab. 3: eingesetzte Einstellungen am Inkubator

Temperatur	37°C
CO ₂ Sättigung	5%
Relative Luftfeuchtigkeit	95%

Die Arbeit mit den Zellen wurde ausschließlich unter der sterilen Werkbank im Zellkulturraum durchgeführt. Handschuhe und Oberflächen wurden mit 85%igen Ethanol desinfiziert. Vor Beginn mussten alle verwendeten Medien auf Raumtemperatur erwärmt werden, um unnötige Stressfaktoren für die Zellen zu vermeiden. Pipetten und Gefäße wurden autoklaviert. Die Zellen wurden in 25 oder 75 cm² Zellkulturflaschen gezüchtet.

Auftauen von Zellen:

Die Zellen wurden bei -196° in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurde die eingefrorene Zellsuspension im Wasserbad bei 37°C für 3 - 4 Minuten erwärmt. Unter dem Laminar Air Flow wurde in einem 15 ml Reaktionsgefäß die Zellsuspension mit 10 ml frischem Medium gemischt und anschließend mit 1000 rpm 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. In weiterer Folge wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit etwas frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 75 cm² Zellkulturflasche mit Filteraufsatz (mit 12 ml vorgelegtem Medium) transferiert und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

Mediumwechsel und Splitting:

Bei der C205 Zelllinie handelt es sich um semi - adhärenente Zellen. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Dabei wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß transferiert und für 3 Minuten bei 1000 rpm und 22°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und mit 12 ml frischem Medium resuspendiert. Danach wurde die Suspension wieder in die Zellkulturflasche übertragen und in den Inkubator gestellt. Um die Zellen nicht zu schädigen, sollten sie weder zu lange außerhalb des Inkubators gehalten werden, noch direkter starker Lichteinstrahlung (Mikroskop) ausgesetzt werden, was ein zügiges Arbeiten voraussetzt.

Nach Erreichen einer angemessenen Konfluenz (~80%) wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurden die Suspensionszellen in ein Reaktionsgefäß übertragen und die adhärenent vorliegenden Zellen in der Zellkulturflasche mit PBS gewaschen. Dieser Vorgang dient dem Entfernen von FBS, welches als Trypsin - Inhibitor fungiert. Nach Absaugen wurden 3 ml Trypsin hinzugefügt und die Zellkulturflasche für 3 - 4 Minuten in den Inkubator gestellt, bis die adhärenierenden Zellen sich vom Flaschenboden gelöst haben. Nun wurden 9 ml (3 - fache Menge) frisches Medium hinzugefügt, um die Trypsin - Reaktion zu stoppen. Die nun schwimmenden Zellen wurden ebenfalls in das Reaktionsgefäß übertragen und zentrifugiert. Nach dem Absaugen wurde je nach vorhandener Pellet - Größe mit entsprechender Menge frischem Medium resuspendiert.

Je nach gewünschtem Split - Verhältnis wurde ein adäquater Teil der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit vorgelegtem frischem Medium beigefügt.

Die Konfluenz sowie die Morphologie wurden täglich mithilfe des Mikroskops geprüft.

Einfrieren von Zellen:

Das Einfrieren sollte langsam ablaufen. Die Temperatur sollte um 1°C pro Stunde sinken. Die Zellen in der Zellkulturflasche sollten mehr als 80% konfluent sein.

Es wurde ein Einfriermedium hergestellt. Dazu wurden zum RPMI - 1640 Medium + 10% FBS, 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) und die entsprechende Menge FBS hinzugemischt um 20% FBS zu erhalten. Die Zellen wurden gewaschen, trypsinisiert und zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet im Einfriermedium suspendiert und 1 ml in ein Kryogefäß überführt.

3.1.3 Behandlung der Zellen

Medien, Puffer, Lösungsmittel

RPMI - 1640 Medium mit L - Glutamin und Natriumbicarbonat (SIGMA - ALDRICH)

Fetales Bovines Serum FBS superior (Biochrom AG Biotechnologie)

Calcium - und Magnesiumfreies 1x PBS

10x Trypsin - EDTA (SIGMA-ALDRICH)

Ethanol (EtOH)

peqGOLD TriFast (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D)

Zellkulturmaterialien, Geräte

25 cm² und 75 cm² Zellkulturflaschen mit Filterkappen (TPP)

10 ml Pipetten (Biozym Scientific GmbH)

25 ml Pipetten (Biozym Scientific GmbH)

Eppendorfpipetten (Eppendorf AG)

SafeSeal Spitzen (Biozym Scientific GmbH)

Pasteurpipetten (SIGMA - ALDRICH)

15 ml und 25 ml Zentrifugengefäße (TPP)

6 - Well Platten (IWAKI brand, SCITECH DIV. ASAHI TECHNO GLASS, Japan)
Laminar Air Flow (Thermo Fisher Scientific)
Hettich Rotante Zentrifuge (Hettich Bäch)
Inkubator Heraeuscytoperm 2 (Thermo Fisher Scientific)
Olympus CK2 Mikroskop (SpachOptics)
Automatischer Zellzähler TC20™ (Bio- Rad Laboratories Ges.m.b.H)

Entzündungsmediatoren

- Human Interleukin 6 (SIGMA - ALDRICH)
- Human Tumor necrosis factor α (SIGMA - ALDRICH)

Die Zellen wurden mit den Entzündungsfaktoren IL - 6 und TNF α in verschiedenen Konzentrationen in Kombination, sowie auch einzeln stimuliert, um in Folge RNA zu isolieren und mithilfe der qRT - TaqMan® PCR Veränderungen der OATP4A1 mRNA Expression in den C205 Zellen zu analysieren.

Die Zellen aus den T75 Flaschen wurden mit PBS gewaschen, trypsinisiert und dann in 25 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert. Das Pellet wurde in entsprechender Menge in frischem Medium resuspendiert. Mit einem Zellzählgerät wurde die Zellzahl pro ml bestimmt. Dazu wurden 10 μ l Suspension auf einen Objektträger aufgetragen um danach mit dem Zellzählgerät die Zellzahl pro ml bestimmen zu können. In jedem Well sollten ~800 000 bis zu 1 000 000 Zellen vorhanden sein.

4 ml Medium wurden in jedes Well vorpipettiert und daraufhin wurde die berechnete Menge der Zellsuspension beigelegt. Die Wellplatten wurden bis zum nächsten Tag inkubiert. Die restlichen Zellen wurden in einer 25 cm² Zellkulturflasche weiterkultiviert. Wenn die Zellen bereits ausreichend konfluent waren, konnte die Stimulation gestartet werden. Das Medium wurde abgesaugt und mit 1 ml frischem Medium ersetzt. Die vorbereiteten Entzündungsfaktoren wurden in den benötigten Konzentrationen zu jedem Well hinzugefügt. Nach 6, 12 und 24 Stunden wurden die Reaktionen mit jeweils 1 ml Trifast gestoppt.

Das entstehende Zellhomogenat wurde in Mikroreaktionsgefäße transferiert, bei -20°C eingefroren und bis zur RNA Isolierung aufbewahrt.

Die Kontrollen wurden nur mit dem Medium und anschließend mit Trifast behandelt. Um alle Zellen in der Suspension zu erfassen, wurde diese zentrifugiert und das Pellet in Trifast resuspendiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde regelmäßig der Zustand der Zellen unter dem Mikroskop geprüft.

3.2 RNA Isolierung

Medien, Puffer, Lösungsmittel

peqGOLD TriFast (PEQLAB Biotechnologie GmbH)

Chloroform

Isopropanol

Ethanol (EtOH)

Destilliertes, RNase/ DNase freies Wasser

Plastikmaterialien, Geräte

Mikroreaktionsgefäße 1,5 ml

SafeSeal Spitzen (Biozym Scientific GmbH)

Laminar Air Flow (EHRET GmbH & Co. KG)

Hettich Rotante Zentrifuge (Hettich Bäch)

Thermomixer comfort (Eppendorf)

Nanodrop Spektrophotometer ND - 100 (Thermo Fisher Scientific)

Der Umgang mit RNA erfordert vorsichtiges, steriles Arbeiten, da diese sehr instabil ist und leicht durch RNasen abgebaut werden kann. Alle Schritte wurden daher unter dem Laminar Air Flow durchgeführt.

Die in Trifast gelösten, eingefrorenen Proben wurden zunächst bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten.

Nun wurden jeweils 200 µl Chloroform zugefügt und für 15 Minuten bei 12000 g bei 4°C zentrifugiert. Dadurch wurde eine Abtrennung der RNA von Proteinen und genomischer DNA erreicht.

Nach dem Zentrifugieren waren drei Phasen im Reaktionsgefäß sichtbar: die oberste Phase mit der gesuchten RNA, die mittlere Phase mit der DNA und die unterste Phase (Chloroformphase) mit den Proteinen. Nun wurde die wässrige Phase in neue Mikroreaktionsgefäße mit 500 µl vorgelegtem Isopropanol transferiert.

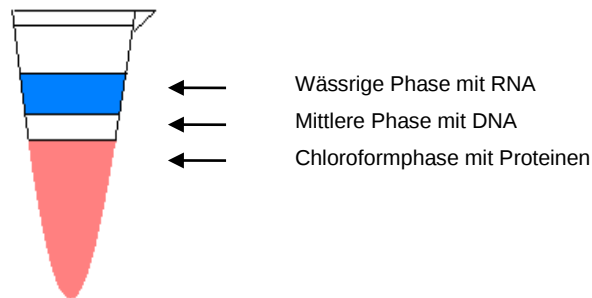


Abb. 6: Skizze der drei sich bildenden Phasen nach dem Zentrifugieren

Die Proben wurden für 10 Minuten auf Eis gehalten und daraufhin 15 Minuten mit 12000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet wurde mit 70%igen Ethanol gewaschen. Nach kurzem Vortexen und zehnminütigem Zentrifugieren wurde das Ethanol entfernt und anschließend maximal 3 Minuten am Thermomixer getrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde es in einer adäquaten Menge Wasser gelöst (Bereich zwischen 20 µl - 80 µl). Die gelöste RNA wurden nun 10 Minuten am Thermomixer bei 55°C inkubiert. Daraufhin wurden am Nanodrop Spektrophotometer die Konzentrationen in ng/µl vermessen. Der Blank wurde dabei mit RNase/ DNase freiem Wasser durchgeführt. Die isolierte RNA wurde bei -80°C eingefroren.

3.3 Reverse Transkription

Medien, Puffer, Lösungsmittel

RNase/ DNase freies Wasser

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA)

Plastikmaterialien, Geräte

Mikroreaktionsgefäße 0,2 ml (Biozym Scientific GmbH)

SafeSeal Professional Spitzen (Biozym Scientific GmbH)

Nanodrop Spektrophotometer ND - 100 (Thermo Fisher Scientific)

Laminar Air Flow (EHRET GmbH & Co. KG)

Biometra Personal Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, D)

Die reverse Transkription dient der Umschreibung von RNA in cDNA („complementary DNA“), welche zur PCR Analyse benötigt wird. Für die Transkription wurde eine Menge von 1 µl RNA - Templat benötigt.

Nach Vermessung der Konzentrationen mittels Nanodrop - Spektrophotometer wurden die entsprechenden Mengen an RNA mit RNase/DNase freiem Wasser auf insgesamt 10 µl verdünnt. Nun wurden 10 µl einer Lösung (Tab. 4) in angeführter Zusammensetzung hinzugefügt.

Tab. 4: Lösung für die reverse Transkription.

RT = Reverse Transkription, dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphat

10x RT buffer	2 µl
10x dNTPs	0,8 µl
RNA - reverse Transkriptase:	1 µl
RNase freies Wasser	4,2 µl
Summe	10 µl

Die Proben wurden in den Biometra Personal Cyclyer gestellt um die Reaktionen zu starten.

Zuerst erfolgte die Enzymaktivierung bei 25°C für 10 Minuten, daraufhin wurde die eigentliche Reverse Transkription bei 37°C eingeleitet, welche ~120 Minuten beanspruchte. Zuletzt folgte die Deaktivierung der Enzyme bei 85°C für 5 Minuten. Die Proben wurden nach Abschluss der Reaktionen auf 4°C gekühlt.

Um eine cDNA Konzentration von 10 ng/µl zu erreichen, wurde schließlich in einem Verhältnis von 1:5 (80 µl) mit RNase/DNase freiem Wasser verdünnt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.4 Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

3.4.1 Allgemeines

Im Jahre 1980 wurde die „Polymerase Chain Reaction“ durch den Wissenschaftler Kary Mullis erfunden, der dafür im Jahre 1993 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurde.

Die PCR wurde früher auch „DNA - Photocopier“ genannt. Es stellt ein einfaches Prinzip und gleichzeitig einen komplexen Prozess dar, was einen effektiven Umgang und eine genaue Analyse der DNA ermöglicht. Seit der Erfindung der PCR gab es einen schwunghaften Fortschritt in der molekularbiologischen und medizinischen Forschung. Durch diese Reaktion wurden gleich mehrere Anwendungen möglich: durch die Quantifizierung bestimmter Genabschnitte gelang es zum Beispiel mutierte Gene ausfindig zu machen sowie auch ausgewählte Expressionsraten zu analysieren (McPherson and Møller, 2007).

Die PCR basiert auf der Fähigkeit von DNA - Polymerasen, komplementäre DNA - Stränge zu bilden. Es werden thermoresistente Polymerasen verwendet, da zur **Denaturierung** der Doppelstränge eine Temperatur von 92 - 96°C nötig ist. Zur Durchführung benötigt man ein Templat, also einen bestimmten DNA Strang zum Beispiel, ausgewählte Primer an den Enden der zu amplifizierenden Gensequenz und alle vier Desoxynukleotide (dNTPs). Nach der Denaturierung können die Primer nun an die komplementären Abschnitte der Matrizen - DNA durch Hybridisierung andocken. Dieser Vorgang erfordert eine geringere Temperatur, die Schmelztemperatur der Primer muss dabei beachtet werden. Man nennt diesen Teil der Reaktion „**Annealing**“. Nun erfolgt die eigentliche **Polymerisation (Elongation)**.

Die Temperatur wird für die Polymerase - Aktivität optimiert (68°C-72°C), die nun vom 3' - Ende synthetisiert.

Die neu gebildeten DNA - Stränge agieren nun ebenfalls als Template für die Polymerasen wodurch eine exponentiell steigende Amplifizierung des gewünschten Fragments erfolgt. Die beschriebenen drei Schritte werden unter einem Zyklus zusammengefasst. Die ganze Reaktion umfasst zwischen 25 und 40 Zyklen, abhängig von der Größe der Matrizen DNA etc. (Kück, 2005).

Die traditionelle PCR ist aufwendig und zeitbeanspruchend. Um durch die Endpunkt Methode eine Quantifizierung zu ermöglichen, wird Agarose Gel verwendet.

Tab. 5: Überblick eines Zyklus, konventionelle PCR

Schritt	Temperatur
Denaturierung	92°C - 96°C
Annealing	50°C - 65°C
Elongation	68°C - 72°C

3.4.2 Quantitative Real - Time (RT) PCR

Die *Real - Time* PCR ist eine optimierte Version der PCR. Der Vorteil liegt darin, dass im Gegensatz zur konventionellen PCR die Quantifizierung des gewünschten Fragments bereits nach jedem Zyklus bestimmt werden kann, nämlich mit dem Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen. Mithilfe eines Diagramms kann der Verlauf der Reaktion dargestellt und direkt abgelesen werden (Kück, 2005).

Bei der konventionellen PCR wird das Endprodukt bestimmt, d.h. erst in der „Plateauphase“, während bei der Real - Time PCR durch die fluoreszierenden Farbstoffmoleküle schon während der exponentiellen Phase im Zyklus eine Produktbestimmung möglich ist, da die Fluoreszenz proportional zum amplifizierten Fragment steigt.

Um auf die Anfangsmenge der Template rückrechnen zu können, ist eben eine Messung während der exponentiellen Phase unabdingbar.

Die Bestimmung erfolgt erst ab einem bestimmten Punkt, der im Diagramm als sogenannte „Thresholdline“ gesetzt wird und auch „Ct - Wert“ genannt wird.

Dies ist der Schwellenwert, bei dem das Fluoreszenzsignal der Proben stärker ist als das Hintergrundsignal. „Ct“ oder „Cycle threshold“ beschreibt die Anzahl der notwendigen Zyklen, um mit dem Fluoreszenzsignal den Schwellenwert zu erreichen. Demnach entsprechen die Ct - Werte der einzelnen Proben der Menge an „starting template“ (Ginzinger, 2002).

3.4.3 Quantitative Real - Time TaqMan® PCR

Hier wird mit Farbstoffmolekülen gearbeitet. Der *Reporter* mit hohem Energiepotenzial bindet an das 5' - Ende einer Sonde (Oligonukleotid), der *Quencher* mit niedrigem Energiepotenzial an das 3' - Ende. Diese Sonde dockt an eine Stelle des zu polymerisierenden DNA Fragments. Bevor die Reaktion startet, liegen die beiden Fluorophore nahe beieinander, dadurch wird das Fluoreszenzsignal des Reporters durch den Quencher überdeckt. Dies ist ein Zustand, der sich aus dem sogenannten FRET („Fluorescence Resonance Energy Transfer“) ergibt.

Ist die Reaktion im Gange, werden durch die Polymeraseaktivität die beiden Enden voneinander entfernt, was dazu führt dass das Signal des Reporters nun erscheint und proportional zur Akkumulation des Produktes steigt (Ginzinger, 2002).

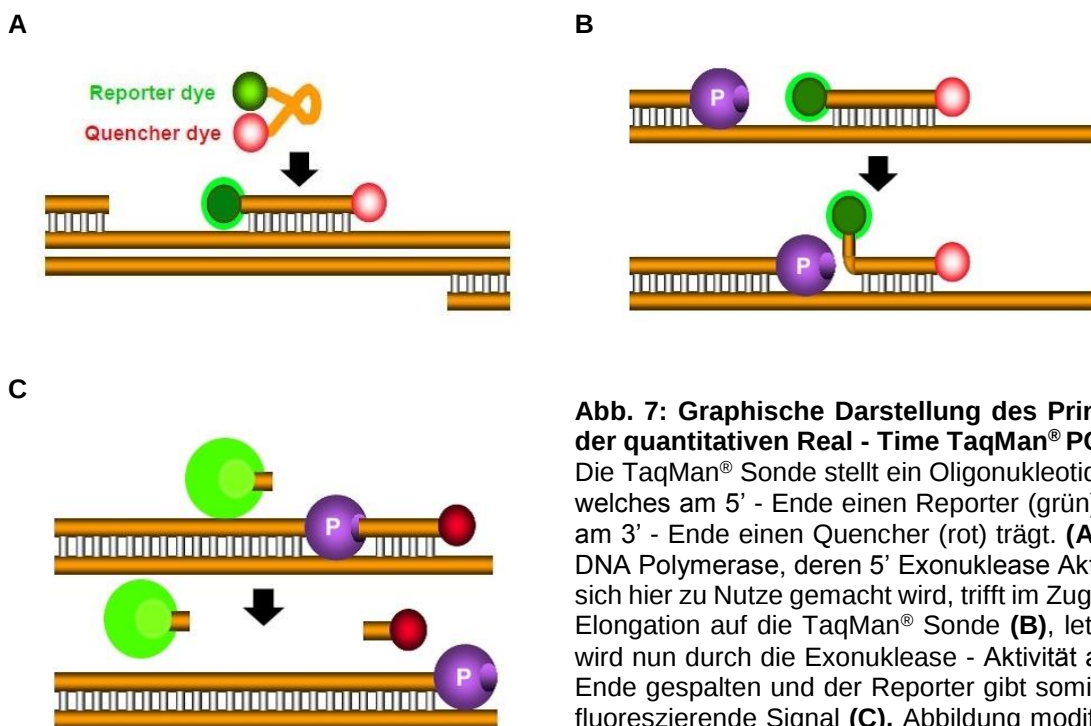


Abb. 7: Graphische Darstellung des Prinzips der quantitativen Real - Time TaqMan® PCR

Die TaqMan® Sonde stellt ein Oligonukleotid dar, welches am 5' - Ende einen Reporter (grün) und am 3' - Ende einen Quencher (rot) trägt. **(A)** Die DNA Polymerase, deren 5' Exonuklease Aktivität sich hier zu Nutze gemacht wird, trifft im Zuge der Elongation auf die TaqMan® Sonde **(B)**, letztere wird nun durch die Exonuklease - Aktivität am 5' Ende gespalten und der Reporter gibt somit das fluoreszierende Signal **(C)**. Abbildung modifiziert nach Applied Biosystems.

3.4.4 Vorbereitung

Tab. 6: Mastermix für ein Well (quantitative Real - Time TaqMan® PCR)

TaqMan®Primer/Probe	1 µl
2x TaqMan® Gene Expression MasterMix	10 µl
RNA - freies H ₂ O	7 µl
Summe	18 µl

2 µl der cDNA wurden in eine 96 - Well Platte übertragen. Danach wurde der Mastermix mit den Primern hinzu pipettiert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Das Gesamtvolumen betrug 20 µl und die Reaktion wurde in der Real - Time PCR Maschine gestartet.

Als Primer kamen GAPDH (Glycerinaldehyd – 3 – Phosphat - Dehydrogenase), YWHAZ (14 – 3 – 3 Protein zeta/delta) und die ribosomale Untereinheit 18S zum Einsatz, da sie in den behandelten Zellen am stabilsten exprimiert waren.

3.4.5 Datenanalyse

Nach Ablauf der Reaktion wurden die Resultate aus der SDS Software in eine Excel Arbeitsmappe übertragen um die Berechnung durchzuführen.

Bei der Datenanalyse kann man zwischen absoluter und relativer Quantifizierung unterscheiden. Bei der absoluten Methode wird eine Standardkurve als Bezug genommen. Daher ist es im eigentlichen Sinne keine „absolute Quantifizierung“. Dabei wird eine Standardkurve von Proben mit bekannten Mengen erstellt und die gesuchten Werte der unbekannten Proben davon abgeleitet. Die relative Quantifizierung wird eingesetzt, um Unterschiede in Expressionsraten von Genen zu bestimmen. Hier bezieht man sich auf Referenzgene.

Bei meinen Versuchen wurde die **relative Quantifizierung** gewählt. Dabei kam die sogenannte komparative Ct Methode zum Einsatz.

Das geometrische Mittel der Mittelwerte der endogenen Kontrollen wurde bestimmt und von den Mittelwerten der Ct - Werte subtrahiert.

Die Werte der Referenzen (GAPDH, YWHAZ, 18S) dienten der Normalisierung (NF). Das Ergebnis stellte den ΔCt Wert der einzelnen Proben dar. RQ („Relative Quantity“) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$RQ = 2^{(-\Delta Ct) / (-\Delta Ct \text{ der Kontrolle})}$$

Zusätzlich wurde $RQ_{\max}$ und $RQ_{\min}$ mithilfe der Standardabweichung der Ct - Werte der amplifizierten Gensequenzen wie folgt berechnet:

$$RQ_{\max} = 2^{(-\Delta Ct + SD) / (-\Delta Ct \text{ der Kontrolle})}$$

$$RQ_{\min} = 2^{(-\Delta Ct - SD) / (-\Delta Ct \text{ der Kontrolle})}$$

Die Analyse wurde anhand der Benutzerinstruktionen der Data Assist™ v3.0 Software von Applied Biosystems durchgeführt.

3.5 Färbung von OATP4A1 in C205 Zellen

Medien, Puffer, Lösungsmittel

4%iges Paraformaldehyd (PFA)

1x PBS (Phosphat - gepufferte Salzlösung)

1% BSA (Bovines Serum Albumin) in 1x PBS

0,5% Triton X in 1% BSA in 1x PBS

DAPI (4',6-Diamidin - 2-phenylindol)

Einbettmedium Fluoromont - G™ (SouthernBiotech, Birmingham, USA)

Destilliertes H₂O

Zellkulturmaterialien, Geräte

Deckgläser, rund (Ø 15 mm)

Objekträger SUPERFROST® (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D)

6 - Well Platten (IWAKI brand, SCITECH DIV. ASAHI TECHNO GLASS)

Tab. 7: primäre und sekundärer eingesetzter Antikörper

angegeben sind die eingesetzten Verdünnungen und Inkubationszeiten

Primärer Antikörper	SLCO4A1 Atlas Antibodies	1:200	über Nacht bei 4°C inkubiert
Sekundärer Antikörper	AF488 Goat anti Rabbit	1:1000	1 h inkubiert

3.5.1 Immunofluoreszenzfärbung

Nach der Behandlung der Zellen mit den Entzündungsfaktoren, wurden die Zellen mit 4%iger Paraformaldehyd - Lösung fixiert.

Paraformaldehyd (PFA) dient der Stabilisierung und Fixierung der Zellen auf den Deckgläsern. Es ist ein Polymerisationsprodukt vieler Formaldehydmoleküle und hat die Eigenschaft mit den Hydroxylgruppen an den N - Terminus von Proteinen zu binden. Dieser Vorgang ist nötig um das Austreten des Zellinneren zu verhindern, wenn die Zellmembran bei der Färbung für den Antikörper durchlässig gemacht wird (Versuchsprotokoll 4.1 Zellbiologie).

Zuerst wurde das Medium abgesaugt, dann wurden die Zellen zweimal mit PBS für 5 Minuten gewaschen. Danach wurde für 15 Minuten mit PFA fixiert und wieder 5 Minuten mit PBS gewaschen. Um nun das überschüssige PFA zu entfernen, wurde für 10 Minuten mit 50 mM Ammoniumchlorid behandelt.

Anschließend wurden die Zellen in einer Blocking Solution (Triton 0,5% in PBS + 1% BSA) eine Stunde lang inkubiert, um die unspezifischen Proteinbindungsstellen zu okkupieren und in Folge wurde der gleiche Vorgang mit dem primären Antikörper durchgeführt. Dieser wurde in einer 1%igen BSA in PBS Lösung verdünnt.

Die Deckgläser wurden 4 - mal für 10 Minuten in PBS gewaschen. Der zweite Antikörper wurde in reinem PBS verdünnt und aufgetragen. Ab diesem Schritt wurde ausschließlich unter Lichtschutz gearbeitet.

Nach dem Inkubieren mit dem sekundären Antikörper wurde 2 - mal für 10 Minuten mit PBS gewaschen. Für die Zellkernfärbung wurde DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) in einer 1:1000 Verdünnung für 15 Minuten aufgetragen. Dann wurden die Deckgläser mit destilliertem H₂O 2 - mal für 5 Minuten gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen mit Fluoromont - GTM auf Objektträgern eingebettet.

3.5.2 Mikroskopische automatisierte digitalisierte Aufnahme und Auswertung

Nach dem Trocknen wurden Immunofluoreszenzbilder der gefärbten Zellen mithilfe des TissueFAXS® Mikroskopiersystems (Version 4.1.5.2 PCO) von der Firma TissueGnostics® (Vienna, Austria) aufgenommen, um anschließend die Zellfärbung mit der TissueQuest® Software (Version 4.0.1.0127) auszuwerten.



Abb. 8: TissueFAXS® Cell Analysis System (TissueGnostics®, Vienna, Austria)

Präzise morphologische Aufnahmen werden durch eine Kombination aus Mikroskopie (Multi – Kanal - Durchflusszytometrie), Computer und einer hochqualitativen Kamera ermöglicht.

Die TissueFAXS® Software, bietet hoch aufgelöste Fluoreszenzbilder, welche gezielt bearbeitet und des Weiteren mit der TissueQuest® Software (Version 4.0.1.0127) genau ausgewertet werden können.

Für die gefärbten C205 Zellen war es notwendig, adäquate Einstellungen in den einzelnen Kanälen, für die Kamera und die Belichtungszeit, etc. zu applizieren, um die Aufnahme der Bilder zu optimieren. Danach wurden am Präparat ROIs („Regions of Interest“) markiert und die Aufnahme der Zellen konnte initiiert werden.

Nach Beendigung der Aufnahme wurden die Ergebnisse überprüft und bei Bedarf nicht fokussierte Teile (FOVs = „Fields of View“) neu akquiriert.

In Folge wurden die Resultate exportiert, um damit ein neues Projekt mit der TissueQuest® Software starten zu können. Diese Software beinhaltet viele nützliche Funktionen für eine Analyse.

Auch hier wurden ROIs definiert, um nur die gewünschten Regionen zu analysieren. Dann wurden die passenden Parameter für die Fluoreszenzkanäle (DAPI und GFP) eingestellt und die Analyse konnte gestartet werden.

Zuletzt wurde ein statistischer Bericht über die Anzahl der gefärbten Zellen und die Färbeintensität in eine Excel - Mappe exportiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Bestimmung der OATP4A1 mRNA - Expression in der C205 Zelllinie

Ziel der Versuchsreihe war es, die OATP4A1 mRNA - Expression in der kolorektalen Karzinomzelllinie C205 zu untersuchen. Diese Zelllinie stammt von einem fortgeschrittenen, bereits metastasierenden Karzinom (Dukes Stage D). Weiters ist zu untersuchen, ob die beiden Entzündungsmediatoren IL - 6 und TNF α zu einer möglichen Veränderung in der Expression des Transporters führen. Auch in einer Kombinationsbehandlung könnten die beiden Zytokine wirksam werden. Die Korrelation mit der Transporterexpression sollte bestimmt werden und eine eventuelle Aktivierung und Potenzierung von IL - 6 mit TNF α wäre zu prüfen.

Die Auswertung der Ergebnisse der PCR erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel®, die relative Methode wurde dabei zur Bestimmung der Expressionsrate der OATP4A1 mRNA angewendet. Eine Normalisierung der Transporterexpression wurde dann relativ auf die Expression der „housekeeping genes“ (GAPDH, YWHAZ, 18S) durchgeführt. Diese Gene wurden gewählt, weil frühere Untersuchungen zeigten, dass sie die stabilste Expression in diesen Zellen hatten und sich ihre Expressionsrate durch die Behandlung nicht veränderte.

Das geometrische Mittel der verwendeten „housekeeping genes“ (GAPDH, YWHAZ, 18S) wurde bestimmt. Nach der bereits beschriebenen Methode (Kapitel 3.4.5), wurde die relative Quantifizierung (RQ) berechnet, zusätzlich wurden die maximalen - und minimalen Werte bestimmt (RQ_{max}, RQ_{min}).

Zur Ermittlung einer signifikanten Veränderung der OATP4A1 mRNA - Expression wurden die so errechneten Werte in der Graph Pad Prism® Software (Vs 5.0) übertragen und die Statistik wurde mittels des One - Way ANOVA - Tests unter Anwendung des Posttests „Kruskal-Wallis“ analysiert.

4.1.1 OATP4A1 mRNA - Expression in C205 Zellen nach IL - 6 Behandlung

Die für die Behandlung verwendete Konzentration von IL - 6 betrug 100 ng/ml. Die C205 Zellen wurden im RPMI - 1640 Medium mit 10% FBS kultiviert und stimuliert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

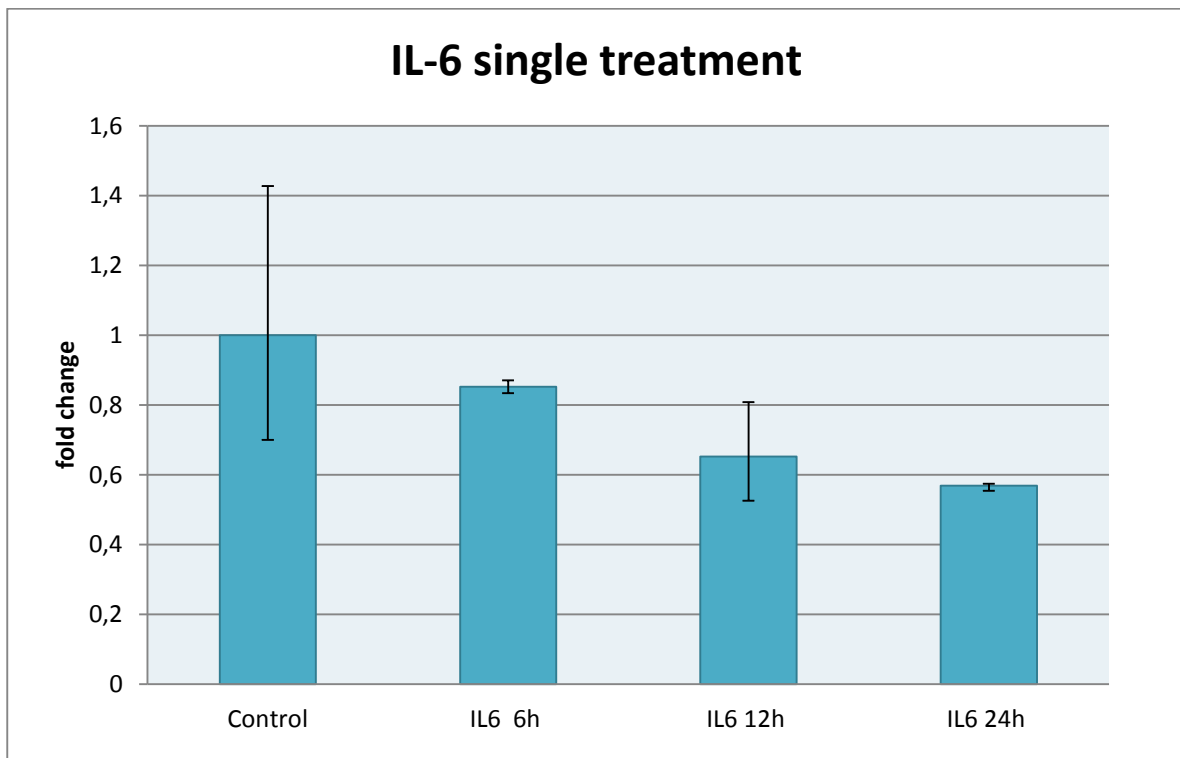


Abb. 9: mRNA - Expression von OATP4A1 (Mittelwerte $\pm$ SD) in C205 Karzinomzellen Unbehandelt (Control), nach 6 h, 12 h und 24 h Behandlung mit Interleukin - 6 (100 ng/ml), verwendete Standards: GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), YWHAZ (14 - 3 - 3 Protein zeta/delta), 18S (ribosomale Untereinheit)

Wie in Abb. 9 gezeigt, kann eine zeitabhängige Reduktion der Expression von OATP4A1 deutlich erkannt werden. Nach 6 - stündiger IL - 6 Behandlung erfolgt eine 15 - prozentige Reduktion nach 12 Stunden eine 34 - prozentige und nach 24 Stunden eine 43 - prozentige Reduktion.

4.1.2 OATP4A1 mRNA - Expression in C205 Zellen nach TNF α Behandlung

Die für die Behandlung verwendete Konzentration von TNF α betrug 10 ng/ml. Die C205 Zellen wurden im RPMI - 1640 Medium mit 10% FBS kultiviert und dann mit TNF α behandelt.

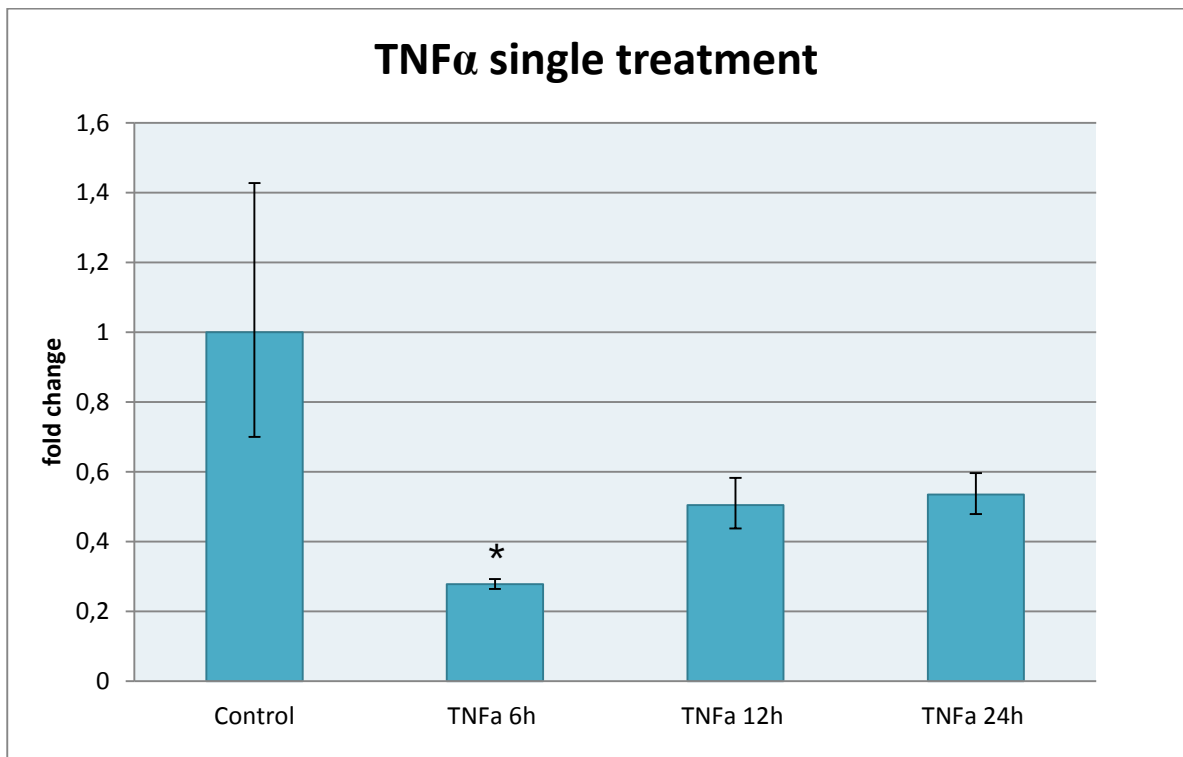


Abb. 10: mRNA - Expression von OATP4A1 (Mittelwerte $\pm$ SD) in C205 Karzinomzellen Unbehandelt (Control), nach 6 h, 12 h und 24 h Einzelbehandlung mit Tumornekrosefaktor alpha (10 ng/ml). Standards: GAPDH (Glycerinaldehyd – 3 – Phosphat - Dehydrogenase), YWHAZ (14 – 3 – 3 Protein zeta/delta), 18S (ribosomale Untereinheit), * = signifikant

Nach TNF α Behandlung ist eine deutlichere Hemmung der mRNA - Expression zu erkennen, die bereits nach 6 Stunden voll ausgeprägt ist (siehe Abb. 10). Die Hemmung beträgt 72 Prozent nach 6 Stunden, 50 Prozent nach 12 Stunden und 47 Prozent nach 24 Stunden.

4.1.3 Hemmung der OATP4A1 mRNA - Expression in C205 Zellen nach Kombinationsbehandlung mit IL - 6 und TNF α

Die für die Behandlung verwendete Konzentration von IL - 6 betrug 100 ng/ml. TNF α wurde in einer Konzentration von 10 ng/ml appliziert. Die C205 Zellen wurden im RPMI - 1640 Medium mit 10% FBS kultiviert und stimuliert. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

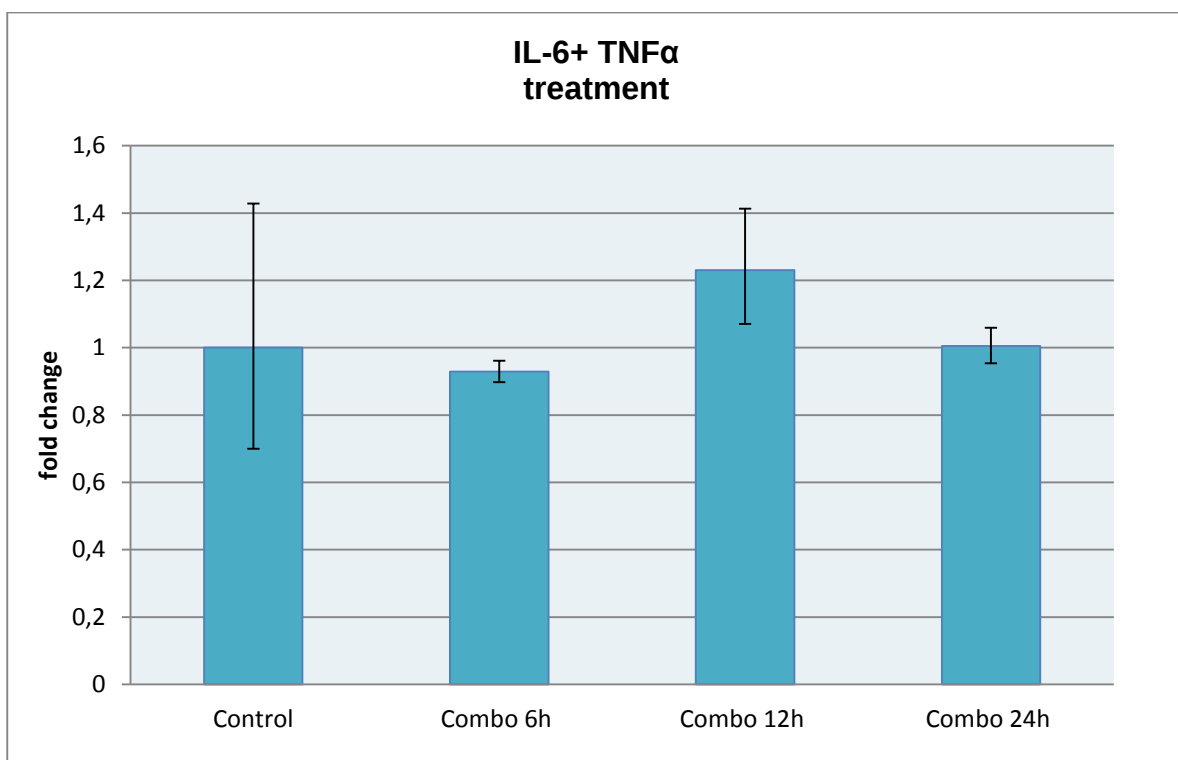


Abb. 11: mRNA - Expression von OATP4A1 (Mittelwerte $\pm$ SD) in C205 Karzinomzellen Unbehandelt (Control), nach 6 h, 12 h und 24 h Kombinationsbehandlung mit Interleukin - 6 (100 ng/ml) und Tumornekrosefaktor alpha (10 ng/ml). Standards: GAPDH (Glycerinaldehyd - 3 - Phosphat - Dehydrogenase), YWHAZ (14 - 3 - 3 Protein zeta/delta), 18S (ribosomale Untereinheit)

Wie auf Abb. 11 zu erkennen ist, führte die Kombinationsbehandlung bei keinem der ausgewählten Zeitpunkte zu einer signifikanten Veränderung im Expressionswert der OATP4A1 mRNA.

Nach 6 Stunden betrug die mRNA Expressionsrate 93 Prozent, nach 12 Stunden betrug sie 23 Prozent mehr als die Kontrolle, nach 24 Stunden war keine Veränderung ersichtlich (100 Prozent).

4.2 Immunofluoreszenznachweis von OATP4A1 in der C205 Zelllinie

Nach der Hemmung der OATP4A1 mRNA - Expression, die die Ergebnisse der Real - Time PCR erbrachten, wurde zur Untersuchung des Transporters in den Zellen, die Immunofluoreszenzfärbung verwendet. Die C205 Zellen wurden in zwei Versuchsreihen mit den Zytokinen behandelt und die gefärbten Zellen wurden mit dem TissueFAXS® Mikroskopiersystem aufgenommen. Mittels der TissueQuest® Software wurde die Färbeintensität von immunoreaktiven OATP4A1 auf den virtuellen Bildern ausgewertet und aus den Ergebnissen der Mittelwert berechnet. Nach Setzen eines entsprechenden „Cut - Offs“ (Siehe Kapitel 4.2.1), wurde die Zahl der OATP4A1 - positiven Zellen in den behandelten Proben (Prozent der gesamten Zellen) bestimmt.

4.2.1 Einstellungen für TissueFAXS® und TissueQuest®

TissueFAXS® (Version 4.1.5.2 PCO) :

Tab. 8: Einstellungen für die Aufnahmen mit TissueFAXS®

Unmittelbar vor Digitalisierung immunofluoreszenzgefärbter Zellen wurden noch die angeführten Einstellungen appliziert. *Über den DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) - Kanal wurde die Kernfärbung vermessen (blau) über den GFP (grün fluoreszierendes Protein) Kanal wurde die OATP4A1 - Expression (grün) vermessen.

Kamera	Pixel Fly (PCO USB Camera), Rear Port
UV - Lampe	100% UV - Belichtung
verwendete Kanäle	DAPI*, GFP*
Vergrößerung Mikroskop	63x (Öl - Objektiv)

Tab. 9: Weitere Einstellungen für DAPI und GFP

Exposure time“ entspricht der Belichtungszeit während der mikroskopischen Aufnahme in den beiden Kanälen. *Werte für Upper und Lower Threshold: Sie geben die Werte an, für welche Schichtdicke in den Zellen die Messungen gemacht wurden.

	DAPI	GFP
Exposure time	20 ms	35 ms
Upper Threshold*	13053	16383
Lower Threshold*	1013	334

Auswertungen mittels der TissueQuest® Software:

In den Untersuchungen wurde eine Zellgröße von < 40 µm anhand der Zellkerne definiert. Der „Cut - Off“ wurde für GFP bei 16 Units (Mittlere Intensität der Emission des grün - fluoreszierenden OATP4A1) und für DAPI bei 25 Units (Mittlere Intensität der Emission der blauen Fluoreszenz der Zellkerne gefärbt mit DAPI) gesetzt.

Weitere Beschreibungen der Methodik der Bestimmungen mittels TissueFAXS® und TissueQuest® sind in Kapitel 3.5.2 zu finden.

4.2.2 OATP4A1 - positive C205 Zellen nach IL - 6 Behandlung

Die für die Behandlung verwendete Konzentration von IL - 6 betrug wie auch bei den Real - Time PCR Experimenten 100 ng/ml. Die C205 Zellen wurden im RPMI - 1640 Medium mit 10% FBS kultiviert und dann mit dem Zytokin behandelt.

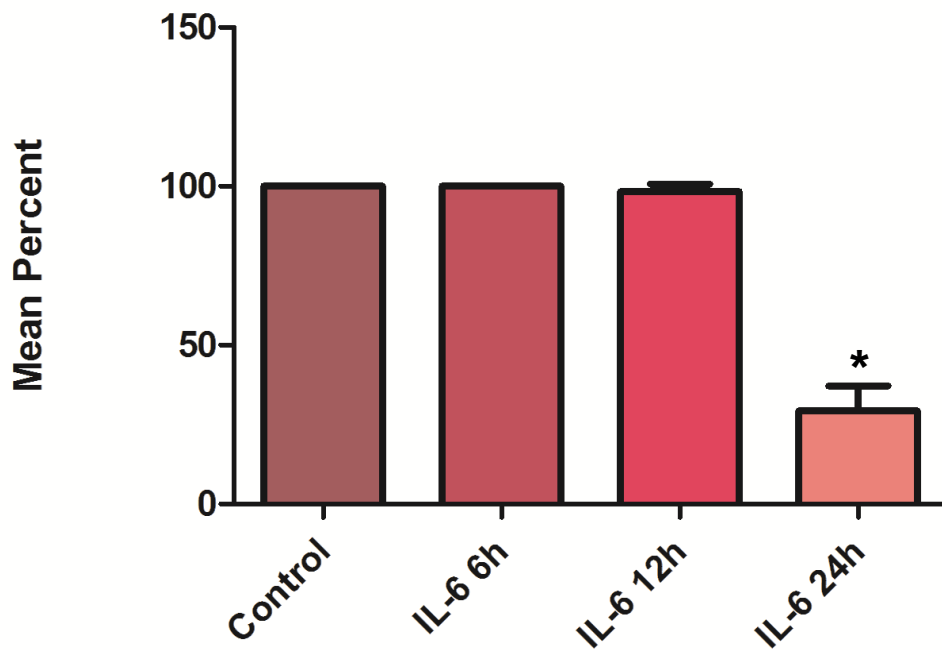


Abb. 12: Prozentsatz an Zellen (C205) mit OATP4A1 - Protein nach Zytokinbehandlung

Die Behandlung erfolgte mit Interleukin – 6 (100 ng/ml) nach 6 h, 12 h und 24 h Stimulation (Mittelwerte in Prozent $\pm$ SD) wie bei den qRT PCR-Experimenten beschrieben. Die Anzahl an unbehandelten Kontrollzellen, die OATP4A1 positiv sind, wurde auf 100% gesetzt. „Mean Percent“ bezieht sich auf die Anzahl der OATP4A1 - positiven Zellen in Prozent im Vergleich zu den Kontrollzellen. * = signifikant

Die Zellen zeigen hier zunächst wenig Veränderung in der Transporter - Expression. Nach 6 Stunden und nach 12 Stunden beträgt der Prozentsatz an positiven Zellen 100 bzw. 98,27 Prozent (Mittelwerte in Prozent $\pm$ SD).

In Folge der IL - 6 Behandlung nach 24 Stunden waren nur mehr 29,35 Prozent der Zellen OATP4A1 - positiv. Nach IL - 6 Behandlung ist eine klar definierte Membranfärbung auch nach den 12 - und 24 - stündigen Behandlungen zu sehen (Abb. 13: **C, D**).

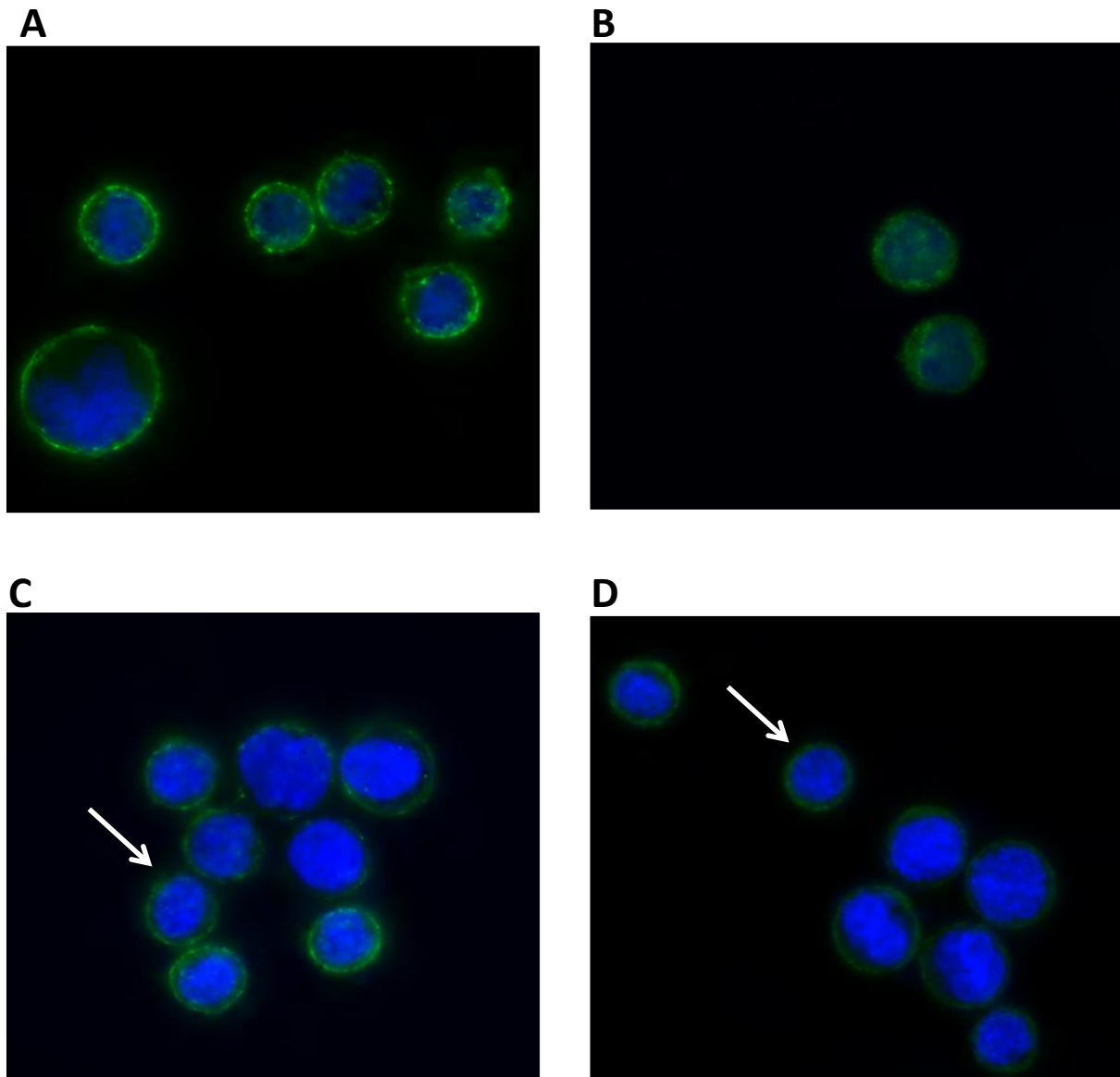


Abb. 13: Ausgewählte Aufnahmen von immunoreaktiven OATP4A1 in der C205 Zelllinie.

Nach der Einzelbehandlung mit Interleukin - 6 (100 ng/ml), beginnend mit der unbehandelten Kontrolle **(A)**, gefolgt von 6, **(B)** 12 h **(C)** und 24 h Behandlung **(D)** wurde in 63 - facher Vergrößerung (Objektiv) die Zellen aufgenommen. Die Kernfärbung ist in blau dargestellt (DAPI), das OATP4A1 Protein ist an der grünen Membranfärbung erkennbar (GFP). Die Pfeile weisen auf eine klar definierte Membranfärbung hin.

4.2.3 OATP4A1 - positive C205 Zellen nach TNF α Behandlung

Die für die Behandlung verwendete Konzentration von TNF α betrug 10 ng/ml. Die C205 Zellen wurden im RPMI - 1640 Medium mit 10% FBS kultiviert und dann wie bei den Real - Time PCR Experimenten beschrieben, behandelt.

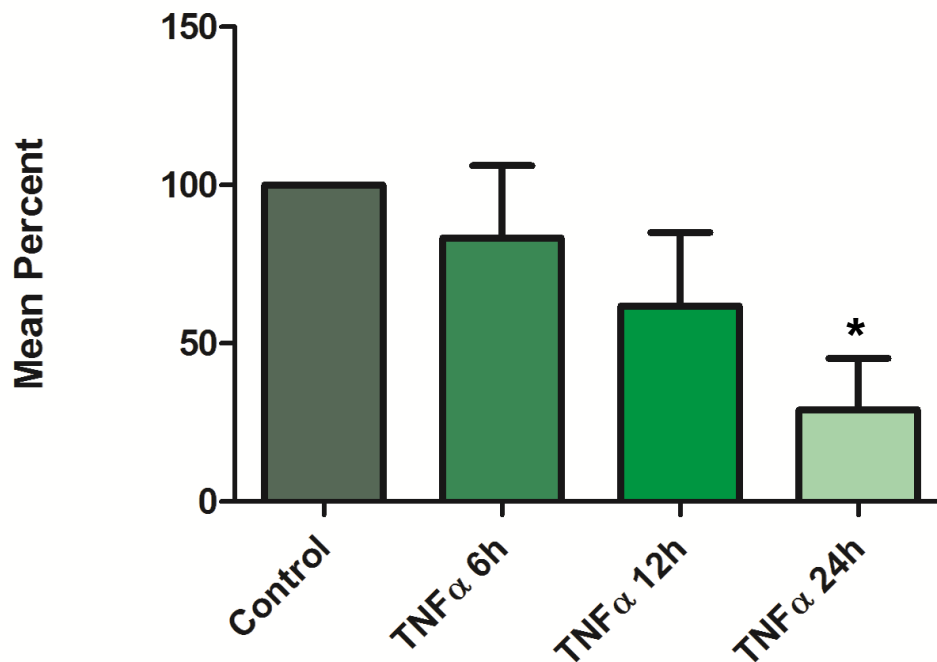


Abb. 14: Gehalt an OATP4A1 - positiven C205 Karzinomzellen nach Zytokinbehandlung

Es wurde eine Behandlung mit Tumornekrosefaktor alpha (10 ng/ml) nach 6 h, 12 h und 24 h Stimulation (Mittelwerte in Prozent $\pm$ SD) durchgeführt. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. „Mean Percent“ bezieht sich auf die Anzahl der positiven Zellen in Prozent nach Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. * = signifikant

Nach Behandlung mit TNF α ist ebenfalls eine verminderte Expression zu beobachten. Nach 6 Stunden sind noch 83,28 Prozent (Mittelwerte in Prozent $\pm$ SD) der Zellen OATP4A1 - positiv. Nach 24 - stündiger Behandlung sind es nur noch 29 Prozent.

Aus den Immunfluoreszenzbildern (Abb. 14) lässt sich eine Verringerung der Intensität an grün-fluoreszierenden OATP4A1 an der Zellmembran erkennen. Dies ist auch nach der 24- stündigen Behandlung, wie in Abb. 15 **(D)** demonstriert, zu finden.

Die Pfeile in Abb. 15 **(C)** sollen die grüne Membranfärbung für OATP4A1 hervorheben.

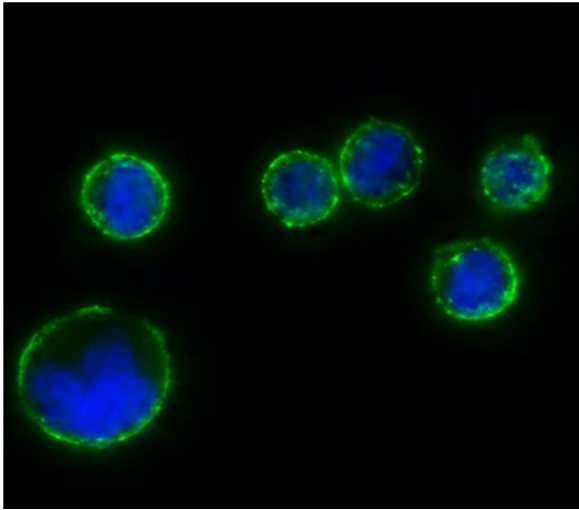
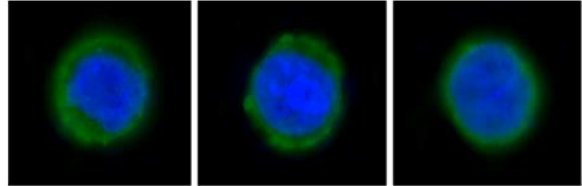
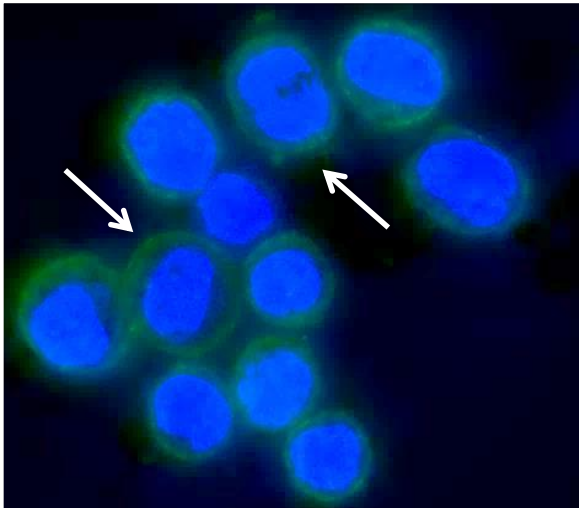
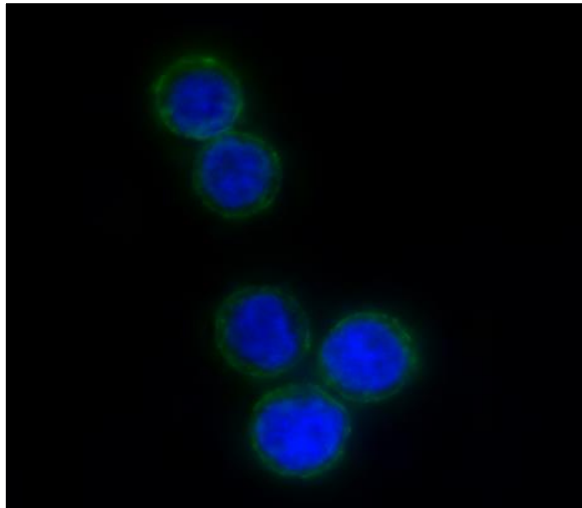
A**B****C****D**

Abb. 15: Ausgewählte Aufnahmen von immunoreaktiven OATP4A1 in der C205 Zelllinie

Nach der Behandlung mit Tumornekrosefaktor alpha (10 ng/ml), beginnend mit der unbehandelten Kontrolle **(A)**, gefolgt von 6 h **(B)**, 12 h **(C)** und 24 h Behandlung **(D)** sieht man die Membranfärbung von OATP4A1. Die Bilder wurden in 63 - facher Vergrößerung (Öl - Objektiv) aufgenommen. Die Kernfärbung ist in blau dargestellt (DAPI), das OATP4A1 Protein ist an der Zellmembran anhand der grünen Farbe erkennbar (GFP).

4.2.4 Nachweis von immunoreaktiven OATP4A1 in C205 Zellen nach Kombinationsbehandlung mit IL - 6 und TNF α

Die für die Behandlung verwendete Konzentration von IL - 6 betrug 100 ng/ml, TNF α wurde in einer Konzentration von 10 ng/ml appliziert. Die C205 Zellen wurden im RPMI - 1640 Medium mit 10% FBS kultiviert und stimuliert.

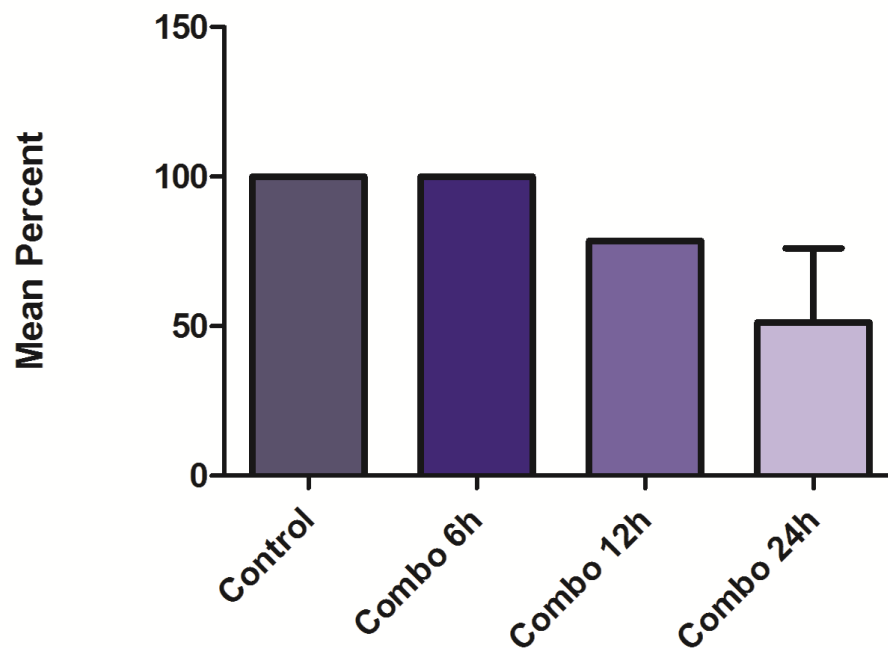


Abb. 16: OATP4A1 - positive Zellen nach der Kombinationsbehandlung mit Zytokinen

Die Kombinationsbehandlung mit Tumornekrosefaktor alpha (10 ng/ml) und Interleukin - 6 (100 ng/ml) nach 6 h, 12 h und 24 h Stimulation (Mittelwerte in Prozent der Kontrolle $\pm$ SD) verringert den Prozentsatz an OATP4A1 - positiven Zellen. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. „Mean Percent“ bezieht sich auf die Anzahl der positiven Zellen in Prozent.

Die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung weisen auf eine verminderte Anzahl an OATP4A1 - positiven Zellen nach der Behandlung hin. Nach 6 - stündiger Stimulation ist keine Veränderung zu sehen. Die 12 - stündige Inkubation ergab eine sichtliche Verringerung der positiven Zellen um etwa 20 Prozent (Mittelwerte in Prozent $\pm$ SD). Nach 24 Stunden zeigten nur noch 51,23 Prozent eine positive grüne OATP4A1 - Fluoreszenz.

Die mikroskopischen Aufnahmen der OATP4A1 Immunofluoreszenzfärbung in C205 Karzinomzellen sind in Abbildung Abb. 17 gezeigt.

Die Kontrolle (Abb. 17, **A**) zeigt eine intensive Membranfärbung, welche mit der Funktion von OATP4A1 als Membrantransportprotein übereinstimmt. Eine verringerte Intensität ist bereits nach 6 – stündiger Behandlung mit den Zytokinen ersichtlich. Die Membranfärbung bleibt, wenn auch in geringerer Intensität, erhalten. Nach 12 - und 24 - stündiger Behandlung konnten bereits deutlich mehr Zellen und Zellaggregate mit fehlender OATP - Expression gefunden werden.

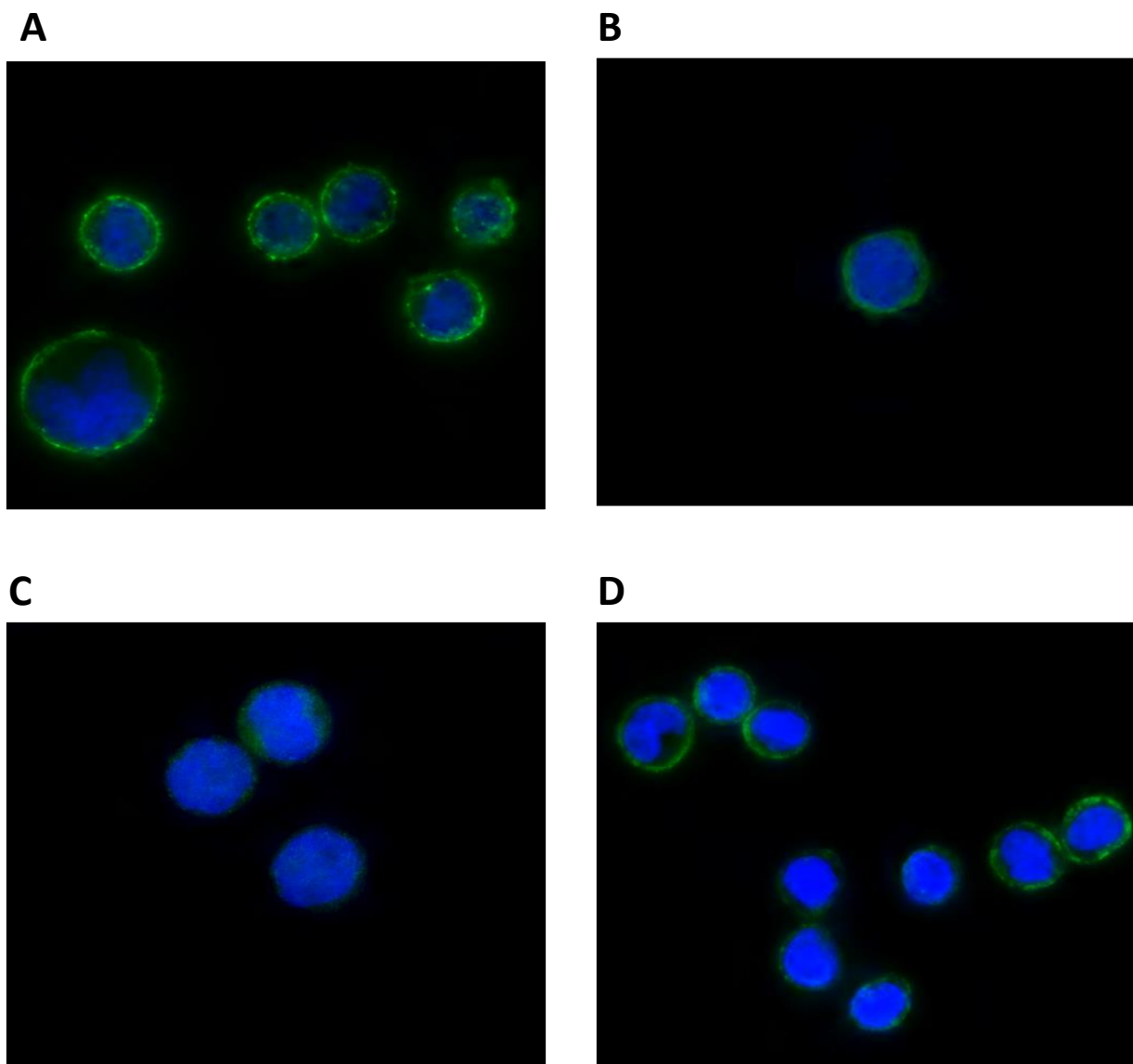


Abb. 17: Ausgewählte Aufnahmen von immunoreaktiven OATP4A1 in der C205 Zelllinie

Ansicht der OATP4A1 Membranfärbung der Zellen nach der Kombinationsbehandlung mit Tumornekrosefaktor alpha (10 ng/ml) und Interleukin - 6 (100 ng/ml), beginnend mit der unbehandelten Kontrolle (**A**), gefolgt von 6 h (**B**), 12 h (**C**) und 24 h Behandlung (**D**). Die Bilder wurden in 63 - facher Vergrößerung (Öl - Objektiv) aufgenommen. Die Kernfärbung ist in blau dargestellt (DAPI), das OATP4A1 Protein and der Zellmembran ist an der grünen Farbe erkennbar (GFP).

5 DISKUSSION

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach Behandlung mit den Zytokinen TNF α (10 ng/ml) und IL - 6 (100 ng/ml), die OATP4A1 - Expression abnimmt. Dies ist auf mRNA Ebene bereits nach 6 Stunden zu beobachten, während die Anzahl an OATP4A1 - positiven Zellen nach 24 Stunden bei allen Protokollen vermindert ist. Die Kombinationsbehandlung zeigte teilweise eine geringere Wirkung als die Einzelbehandlungen. Das weist darauf hin, dass ein Zytokin die Wirkung des zweiten blockieren könnte. Dies muss aber in weiteren Studien geklärt werden.

Außerdem fällt auf, dass auch nach 24 Stunden noch eine Membranfärbung sichtbar ist und es zu keiner Verschiebung des immunoreaktiven OATP4A1 in das Zytosol oder in den Kern kommt, wie es bei Kolonkarzinomproben von Patienten beobachtet wurde (Zotter, 2013). Dadurch dürfte die Transportfunktion des OATP4A1 auch nach Zytokinbehandlung erhalten bleiben, was möglicherweise wichtig für die Steuerung der Zellproliferation durch OATP4A1 Substrate wichtig ist.

Die Auswertungen der Immunofluoreszenzfärbungen für OATP4A1 mittels TissueFAXS®/TissueQuest® weisen eher große Standardabweichungen für das immunoreaktive OATP4A1 auf. Diese sind darauf zurückzuführen, dass immer wieder Zellen oder Zellverbände komplett negativ an immunoreaktivem OATP4A1 sind. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass sich die Zellen in unterschiedlichen Entwicklungs - und Teilungsphasen befinden und somit auch eine variierende OATP4A1 - Expression aufweisen. Dies könnte auch auf eine Funktion von OATP4A1 für den Transport von endogenen Verbindungen (Hormonen, Prostaglandinen, Peptiden) hinweisen, die für die Zellproliferation wichtig sind. Dies würde auch mit der erhöhten Konzentration von OATP4A1 in Kolonkarzinomproben von Patienten übereinstimmen (Zotter, 2013). Die Befunde lassen aber ausschließen, dass sich der in den Kolonkarzinomen erhöhte Gehalt an OATP4A1, der von unserer Arbeitsgruppe festgestellt worden war, durch die erhöhte Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF α und IL - 6, erklären lassen könnte.

Allerdings muss festgestellt werden, dass C205 Kolonkarzinomzellen von einem Patienten mit einem fortgeschrittenen, bereits metastasierenden Karzinom stammen. Daher sollten die Studien in einer Tumorzelllinie von einem frühen Karzinomstadium wiederholt werden.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Diplomarbeit erhobenen Befunde in der C205 Zelllinie, dass es durch Entzündungsmediatoren wie TNF α und IL - 6 zu einer verminderten Expression des Transporters OATP4A1 kommt. Dies könnte bei fortgeschrittenen Karzinomen zu einer Beeinflussung des Tumorwachstums führen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das kolorektale Karzinom, das eines der häufigsten malignen Tumorerkrankungen weltweit darstellt, entwickelt sich über lange Zeit aus gutartigen Vorstufen. 90% der Fälle treten sporadisch auf. Die am häufigsten auftretende Form des Kolonkarzinoms ist das Adenokarzinom. In fortgeschrittenen Stadien sind Metastasen vor allem in Leber und Lunge lokalisiert. Faktoren, die das Fortschreiten des Karzinoms beeinflussen, sind von wesentlichem Interesse, um eine bessere Therapie des Tumors erzielen zu können. Eine Möglichkeit stellt dabei eine Beeinflussung des Immunsystems mit T - Lymphozyten, B - Zellen und Makrophagen dar. Zahlreiche Botenstoffe beeinflussen die immunologische Umgebung des malignen Gewebes. Zytokine, wie IL - 6 und TNF α , sind von großer Bedeutung für die Aktivierung des Immunsystems. Im fortgeschrittenen Stadium scheinen diese Faktoren für ein vermehrt tumorpromovierendes Milieu zu sorgen. Neben den immunologischen Veränderungen treten im Tumorgewebe auch diverse andere Veränderungen auf. Die Expression unterschiedlicher Transporter in den Immun - und Tumorzellen nimmt hier zunehmend einen hohen Stellenwert ein. OATP4A1, ein transmembranäres, Natrium -unabhängiges Anionen - Transportprotein der OATP - Familie, weist im kolorektalen Karzinom eine stark erhöhte Expressionsrate im Vergleich zum gesunden Gewebe auf. Seine Funktion besteht im Transport von endogenen Substraten wie Hormonen, Prostaglandinen, Peptiden aber auch Arzneistoffen wie Statinen, etc. Die Funktionen von OATP4A1 in den individuellen Zellen, sowie die Steuerung der Expression gilt es jedoch noch zu erforschen. Studien haben gezeigt, dass die OATP4A1 - Expression in entzündetem Gewebe erhöht ist. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Wirkung dieser beiden Zytokine auf die OATP4A1 - Expression in den Tumorzellen zu untersuchen. Dazu wurde in dieser Studie der Einfluss der im malignen Gewebe in hoher Konzentration vorkommenden Zytokine, TNF α und IL - 6, auf die OATP4A1 - Expression (mRNA) mittels quantitativer PCR und auf Proteinebene mittels quantitativer Immunfluoreszenz untersucht.

Dazu wurden Adenokarzinomzellen von einem fortgeschrittenen Tumor (C205 Zelllinie) kultiviert und anschließend mit TNF α (10 ng/ml) und IL - 6 (100 ng/ml) behandelt.

In unterschiedlichen Zeitabständen (6 h, 12 h, 24 h) wurde RNA isoliert, um anschließend mittels qRT - TaqMan® PCR Modifikationen in den OATP4A1 mRNA Expressionsraten zu detektieren. Ergänzend wurde auch die Proteinexpression von OATP4A1 in der C205 Zelllinie mit dem gleichen Behandlungsprotokoll anhand von Immunofluoreszenzfärbungen untersucht. Die gefärbten Karzinomzellen wurden mit dem TissueFAXS® Imaging System aufgenommen und die virtuellen Bilder mit der TissueQuest® Software ausgewertet. Der Schwerpunkt der Auswertung lag auf der Anzahl der OATP4A1 exprimierenden Zellen und der Bestimmung der entsprechenden Fluoreszenzintensität. Die Ergebnisse der Versuchsreihen zeigen, dass sowohl auf mRNA -, sowie auf Proteinebene eine Tendenz zur verminderten Expression des Transporters gegeben ist. Die Einzelbehandlungen zeigten hierbei einen stärkeren Effekt als die Kombinationsbehandlung. In den Fluoreszenzbildern waren sowohl eine verringerte Intensität der Färbung, als auch eine verringerte Anzahl an Zellen, die OATP4A1 exprimieren, ersichtlich. Zusammenfassend lässt sich sagen dass die Zytokine TNF α und IL - 6 eine Hemmung der OATP4A1 Transporter - Expression bewirken. Nachdem dies in einer Zelllinie von einem fortgeschrittenen Kolonkarzinom durchgeführt wurde, wären weitere Studien an Zelllinien von Karzinomen in unterschiedlichen Stadien wichtig, um ein umfassendes Bild von der Regulation des Transporters im Tumor zu erhalten.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

18S	Ribosomale Untereinheit
5- FU	5 - Fluorouracil
ACE	Acetylcholinesterase
AF488	Alexa Fluor 488
AJCC	American Joint Committee of Cancer
AP- 1	Activator protein- 1, Transkriptionsfaktor
APC	Adenomatous - polyposis - coli, Tumorsuppressorgen
BRAF	Protoonkogen des B-rapidly accerlerated fibrosarcoma Proteins
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	complementary DNA
CIMP	CpG island methylation phenotype
COX	Cyclooxygenase
CpG	Cytosine – phosphate - Guanine
CRC	Kolorektales Karzinom
Ct	Cycle threshold
DACH	1,2 Diaminocyclohexan
DAPI	4',6 - Diamidin – 2 - phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Fötales Bovines Serum
FIT	Fecal Immunochemical Test
FOBT	Fecal Occult Blood Test
FOLFIRI	Kombinationstherapie: Folinsäure- 5- Fluorouracil- Irinotecan
FOLFOX	Kombinationstherapie: Folinsäure- 5- Fluorouracil- Oxaliplatin
FOV	Field of View
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G1- G4	Tumor Grading, Grade 1 - Grade 4
GALT	Gut associated lymphoid tissue
GAPDH	Glycerinaldehyd – 3 – phosphate - Dehydrogenase

GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GI - Trakt	Gastrointestinaltrakt
GSH	Glutathion
HCO ₃	Hydrogencarbonat
HEK293	Humane embryonale Nierenzelllinie
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HPNCC	Hereditäres non - polypöses Kolonkarzinom
HUGO	Human Genome Organisation
IL- 1 β	Interleukin - 1 β , Zytokin
IL- 10	Interleukin - 10, Zytokin
IL-6	Interleukin - 6, Zytokin
JAK	Janus Kinase
KRAS	Protoonkogen des K - Rat Sarcoma Proteins
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
MHC II	Major histocompatibility complex II
MLH1	MutL homolog 1, DNA Reparaturgen
mRNA	messenger RNA
MSH2	MutS protein homolog 2, DNA Reparaturgen
MSH6	MutS homolog 6, DNA Reparaturgen
NF	Normalisierungsfaktor
NF κ B	Nekrorefaktor kappa B
NSAID	Nicht - steroidale Entzündungshemmer
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide
p53	Tumorsuppressorprotein
p55	Tumornekrorefaktor alpha Rezeptor Typ 1
PBS	Phosphate buffered saline, Pufferlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PMS1	PMS1 protein homolog 1, DNA Reparaturgen
PMS2	PMS2, DNA Reparaturgen
qPCR	Quantitative Real - Time Polymerasekettenreaktion
ROI	Region of View
RPM I- 1640	Rosa Parks Memorial Institute- 1640

RQ	Relative Quantity
rT ₃	Reverses Triiodthyronin, Hormon
SLCO	solute Carrier OATP
SN- 38	Aktiver Metabolit von Irinotecan
SSA	Sessil serratiertes Adenom
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
T ₃	Triiodthyronin, Schilddrüsenhormon
T ₄	Thyroxin, Schilddrüsenhormon
TAM	Tumor - assoziierte Makrophagen
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha, Zytokin
TNM	Tumor Node Metastasis System, Klassifizierungssystem
TSA	Traditionell serratiertes Adenom
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XELOX	Kombinationstherapie: Capecitabin - Oxaliplatin
YWHAZ	14 – 3 – 3 protein zeta/delta

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1:** Veranschaulichung der von der WHO präsentierten CRC - Vorfälle
- Abb. 2:** Inzidenz und Mortalität bei Karzinomen des Dick- und Enddarms
- Abb. 3:** Veranschaulichung der komplexen Entstehungswege von CRC
- Abb. 4:** Graphische Darstellung der Struktur von OATP - Transportern
- Abb. 5:** Familienstammbaum der OATP (Organic Anion Transporting Polypeptide) - Familie
- Abb. 6:** Skizze der drei sich bildenden Phasen nach dem Zentrifugieren (RNA- Isolierung)
- Abb. 7:** Graphische Darstellung des Prinzips der quantitativen Real - Time TaqMan® PCR
- Abb. 8:** TissueFAXS® Cell Analysis System (TissueGnostics®, Vienna, Austria)
- Abb. 9:** mRNA - Expression von OATP4A1 (Mittelwerte $\pm$ SD) in C205 Karzinomzellen nach Einzelbehandlung mit IL - 6 (100 ng/ml)
- Abb. 10:** mRNA - Expression von OATP4A1 (Mittelwerte $\pm$ SD) in C205 Karzinomzellen nach Einzelbehandlung mit TNF α (10 ng/ml)
- Abb. 11:** mRNA - Expression von OATP4A1 (Mittelwerte $\pm$ SD) in C205 Karzinomzellen nach Kombinationsbehandlung mit IL - 6 + TNF α
- Abb. 12:** Prozentsatz an Zellen (C205) mit OATP4A1 – Protein nach Zytokinbehandlung
- Abb. 13:** Ausgewählte Aufnahmen von immunoreaktiven OATP4A1 in der C205 Zelllinie
- Abb. 14:** Gehalt an OATP4A1 - positiven C205 Karzinomzellen nach Zytokinbehandlung
- Abb. 15:** Ausgewählte Aufnahmen von immunoreaktiven OATP4A1 in der C205 Zelllinie
- Abb. 16:** OATP4A1 - positive Zellen nach der Kombinationsbehandlung mit Zytokinen
- Abb. 17:** Ausgewählte Aufnahmen von immunoreaktiven OATP4A1 in der C205 Zelllinie

9 TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1:** Kriterien der Unterteilung des TNM - Systems
- Tab. 2:** Unterteilung der Stadien von CRC nach Fortschritt mit Veranschaulichung
- Tab. 3:** Eingesetzte Einstellungen am Inkubator (Zellkultur)
- Tab. 4:** Lösung für die reverse Transkription
- Tab. 5:** Überblick eines Zyklus, konventionelle PCR
- Tab. 6:** Mastermix für ein Well (quantitative Real - Time TaqMan® PCR)
- Tab. 7:** primärer und sekundärer eingesetzter Antikörper
- Tab. 8:** Einstellungen für die Aufnahmen mit TissueFAXS®
- Tab. 9:** Weitere Einstellungen für DAPI und GFP

10 LITERATURVERZEICHNIS

ABBAS, A. K. & H., L. A. 2005. *Cellular and Molecular Immunology*, Elsevier Saunders, Oxford, 5. Auflage, p. 85-92.

Absolute vs. Relative Quantification for qPCR. Life Technologies. Available: <http://www.lifetechnologies.com/at/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/absolute-vs-relative-quantification-for-qpcr.html> [Accessed 08/02/ 2014].

AICR. 2007. *World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. Washington DC. Available: <http://eprints.ucl.ac.uk/4841/1/4841.pdf> [Accessed 21/03/ 2014].

AKTORIES, K., FÖRSTERMANN, U., HOFMANN, F. B. & STARKE, K. 2013. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel*, Elsevier, Urban&Fischer Verlag, 11. Auflage, p. 901-920, 948-961.

American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures, 2011- 2013*. Atlanta: American Cancer Society, 2011. Available: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-028312.pdf> [Accessed 26/03/ 2014].

ATCC, LGC Standards. Available: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-222.aspx> [Accessed 25/04/2014].

BALKWILL, F. & MANTOVANI, A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357, 539-45.

BALKWILL, F. 2002. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev*, 13, 135-41.

BALKWILL, F., CHARLES, K. A. & MANTOVANI, A. 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 7, 211-7.

BERGERS, G. & BENJAMIN, L. E. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3, 401-10.

BEUTLER, B. A. 1999. The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol Suppl*, 57, 16-21.

BÖCKER, W., DENK, H., HEITZ, P. U., MOCH, H., HÖFLER, G. & KREIPE, H. 2012. *Lehrbuch Pathologie*, Elsevier, Urban & Fischer, 5. Auflage, p. 595-614.

BOLLRATH, J. & GRETEN, F. R. 2009. IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep*, 10, 1314-9.

BOYLE, P. & LANGMAN, J. S. 2000. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ*, 321, 805-8.

BROWN 2007. *Colorectal Cancer*, Cambridge University Press, p.3-5.

BUXHOFER-AUSCH, V., SECKY, L., WLCEK, K., SVOBODA, M., KOUNNIS, V., BRIASOULIS, E., TZAKOS, A. G., JAEGER, W. & THALHAMMER, T. 2013. Tumor-specific expression of organic anion-transporting polypeptides: transporters as novel targets for cancer therapy. *J Drug Deliv*, 2013, 863539, 12 pages.

CALTON, B. A., LACEY, J. V., JR., SCHATZKIN, A., SCHAIRER, C., COLBERT, L. H., ALBANES, D. & LEITZMANN, M. F. 2006. Physical activity and the risk of colon cancer among women: a prospective cohort study (United States). *Int J Cancer*, 119, 385-91.

CASSIDY, J., CLARKE, S., DIAZ-RUBIO, E., SCHEITHAUER, W., FIGER, A., WONG, R., KOSKI, S., LICHINITSER, M., YANG, T. S., RIVERA, F., COUTURE, F., SIRZEN, F. & SALTZ, L. 2008. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 26, 2006-12.

CHAN, A. T. & GIOVANNUCCI, E. L. 2010. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138, 2029-2043 e10.

CHEN, J. J., LIN, Y. C., YAO, P. L., YUAN, A., CHEN, H. Y., SHUN, C. T., TSAI, M. F., CHEN, C. H. & YANG, P. C. 2005. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *J Clin Oncol*, 23, 953-64.

CHU, K. M. 2011. 1 - Epidemiology and Risk Factors of Colorectal Cancer. In: GEARHART, S. L. & AHUJA, N. (eds.) *Early Diagnosis and Treatment of Cancer Series: Colorectal Cancer*. Saint Louis: W.B. Saunders, p.1-11.

COCA, S., PEREZ-PIQUERAS, J., MARTINEZ, D., COLMENAREJO, A., SAEZ, M. A., VALLEJO, C., MARTOS, J. A. & MORENO, M. 1997. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*, 79, 2320-8.

COUSSENS, L. M. & WERB, Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420, 860-7.

CULPEPPER, B. S. T. & MAI, V. 2013. Evidence for Contributions of Gut Microbiota to Colorectal Carcinogenesis. *Current Nutrition Reports*, 2, 10-18.

CUNNINGHAM, D., ATKIN, W., LENZ, H. J., LYNCH, H. T., MINSKY, B., NORDLINGER, B. & STARLING, N. 2010. Colorectal cancer. *Lancet*, 375, 1030-47.

DAMERY, S., RYAN, R., WILSON, S., ISMAIL, T. & HOBBS, R. 2011. Iron deficiency anaemia and delayed diagnosis of colorectal cancer: a retrospective cohort study. *Colorectal Dis*, 13, e53-60.

Data Assist TM v3.0 Software User Instructions. Applied Biosystems. Available: http://cgs.hku.hk/portal/files/CGS/Genomics/Realtime-PCR/dataassist%20v3_0%20software%20user%20instructions.pdf [Accessed 27/01/2014].

DE VISSER, K. E., EICHTEN, A. & COUSSENS, L. M. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*, 6, 24-37.

DOMINGUEZ-AYALA, M., DIEZ-VALLEJO, J. & COMAS-FUENTES, A. 2012. Missed opportunities in early diagnosis of symptomatic colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig*, 104, 343-9.

EADEN, J. A., ABRAMS, K. R. & MAYBERRY, J. F. 2001. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, 48, 526-35.

Essential of Real Time PCR. Life Technologies. Available: <http://www.lifetechnologies.com/at/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/essentials-of-real-time-pcr.html> [Accessed 08/02/2014].

FERLAY J, S. I., ERVIK M, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY, F. 2012. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. Available: <http://globocan.iarc.fr>, [Accessed 30/04/2014]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013.

FLEMING, M., RAVULA, S., TATISHCHEV, S. F. & WANG, H. L. 2012. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*, 3, 153-73.

FUJIWARA, K., ADACHI, H., NISHIO, T., UNNO, M., TOKUI, T., OKABE, M., ONOGAWA, T., SUZUKI, T., ASANO, N., TANEMOTO, M., SEKI, M., SHIIBA, K., SUZUKI, M., KONDO, Y., NUNOKI, K., SHIMOSEGAWA, T., IINUMA, K., ITO, S., MATSUNO, S. & ABE, T. 2001. Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. *Endocrinology*, 142, 2005-12.

GARCIA RODRIGUEZ, L. A., RUIGOMEZ, A., WALLANDER, M. A., JOHANSSON, S. & OLBE, L. 2000. Detection of colorectal tumor and inflammatory bowel disease during follow-up of patients with initial diagnosis of irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol*, 35, 306-11.

GATALICA, Z. & TORLAKOVIC, E. 2008. Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. *Fam Cancer*, 7, 15-26.

GEIER, A., DIETRICH, C. G., VOIGT, S., KIM, S. K., GERLOFF, T., KULLAK-UBLICK, G. A., LORENZEN, J., MATERN, S. & GARTUNG, C. 2003. Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology*, 38, 345-54.

GINZINGER, D. G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*, 30, 503-12.

GRADY, W. M. 2003. Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology*, 124, 1574-94.

GRIVENNIKOV, S., KARIN, E., TERZIC, J., MUCIDA, D., YU, G. Y., VALLABHAPURAPU, S., SCHELLER, J., ROSE-JOHN, S., CHEROUTRE, H., ECKMANN, L. & KARIN, M. 2009. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, 15, 103-13.

HAGEMANN, T., ROBINSON, S. C., SCHULZ, M., TRUMPER, L., BALKWILL, F. R. & BINDER, C. 2004. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis*, 25, 1543-9.

HAGENBUCH, B. & GUI, C. 2008. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica*, 38, 778-801.

HAGENBUCH, B. & MEIER, P. J. 2003. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta*, 1609, 1-18.

HAGENBUCH, B. & MEIER, P. J. 2004. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch*, 447, 653-65.

HAHN, R. G., MOERTEL, C. G., SCHUTT, A. J. & BRUCKNER, H. W. 1975. A double-blind comparison of intensive course 5-fluorouracil by oral vs. intravenous route in the treatment of colorectal carcinoma. *Cancer*, 35, 1031-5.

HAMILTON, K. E., SIMMONS, J. G., DING, S., VAN LANDEGHEM, L. & LUND, P. K. 2011. Cytokine induction of tumor necrosis factor receptor 2 is mediated by STAT3 in colon cancer cells. *Mol Cancer Res*, 9, 1718-31.

HAMILTON, W., COLEMAN, M. G. & RUBIN, G. 2013. Colorectal cancer. *BMJ*, 346, f3172.

HARTMANN, G., CHEUNG, A. K. & PIQUETTE-MILLER, M. 2002. Inflammatory cytokines, but not bile acids, regulate expression of murine hepatic anion transporters in endotoxemia. *J Pharmacol Exp Ther*, 303, 273-81.

HAYDON, A. M. & JASS, J. R. 2002. Emerging pathways in colorectal-cancer development. *Lancet Oncol*, 3, 83-8.

HEDIGER, M. A., ROMERO, M. F., PENG, J. B., ROLFS, A., TAKANAGA, H. & BRUFORD, E. A. 2004. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch*, 447, 465-8.

HERBEUVAL, J. P., LELIEVRE, E., LAMBERT, C., DY, M. & GENIN, C. 2004. Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. *J Immunol*, 172, 4630-6.

HIDDEMANN, W. & BARTRAM, C. R. 2010. *Die Onkologie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2. Auflage, p.854, 864.

HORN, F. 2009. *Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium*, Georg Thieme Verlag, 4. Auflage, p. 408-409.

HURWITZ, H., FEHRENBACHER, L., NOVOTNY, W., CARTWRIGHT, T., HAINSWORTH, J., HEIM, W., BERLIN, J., BARON, A., GRIFFING, S., HOLMGREN, E., FERRARA, N., FYFE, G., ROGERS, B., ROSS, R. & KABBINAVAR, F. 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 350, 2335-42.

IMADA, A., SHIJUBO, N., KOJIMA, H. & ABE, S. 2000. Mast cells correlate with angiogenesis and poor outcome in stage I lung adenocarcinoma. *Eur Respir J*, 15, 1087-93.

JASPERSON, K. W., TUOHY, T. M., NEKLASON, D. W. & BURT, R. W. 2010. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138, 2044-2058.

JASS, J. R. 2007. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50, 113-30.

JEDINAK, A., DUDHGAONKAR, S. & SLIVA, D. 2010. Activated macrophages induce metastatic behavior of colon cancer cells. *Immunobiology*, 215, 242-9.

JENSEN-JAROLIM, E., SCHÖLL, I. & SZALAI, K. 2006. *Gastrointestinaltrakt: Mukosale Pathophysiologie und Immunologie*, Springer Verlag, p.87,98-102.

JOHNS, L. E. & HOULSTON, R. S. 2001. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol*, 96, 2992-3003.

JUNQUEIRA, L. C., JOSÉ ; GRATZL, MANFRED 2005. Histologie. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 6. Auflage, p. 260-265.

KALLIOKOSKI, A. & NIEMI, M. 2009. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol*, 158, 693-705.

KARIN, M. & GRETEN, F. R. 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 5, 749-59.

KIM, C. H. & SHANAHAN, F. 2010. 10.04 - The Gastrointestinal Immune System. In: MCQUEEN, C. A. (ed.) *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*. Oxford: Elsevier, p. 39-52.

KISHIMOTO, T. 2005. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol*, 23, 1-21.

KOBAYASHI, D., NOZAWA, T., IMAI, K., NEZU, J., TSUJI, A. & TAMAI, I. 2003. Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J Pharmacol Exp Ther*, 306, 703-8.

KOLLIAS, G., DOUNI, E., KASSIOTIS, G. & KONTOYIANNIS, D. 1999. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev*, 169, 175-94.

KÜCK, U. 2005. *Praktikum der Molekulargenetik*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, p. 221- 228.

LARSSON, S. C., RUTEGARD, J., BERGKVIST, L. & WOLK, A. 2006. Physical activity, obesity, and risk of colon and rectal cancer in a cohort of Swedish men. *Eur J Cancer*, 42, 2590-7.

LAUBERT, T., HABERMANN, J. K., BADER, F. G., JUNGBLUTH, T., ESNAASHARI, H., BRUCH, H. P., ROBLICK, U. J. & AUER, G. 2010. Epidemiology, molecular changes, histopathology and diagnosis of colorectal cancer. *Eur Surg*, 42, 6, 252-259.

LE VEE, M., LECUREUR, V., STIEGER, B. & FARDEL, O. 2009. Regulation of drug transporter expression in human hepatocytes exposed to the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha or interleukin-6. *Drug Metab Dispos*, 37, 685-93.

LEE, H., HERRMANN, A., DENG, J. H., KUJAWSKI, M., NIU, G., LI, Z., FORMAN, S., JOVE, R., PARDOLL, D. M. & YU, H. 2009. Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell*, 15, 283-93.

LEGRAND-POELS, S., SCHOONBROODT, S. & PIETTE, J. 2000. Regulation of interleukin-6 gene expression by pro-inflammatory cytokines in a colon cancer cell line. *Biochem J*, 349 Pt 3, 765-73.

LEUTHOLD, S., HAGENBUCH, B., MOHEBBI, N., WAGNER, C. A., MEIER, P. J. & STIEGER, B. 2009. Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296, C570-82.

LEWIS, C. E. & POLLARD, J. W. 2006. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*, 66, 605-12.

LICHTENSTEIN, P., HOLM, N. V., VERKASALO, P. K., ILIADOU, A., KAPRIO, J., KOSKENVUO, M., PUKKALA, E., SKYTTE, A. & HEMMINKI, K. 2000. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, 343, 78-85.

LIN, C. Y., LIN, C. J., CHEN, K. H., WU, J. C., HUANG, S. H. & WANG, S. M. 2006. Macrophage activation increases the invasive properties of hepatoma cells by destabilization of the adherens junction. *FEBS Lett*, 580, 3042-50.

LIN, J. H., ZHANG, S. M., REXRODE, K. M., MANSON, J. E., CHAN, A. T., WU, K., TWOROGGER, S. S., HANKINSON, S. E., FUCHS, C., GAZIANO, J. M., BURING, J. E. & GIOVANNUCCI, E. 2013. Association between sex hormones and colorectal cancer risk in men and women. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 11, 419-424.e1.

LOCKHART, A. C., HARRIS, E., LAFLEUR, B. J., MERCHANT, N. B., WASHINGTON, M. K., RESNICK, M. B., YEATMAN, T. J. & LEE, W. 2008. Organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) is overexpressed in colorectal tumors and is a predictor of clinical outcome. *Clin Exp Gastroenterol*, 1, 1-7.

LOEVE, F., BROWN, M. L., BOER, R., VAN BALLEGOOIJEN, M., VAN OORTMARSEN, G. J. & HABBEMA, J. D. 2000. Endoscopic colorectal cancer screening: a cost-saving analysis. *J Natl Cancer Inst*, 92, 557-63.

LÜLLMANN-RAUCH, R. & PAULSEN, F. 2012. *Taschenlehrbuch Histologie*, Georg Thieme Verlag, 4. Auflage, p. 407-412.

MAHAGITA, C., GRASSL, S. M., PIYACHATURAWAT, P. & BALLATORI, N. 2007. Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, G271-8.

MARKOWITZ, S. D. & BERTAGNOLLI, M. M. 2009. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 361, 2449-60.

MAUCHLEY, D. C., LYNGE, D. C., LANGDALE, L. A., STELZNER, M. G., MOCK, C. N. & BILLINGSLEY, K. G. 2005. Clinical utility and cost-effectiveness of routine preoperative computed tomography scanning in patients with colon cancer. *Am J Surg*, 189, 512-7; discussion 517.

MCPHERSON, M. & MØLLER, S. 2007. *PCR*, Taylor & Francis Group, 2. Auflage, p. 1-6.

MEIER, P. J. & STIEGER, B. 2002. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol*, 64, 635-61.

MEIER-ABT, F., MOKRAB, Y. & MIZUGUCHI, K. 2005. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode. *J Membr Biol*, 208, 213-27.

MEPHISTO. 2006-2013. Available: <http://www.mephisto-online.de/book/Kolon/127> [Accessed 12/11/ 2013].

MEYERHARDT, J. A. & MAYER, R. J. 2005. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med*, 352, 476-87.

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. 2004. Isolation and characterization of a digoxin transporter and its rat homologue expressed in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 3569-74.

MOGHADDAM, A. A., WOODWARD, M. & HUXLEY, R. 2007. Obesity and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of 31 studies with 70,000 events. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16, 2533-47.

National Cancer Institute. *Stages of Colorectal Cancer, Colon Cancer Treatment (PDQ®)* National Cancer Institute. Available: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/colon/Patient/page2> [Accessed 07/03/ 2014].

NOZAWA, T., IMAI, K., NEZU, J., TSUJI, A. & TAMAI, I. 2004. Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human. *J Pharmacol Exp Ther*, 308, 438-45.

NOZAWA, T., SUZUKI, M., YABUUCHI, H., IROKAWA, M., TSUJI, A. & TAMAI, I. 2005. Suppression of cell proliferation by inhibition of estrone-3-sulfate transporter in estrogen-dependent breast cancer cells. *Pharm Res*, 22, 1634-41.

OBAIDAT, A., ROTH, M. & HAGENBUCH, B. 2012. The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 52, 135-51.

OGASAWARA, K., TERADA, T., KATSURA, T., HATANO, E., IKAI, I., YAMAOKA, Y. & INUI, K. 2010. Hepatitis C virus-related cirrhosis is a major determinant of the expression levels of hepatic drug transporters. *Drug Metab Pharmacokinet*, 25, 190-9.

PARKIN, D. M., BRAY, F., FERLAY, J. & PISANI, P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55, 74-108.

PENTHEROUDAKIS, G. & TWELVES, C. 2002. The rational development of capecitabine from the laboratory to the clinic. *Anticancer Res*, 22, 3589-96.

PIZZAGALLI, F., VARGA, Z., HUBER, R. D., FOLKERS, G., MEIER, P. J. & ST-PIERRE, M. V. 2003. Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 3902-12.

POPIVANOVA, B. K., KITAMURA, K., WU, Y., KONDO, T., KAGAYA, T., KANEKO, S., OSHIMA, M., FUJII, C. & MUKAIDA, N. 2008. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest*, 118, 560-70.

PORSCHEN, R., ARKENAU, H. T., KUBICKA, S., GREIL, R., SEUFFERLEIN, T., FREIER, W., KRETZSCHMAR, A., GRAEVEN, U., GROTHEY, A., HINKE, A., SCHMIEGEL, W. & SCHMOLL, H. J. 2007. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and leucovorin plus oxaliplatin in metastatic colorectal cancer: a final report of the AIO Colorectal Study Group. *J Clin Oncol*, 25, 4217-23.

RAHME, E., BARKUN, A. N., TOUBOUTI, Y. & BARDOU, M. 2003. The cyclooxygenase-2-selective inhibitors rofecoxib and celecoxib prevent colorectal neoplasia occurrence and recurrence. *Gastroenterology*, 125, 404-12.

RAYMOND, E., BUQUET-FAGOT, C., DJELLOUL, S., MESTER, J., CVITKOVIC, E., ALLAIN, P., LOUVET, C. & GESPACH, C. 1997. Antitumor activity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor AG337 in human colon, breast and ovarian cancers. *Anticancer Drugs*, 8, 876-85.

RAYMOND, E., FAIVRE, S., CHANEY, S., WOYNAROWSKI, J. & CVITKOVIC, E. 2002. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther*, 1, 227-35.

Real-Time Vs. Traditional PCR. Applied Biosystems. Available: http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf [Accessed 08/02/ 2014].

RIBATTI, D., ENNAS, M. G., VACCA, A., FERRELI, F., NICO, B., ORRU, S. & SIRIGU, P. 2003. Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. *Eur J Clin Invest*, 33, 420-5.

RQ tutorial, User Bulletin #2, 2001. Applied Biosystems. Available: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040980.pdf [Accessed 10/02/2014].

SATLIN, L. M., AMIN, V. & WOLKOFF, A. W. 1997. Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO₃⁻ exchange. *J Biol Chem*, 272, 26340-5.

SCHIEBLER, T. H. & KORF, H.-W. 2007. *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*, Steinkopff Verlag, 10. Auflage p.344.

SCHOEN, R. E., PINSKY, P. F., WEISSFELD, J. L., YOKOCHI, L. A., CHURCH, T., LAIYEMO, A. O., BRESALIER, R., ANDRIOLE, G. L., BUYS, S. S., CRAWFORD, E. D., FOUAD, M. N., ISAACS, C., JOHNSON, C. C., REDING, D. J., O'BRIEN, B., CARRICK, D. M., WRIGHT, P., RILEY, T. L., PURDUE, M. P., IZMIRLIAN, G., KRAMER, B. S., MILLER, A. B., GOHAGAN, J. K., PROROK, P. C. & BERG, C. D. 2012. Colorectal-cancer incidence and mortality with screening flexible sigmoidoscopy. *N Engl J Med*, 366, 2345-57.

SCHOPPMANN, S. F., BIRNER, P., STOCKL, J., KALT, R., ULLRICH, R., CAUCIG, C., KRIEHLER, E., NAGY, K., ALITALO, K. & KERJASCHKI, D. 2002. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol*, 161, 947-56.

SCHULMANN, K., REISER, M. & SCHMIEGEL, W. 2002. Colonic cancer and polyps. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 16, 91-114.

SEDLACEK, H. H. 2013. *Onkologie - die Tumorerkrankungen des Menschen: Entstehung, Abwehr und Behandlungsmöglichkeiten*, Walter de Gruyter Berlin/Boston, p. 783-786.

SEER Stat Fact Sheets: Colon and Rectum Cancer, 2007- 2011 National Cancer Institute. Available: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html> [Accessed 05/05/2014].

SEMPLE, T. U., QUINN, L. A., WOODS, L. K. & MOORE, G. E. 1978. Tumor and lymphoid cell lines from a patient with carcinoma of the colon for a cytotoxicity model. *Cancer Res*, 38, 1345-55.

SIEGENTHALER, W. & AMANN-VESTI, B. R. 2006. *Klinische Pathophysiologie*, Georg Thieme Verlag, 9.Auflage, p.850.

SINGH, H., DACI, K., PETERSEN, L. A., COLLINS, C., PETERSEN, N. J., SHETHIA, A. & EL-SERAG, H. B. 2009. Missed opportunities to initiate endoscopic evaluation for colorectal cancer diagnosis. *Am J Gastroenterol*, 104, 2543-54.

SMITH, W. L., DEWITT, D. L. & GARAVITO, R. M. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 69, 145-82.

SNOVER, D. C., JASS, J. R., FENOGLIO-PREISER, C. & BATTS, K. P. 2005. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. *Am J Clin Pathol*, 124, 380-91.

Statistik Austria 2013. Available:

http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/dickdarm_enneddarm/index.html [Accessed 30/04/2014].

STRASINGER, S. K. & DI LORENZO, M. S. 2014. *Urinalysis and Body Fluids*, F. A. Davis Company, 6. Auflage, p.261.

SUBBARAMAIAH, K. & DANNENBERG, A. J. 2003. Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci*, 24, 96-102.

SVOBODA, M., RIHA, J., WLCEK, K., JAEGER, W. & THALHAMMER, T. 2011. Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function. *Curr Drug Metab*, 12, 139-53.

TAMAI, I., NEZU, J., UCHINO, H., SAI, Y., OKU, A., SHIMANE, M. & TSUJI, A. 2000. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun*, 273, 251-60.

TANNAPFEL, A., NEID, M., AUST, D. & BARETTON, G. 2010. The origins of colorectal carcinoma: specific nomenclature for different pathways and precursor lesions. *Dtsch Arztebl Int*, 107, 760-6.

TAPPENDEN, P., CHILCOTT, J., EGGINGTON, S., PATNICK, J., SAKAI, H. & KARNON, J. 2007. Option appraisal of population-based colorectal cancer screening programmes in England. *Gut*, 56, 677-84.

TERZIC, J., GRIVENNIKOV, S., KARIN, E. & KARIN, M. 2010. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138, 2101-2114.e5.

THOMAS, C. & ALEXANDRAKIS, E. 2006. *Histopathologie: Lehrbuch und Atlas zur Befunderhebung und Differenzialdiagnostik*, Schattauer GmbH Stuttgart, 14. Auflage, p. 151-153.

THORAT, M. A. & CUZICK, J. 2013. Role of aspirin in cancer prevention. *Curr Oncol Rep*, 15, 533-40.

TORISU, H., ONO, M., KIRYU, H., FURUE, M., OHMOTO, Y., NAKAYAMA, J., NISHIOKA, Y., SONE, S. & KUWANO, M. 2000. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha. *Int J Cancer*, 85, 182-8.

TOURNIGAND, C., ANDRE, T., ACHILLE, E., LLEDO, G., FLESH, M., MERY-MIGNARD, D., QUINAUX, E., COUTEAU, C., BUYSE, M., GANEM, G., LANDI, B., COLIN, P., LOUVET, C. & DE GRAMONT, A. 2004. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*, 22, 229-37.

TSAI, S. & GEARHART, S. L. 2011. 2 - Presentation and Initial Evaluation of Colorectal Cancer. In: GEARHART, S. L. & AHUJA, N. (eds.) *Early Diagnosis and Treatment of Cancer Series: Colorectal Cancer*. Saint Louis: W.B. Saunders, p. 13-19.

ULFIG, N. 2005. *Kurzlehrbuch Histologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, p.145.

VAN CUTSEM, E., KOHNE, C. H., HITRE, E., ZALUSKI, J., CHANG CHIEN, C. R., MAKHSON, A., D'HAENS, G., PINTER, T., LIM, R., BODOKY, G., ROH, J. K., FOLPRECHT, G., RUFF, P., STROH, C., TEJPAR, S., SCHLICHTING, M., NIPPGEN, J. & ROUGIER, P. 2009. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 360, 1408-17.

Versuchsprotokoll 4.1 Zellbiologie. Available: http://www.staff.uni-mainz.de/freesec/Download/Biochemie/FIBiochemie/Versuchsprotokoll_FI_%204_1_Zellbiologie.pdf [Accessed 12/12/ 2013].

VON ROON, A. C., REESE, G., TEARE, J., CONSTANTINIDES, V., DARZI, A. W. & TEKKIS, P. P. 2007. The risk of cancer in patients with Crohn's disease. *Dis Colon Rectum*, 50, 839-55.

WLCEK, K., SVOBODA, M., RIHA, J., ZAKARIA, S., OLSZEWSKI, U., DVORAK, Z., SELLNER, F., ELLINGER, I., JAGER, W. & THALHAMMER, T. 2011. The analysis of organic anion transporting polypeptide (OATP) mRNA and protein patterns in primary and metastatic liver cancer. *Cancer Biol Ther*, 11, 801-11.

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. 2009. Changes in mRNA expression levels of solute carrier transporters in inflammatory bowel disease patients. *Drug Metab Dispos*, 37, 1871-7.

WOLPIN, B. M. & MAYER, R. J. 2008. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology*, 134, 1296-310.

WONG, M. C., HIRAI, H. W., LUK, A. K., LAM, T. Y., CHING, J. Y., GRIFFITHS, S. M., CHAN, F. K. & SUNG, J. J. 2013. The knowledge of colorectal cancer symptoms and risk factors among 10,078 screening participants: are high risk individuals more knowledgeable? *PLoS One*, 8, e60366.

YANG, A. D., BROUQUET, A. & VAUTHEY, J. N. 2010. Extending limits of resection for metastatic colorectal cancer: risk benefit ratio. *J Surg Oncol*, 102, 996-1001.

YOUNG, A., HOBBS, R. & KERR, D. 2011. *ABC of Colorectal Cancer: Pathway of carcinogenesis*, John Wiley & Sons, 2. Auflage, p. 8-12.

ZILLES, K. & TILLMANN, B. 2010. *Anatomie*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, p. 469-484.

ZOTTER, S. 2013. *Expression von OATP4A1 im kolorektalen Karzinom: Bedeutung des Transporters in Bindegewebs- und Immunzellen*. Diplomarbeit, Universität Wien.

11 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name	Ana Katic
Geburtsort	Zagreb, Kroatien
Nationalität	Österreich

Ausbildung

09/ 2013- 05/ 2014	Diplomarbeit am Department für Pathophysiologie und Allergieforschung, Zentrum für Pathologie, Infektiologie und Immunologie, Medizinische Universität Wien
Seit Oktober 2006	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
13.06.2006	Matura am Europagymnasium Klagenfurt

Berufliche Erfahrung

30.07.2008-30.08.2008	Praktikum LKH Anstaltsapotheke Feschnigstraße 11, 9020 Klagenfurt
08/2012	Ferialpraktikum, Rotundenapotheke Ausstellungsstraße 53, 1020 Wien